

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Université de blida-1 / Institut des Sciences Vétérinaires

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème

**EFFET DE BIOMOLECULES DU GRENADIER
PUNICA GRANATUM L SUR LES ENTEROCOQUES ISOLÉS
DU TUBE DIGESTIF DE VOLAILLE**

Présenté par

HEBBACHE Bader Eddine

Soutenu le **27/09/2023**

Présenté devant le jury :

Président :	KEBOUR Djamila	Professeure	ISV/Blida 1
Examineur :	MERDJA Salah Eddine	MCB	ISV/Blida 1
Promoteur :	HAMMAMI Nabila	MCA	ISV/Blida 1
Co-Promoteur :	YOUSFI Safia	MCA	ISV/Blida 1

Année universitaire **2022/2023**

Remerciements

"Louange à Dieu, Seigneur des mondes, qui m'a donné le courage et la force d'accomplir mon travail."

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma promotrice Mme Hammami Nabila pour son précieux encadrement, sa guidance et sa direction tout au long de mon travail. Sa présence bienveillante et son expertise ont été d'une aide inestimable pour moi.

A ma Co-promotrice, Mme Yousfi Safia, qui m'a fourni tout ce dont j'avais besoin pour travailler dans de bonnes conditions, Sa contribution a été essentielle au succès de mon travail et je lui en suis très reconnaissant, merci beaucoup.

Je remercie aussi

Mme KEBOUR Djamilia, pour avoir accepté de présider le jury.

Ainsi que Mr MERDJA Salah Eddine, Mr CHIKHI Hamid et Mr MOKRANI Djamel 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.

Je remercie également les responsables du laboratoire de l'institut de m'avoir donné l'accès pour réaliser la partie expérimentale.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

A mes chers parents MAMA et PAPA pour leur patience, leur amour, leur soutien et Encouragements, Je ne vous remercierai jamais assez.

Que dieu vous procure une Bonne santé et une longue vie, Je vous aime.

Au meilleur frère : ISLAM.

A mes chères sœurs : WIDED, SOUNDOUS ET RETEDJ.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

Que Dieu vous gardes et vous protèges tous.

A tous mes chers amis

A tous les enseignants durant tout le cursus.

Résumé

Depuis les temps anciens, les plantes ont été utilisées pour les soins du corps et la prévention des maladies en raison de leurs propriétés curatives. De nos jours, les plantes sont devenues une véritable source de médicaments, de compléments alimentaires et de produits cosmétiques. Leurs utilisations sont constamment développées et leur champ d'application est élargi.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la grenade (*Punica granatum L*), dans le but de déterminer l'effet de ses composés et d'évaluer leurs activités antibactériennes contre des espèces multirésistantes d'*Enterococcus* (*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*) isolées du système digestif des volailles.

Nous avons testé deux espèces et étudié leur sensibilité à l'extrait de l'écorce de grenade en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Nos résultats ont montré que l'espèce intestinale *E. faecium* était sensible à l'extrait éthanolique et à l'extrait méthanolique, avec des diamètres d'inhibition respectifs de 13,5 mm et 13 mm. De plus, l'espèce *E. faecalis* était très sensible aux deux extraits, avec des diamètres d'inhibition de 21,5 mm et 21 mm.

Mots clé : la grenade, antibactériennes, multirésistantes, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

ملخص

منذ العصور القديمة، تم استخدام النباتات للعناية بالجسم والوقاية من الأمراض، بفضل الخصائص العلاجية التي تحتوي عليها. وفي الوقت الحاضر، أصبحت النباتات مصدرًا حقيقيًا لصناعة الأدوية والمكملات الغذائية ومنتجات التجميل. ويتم تطوير استخداماتها وتوسيع نطاق استفادتنا منها بشكل مستمر.

في هذه المذكرة كان الاهتمام بالرمان حيث كان هدفنا هو تحديد تأثير جزيئات الرمان (Punica granatum L) وتقييم أنشطتها المضادة للبكتيريا ضد سلالات متعددة المقاومة من المكورات المعوية (Enterococcus faecium et Enterococcus faecalis) المعزولة من الجهاز الهضمي للدواجن.

حيث قمنا باختبار مجموعة من هذه السلالات ودراسة حساسيتها ضد مستخلص قشور الرمان باستخدام طريقة نشر على الاجار، توصلنا الى ان السلالة المعوية (E. faecium) حساسة للمستخلص الإيثانولي والمستخلص الميثانولي بأقطار تثبيط 13.5 مم و13 مم على التوالي، والسلالة المعوية (E. faecalis) حساسة للغاية لكلا المستخلصين بأقطار تثبيط 21.5 مم و21 مم .

الكلمات المفتاحية: الرمان، مضاد للبكتيريا، متعدد المقاومة، المكورات المعوية، بكتيريا

Abstract

Since ancient times, plants used for body care and disease prevention due to their healing properties. Nowadays, plants have become a real source of medicines, food supplements, and cosmetic products. Their uses are constantly being developed, and their scope of application is being expanded.

In this study, we were particularly interested in pomegranate (*Punica granatum* L), with the aim of determining the effect of its compounds and evaluating their antibacterial activities against multiresistant strains of *Enterococcus* (*Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*) isolated from the digestive system of poultry.

We tested two strains and studied their sensitivity to pomegranate peel extract using the agar diffusion method. Our results showed that the intestinal strain *E. faecium* was sensitive to the ethanolic extract and to the methanolic extract, with respective inhibition diameters of 13.5 mm and 13 mm. Moreover, the *E. faecalis* strain was very sensitive to both extracts, with inhibition diameters of 21.5 mm and 21 mm.

Key words: pomegranate, antibacterial, multiresistant, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

Liste des figures

	Titre des figures	Page
Figure 1 :	Arbre du grenadier (<i>Punica granatum</i> L)	2
Figure 2 :	Feuilles et fruit de <i>Punica granatum</i> L	2
Figure 3 :	Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov	4
Figure 4 :	Les plus grands pays producteurs des grenades au monde	4
Figure 5 :	Nombre moyen de tumeurs cutanées chez des souris CD1, traitées ou non localement par de l'huile de graines de grenade, durant 20 semaines	9
Figure 6 :	Effets bénéfiques de peau de grenade et ses extraits	12
Figure 7 :	Différentes classes des composés phénoliques	15
Figure 8 :	Structures chimiques de l'acide gallique et ellagiques	15
Figure 9 :	Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque	16
Figure 10 :	Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques	17
Figure 11 :	squelette de base des flavonoïdes	18
Figure 12 :	tannin hydrolysable ou gallotannin	20
Figure 13 :	Structure des tanins condensés	21
Figure 14 :	Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite)	23
Figure 15 :	Principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques des entérocoques	28
Figure 16 :	Préparation du matériel végétal	30
Figure 17 :	Protocole expérimental de l'extraction des Polyphénols	31
Figure 18 :	Illustration de la méthode d'aromatogramme	32
Figure 19 :	Extraits de fruit de <i>Punica granatum</i> L	34
Figure 20 :	Aromatogramme d'une Souche d'entérocoque	34
Figure 21 :	Profil Chromatographique des extraits du fruit <i>Punica granatum</i> L	35
Figure 22 :	Aromatogramme d' <i>E. Faecium</i> après 24h d'incubation à 37°C	37
Figure 23 :	Aromatogramme d' <i>E. faecalis</i> après 24h d'incubation à 37°C	38

Liste des tableaux

	Titre du tableau	Page
Tableau 01 :	Comparaison entre le jus de grenade et le jus d'autres fruits : concentration en polyphénols et activité antioxydante	7
Tableau 02 :	Principaux constituants des différentes parties du grenadier	13
Tableau 03 :	Principales classes de flavonoïdes et leurs Structure	18
Tableau 04 :	Caractéristiques et origine des espèces bactériennes cibles	32
Tableau 05 :	Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit Punica granatum L	36
Tableau 06 :	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des extraits du fruit de Punica granatum L	38

Liste des abréviations

<i>E .faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E .faecium</i>	: <i>Enterococcus faecium</i>
APGI	: Accord de Paris sur la Gestion de l'Information et des Indications Géographiques
LDL	: Lipoprotéine de basse densité
HDL	: Lipoprotéine de haute densité
CuSo4	: Sulfate de cuivre
TNFα	: Facteur de nécrose tumorale alpha
MRSA	: Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
UVA	: Ultraviolet A
UVB	: Ultraviolet B
ARN	: Acide Ribonucléique
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
EGCG	: Gallate d'épigallocatechine
NaCl	: Chlorure de Sodium
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PLP	: Protéine de liaison à la pénicilline
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
VAN	: Vancomycine

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur *Punica granatum L*

1. Caractéristique botanique :.....2

2. Classification :.....3

3. Répartition géographique :.....4

4. Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L*:.....5

4.1. Activité antibactérienne :.....5

4.2. Activité antioxydante:.....6

4.3. Activité anti-inflammatoires:.....8

4.4. Activité anticancéreuse:.....8

4.5. Activité antidiabétique :.....10

4.6. Activité antiulcéreuse:.....10

4.7. Action cicatrisante :11

4.8. Autres propriétés :.....11

5. Composition chimique du fruit de *Punica granatum L*:.....12

Chapitre 2 : Les composés phénoliques

1. Généralités :.....14

2. Structure et catégories des composés phénoliques:.....14

2.1. Polyphénols simples :.....15

2.1.1. Acides phénoliques :.....15

2.1.2. Les flavonoïdes :.....17

2.1.3. Alcools phénoliques :.....18

2.2. Polyphénols complexes (tannins) :.....	19
3. Rôles et intérêts des composés phénoliques:.....	21

Chapitre 3 : Les entérocoques et l'antibiorésistance

1. Généralités sur les entérocoques:.....	22
2. Multirésistance des entérocoques aux antibiotiques:.....	24

Partie expérimentale

1. Problématique:.....	29
2. Objectifs:.....	29
3. Matériel et méthodes:.....	29
4. Résultats et discussion:.....	34
Conclusion et perspectives.....	39

Références bibliographiques

Introduction

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a été une avancée révolutionnaire dans le domaine des soins de santé, car leur utilisation a contribué à réduire les taux de mortalité et de maladie à travers le monde pendant une longue période. Cependant, l'abus et l'utilisation excessive de ces agents antimicrobiens ont entraîné l'apparition de certaines formes de résistance chez les souches microbiennes, ce qui compromet l'efficacité des antibiotiques.

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial grave qui a stimulé la recherche de nouvelles biomolécules dotées d'une activité antibactérienne étendue. Les plantes et leurs dérivés, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes, sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle. Ces végétaux renferment une multitude de métabolites secondaires qui ont la capacité d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries.

L'objectif de cette recherche consiste à étudier les propriétés antibactériennes des extraits du fruit de *Punica granatum* L envers des espèces d'entérocoques multirésistants d'origine aviaire, tout en analysant leur composition chimique. Le but est de valoriser ces extraits en tant qu'alternatives potentielles aux antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes résistantes.

La première partie de cette étude consiste en une revue bibliographique sur la plante étudiée, à savoir le grenadier. Cette revue fournira une description détaillée de la plante ainsi que des informations sur sa répartition géographique à travers le monde et ses utilisations. Le deuxième chapitre se concentrera sur les composés phénoliques présents dans cette plante, tandis que le troisième chapitre abordera les entérocoques et l'antibiorésistance.

La deuxième partie de ce manuscrit abordera la méthodologie utilisée, incluant la méthode d'extraction ainsi que l'analyse de la composition chimique des extraits du fruit de *Punica granatum* L. De plus, l'activité antibactérienne de ces extraits sera étudiée à l'aide de la méthode de l'aromatogramme. Enfin, les résultats obtenus seront présentés dans le dernier chapitre, accompagnés de leur discussion approfondie.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1:

Généralités sur *Punica granatum* L

1. Caractéristique botanique :

Petit arbre ou arbuste à feuilles caduques dans les régions désertiques arides et Semi-caduques dans les régions littorales, La hauteur de l'arbre est généralement de 4 à 5 mètres et si possible beaucoup plus élevée, caducifolié à branches nombreuses et minces, ascendantes, parfois érigées aux rameaux souvent épineux. Les feuilles ont un pétiole très court et sont entières, opposées, oblongues- elliptiques lisses et brillantes [1]



Figure 01 : Arbre du grenadier (*Punica granatum* L)



Figure 02 : Feuilles et fruit de *Punica granatum* L

2. Classification :

Au XVIème siècle, les premières classifications « scientifiques » apparaissent. Elles utilisent, comme critères de classification, l'habitat des végétaux ainsi que certains caractères végétatifs et morphologiques des plantes.

Au XVIIIème siècle, Carl von Linné (1707-1778), considéré comme le père de la taxonomie, invente une classification basée sur les différences des organes sexuels : 24 classes réparties selon le nombre de styles et selon le nombre, l'assemblage et la longueur des étamines. Cette classification, qualifiée d'artificielle, car basée sur un nombre restreint et arbitraire de critères, fut néanmoins utilisée comme référence pendant plusieurs centaines d'années et elle est d'ailleurs aujourd'hui encore très largement employée. [2]

Le grenadier, *Punica granatum*, fut décrit par Linné et incorporé à sa classification en 1753 :

❖ Embranchement :	Spermaphytes
❖ Sous-embranchement :	Angiospermes
❖ Classe :	Magnoliopsida
❖ Ordre :	Myrtales
❖ Famille :	Punicaceae
❖ Genre :	<i>Punica</i>
❖ Espèce :	<i>Punica granatum</i>

Cette classification a été revue en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique de l'APGII, qui inclut 457 familles dans 45 ordres[3].

Au sein de cette classification, la situation du grenadier est :

❖ Clade :	Angiospermes
❖ Clade :	Dicotylédones vraies
❖ Clade :	Rosidées
❖ Ordre :	Myrtales
❖ Famille :	Lythraceae
❖ Genre :	<i>Punica</i>
❖ Espèce :	<i>Punica granatum</i>

3. Répartition géographique

La Perse, le Moyen-Orient et les Himalayas du nord de l'Inde abritent des grenadiers
 On le retrouve aussi dans le bassin méditerranéen, il est cultivé depuis un certain temps en Iran, en Irak, en Asie centrale, en Inde, en Chine et en Malaisie, ainsi qu'en Égypte, en Arabie saoudite et en Europe du Sud

On le trouve également en Amérique exactement en Californie et en Arizona, où il a été introduit par les colonisateurs espagnols en 1769. (4)

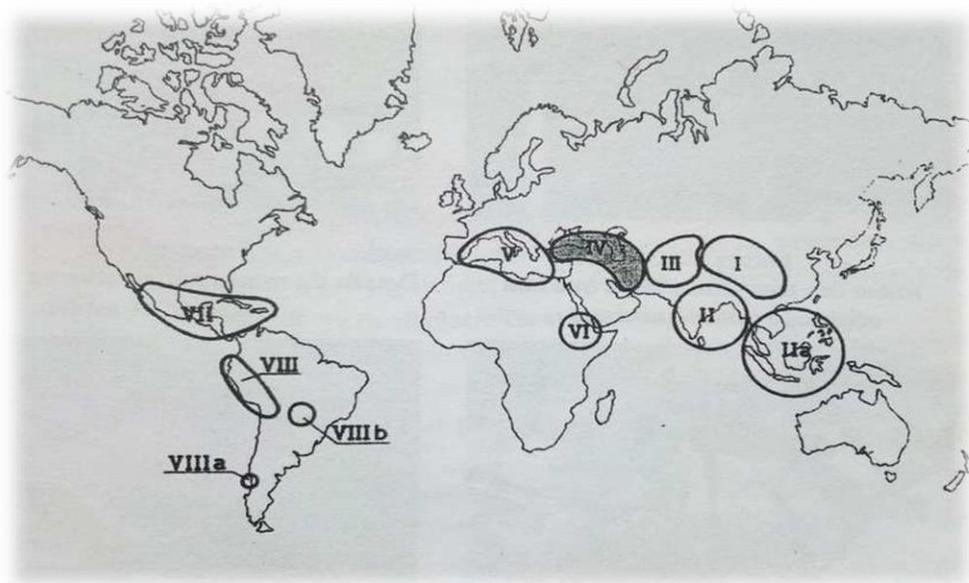


Figure 03 : Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov (Sanchez-Monge, 1974)

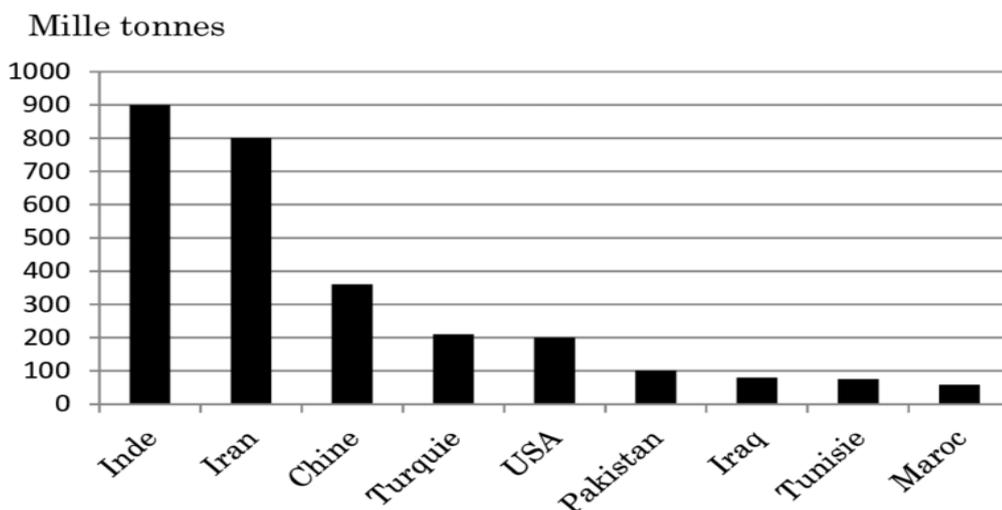


Figure 04 : Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo and Valero,2012)

4. Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L* :

Depuis quelques années, les extraits de peau de grenade ont été étudiés à l'échelle de *Punica granatum L* Large en raison de ses bienfaits thérapeutiques.

Parmi les nombreux avantages que ces extraits offrent à la santé de l'organisme, nous pouvons mentionner les potentiels biologiques qui se sont avérés importants dans les études présentées, notamment le pouvoir anti-inflammatoire, le pouvoir antioxydant, le pouvoir antibactérien, pouvoir anticancéreux, pouvoir antifongique, pouvoir antiviral et surtout anti-maladie cardiaque et diabète. En plus d'autres fonctions, il n'est pas moins important, mais l'étude moderne tels que la puissance anti-algal et antirétroviral parasites. Dans cette partie, nous examinons les principaux résultats.

4.1. Activité antibactérienne :

Dans de nombreuses études récentes, la grenade *Punica granatum L* a montré des avantages pour la santé grâce à sa teneur riche en composés chimiques bioactifs (5).

Les souches bactériennes testées par (Mohamed Taha Yassin et al 2021) ont montré une sensibilité variable aux extraits de solvants organiques pour les croûtes de grenade, l'extrait de méthanol des croûtes de grenade a très efficacement inhibé la croissance de chacune des souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella Typhimunium* qui enregistrait des zones d'inhibition (23.7mm , 21.8mm , 14.7mm) [6] respectivement . Les résultats de cette étude étaient cohérents avec les résultats de (naciri et al 2012) qui ont rapporté que *Staphylococcus aureus* est la souche bactérienne la plus sensible à l'extrait méthanolique de pelures de grenade. [7]

Certaines études (Dahham et al 2010) ont rapporté la survenue d'une activité antibactérienne des extraits d'écorces de grenade, à travers lesquelles elles ont prouvé que les bactéries Gram-positives sont plus sensibles à l'extrait méthanolique d'écorces de grenade [8]

ce qui est cohérent avec l'étude (Rosas Burgos 2009) qui a également montré que les bactéries sont Gram positives avec une sensibilité plus élevée que les bactéries Gram négatives [9]

L'activité antibactérienne de *Punica granatum L* peut être liée à la structure des polyphénols car ils peuvent affecter la paroi cellulaire bactérienne [10], Ils réagit également avec les protéines de la membrane cellulaire bactérienne et le groupe de protéines Sulphydryle conduisant au dépôt de protéines membranaires et à la limitation

des enzymes telles que les glycosyl transférases et, enfin, l'induction de la mort cellulaire par des agents oxydants. [11]

Enfin, en raison des diverses maladies causées par les types de bactéries qui présentent une résistance féroce aux antibiotiques, l'effet de la grenade aigre-douce et l'extrait de grenade ont été étudiés pour la maladie antibactérienne anti-Escherichia coli chez les vaches. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait de peau de grenade a réussi à traiter les bactéries Escherichia coli isolées du lait de vache avec une inflammation de l'utérus que de nombreux types d'antibiotiques artificiels n'ont pas été en mesure d'éliminer [12], 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 :

Beaucoup de doutes ont été exprimés quant à l'innocuité des antioxydants industriels qui sont cancérigènes ou qui ont des effets toxiques[13]. L'attention s'est donc portée sur les antioxydants naturels de sources végétales naturelles comme les céréales, l'huile de graines, les croûtes de fruits..., où les croûtes de grenade ont été utilisées parce qu'elles sont une bonne source de composés phénoliques et d'antioxydants qui jouent un rôle important dans la réduction du risque de diverses maladies telles que les maladies cardiaques et les vaisseaux sanguins et la prévention de l'athérosclérose.

Plusieurs études ont porté sur la puissance antioxydante de divers extraits de croûtes de grenade, où l'extrait de grenade a été sélectionné comme le meilleur extrait antioxydant de six extraits de plantes, y compris les pommes, Nerium oleander L, croûtes de noix, Tamarix aphylla, Ziziphus spina-christi, ainsi que la grenade [14]

Pour être sûr, les deux chercheurs (ElHadary et Ramadan 2009) recherché les propriétés antioxydantes trouvées dans l'extrait d'hydrométhanol de peau de grenade au cours d'une étude in vitro dont les résultats ont montré que l'extrait a une activité antioxydante très forte, en raison de l'effet synergique des ingrédients phénoliques présents dans l'extrait qui balayent l'oxygène réactif, Ce balayage permet également la réduction de l'excès de sucre et la réduction du sucre Hyperlipidémie [15]

Une autre étude dans laquelle des extraits de plantes ont été tamisés en termes de pouvoir antioxydant de différents types de plantes, a établi que le pouvoir antioxydant montre une variabilité marquée et était le rapport d'inhibition le plus élevé de l'extrait de croûte de

grenade, en raison de sa teneur élevée en phénols, flavonoïdes [16]. les phénols agissent comme antioxydants parce qu'ils ont désactivé les propriétés des radicaux libres, c'est-à-dire agissent comme réducteur d'oxygène ou donneur. [17]

En plus des ellagitanins, qui sont l'un des composés phénoliques les plus abondants dans la croûte, nous trouvons Punicalagin, l'un des principaux contenus de 75,65% des composés phénoliques totaux des croûtes de grenade. En plus de Punicalagin, punicallin et l'acide ellagique sont naturellement présents dans les croûtes de grenade et ont une gamme d'activités biologiques. Tous présentent une forte efficacité antioxydante qui varie relativement selon les types de radicaux libres.

Il a été démontré que l'acide ellagique est plus efficace que punicallin et punicalagin dans la protection contre les dommages d'oxydation dans le corps (in vivo) en particulier contre les maladies intestinales [18]

Dans une étude comparative entre l'extrait d'écorce et l'extrait de pulpe de la même espèce *Punica granatum L*, il a été constaté que l'extrait d'écorce a une activité antioxydante beaucoup plus élevée que l'extrait de pulpe en piégeant (activités de piégeage des radicaux libres) l'ion superoxyde O_2^- , les radicaux hydroxyle OH^- et peroxyde ROO^- ainsi que l'inhibition des LDL causée par l'oxydation du $CuSO_4$ [19]

Les résultats obtenus de ces études corroborent ce à quoi (akroum et al. 2009) ont fait référence dans une étude portant sur 22 espèces de plantes algériennes, dans laquelle l'étude a distingué les extracteurs de pelures de grenade et de feuilles de thé vert en leur donnant un pouvoir antioxydant élevé [20].

Tableau 01 : Comparaison entre le jus de grenade et le jus d'autres fruits : concentration en polyphénols et activité antioxydante. [21]

Jus de fruit concentré	Concentration en polyphénols (mmol/L) (1)	Concentration minimale inhibant 50% d'oxydation des LDL (μ L/mL) (2)	Capacité à bloquer les radicaux libres (% de réduction) (3)
Grenade (Pomegranate)	5,0	0,06	95
Prune rouge (Red plum)	4,5	0,11	80
Grappe de raisin (Grape)	3,3	0,70	47
Canneberge (Cranberry)	2,5	1,00	47
Kiwi (Kiwi)	2,2	0,33	70
Orange (Orange)	1,6	1,60	11
Pamplemousse (Grapefruit)	1,5	1,40	16
Pomme (Apple)	1,4	1,20	55
Ananas (Pineapple)	1,1	1,00	27
Poire (Pear)	1,1	7,50	5
Pêche (Peach)	1,0	2,25	30

4.3. Activité anti-inflammatoires :

Des expériences ont montré que les troubles inflammatoires résultent de la production excessive de milieux inflammatoires tels que le facteur TNF α , les interleukines (IL-1, IL-6 et

IL-8), l'activité des cellules inflammatoires et la production excessive d'espèces réactives d'oxygène (ROS). L'extrait d'eau de la peau de grenade est donc largement utilisé pour traiter les troubles inflammatoires et les ulcères[22]

Une étude scientifique récente a révélé que les croûtes de grenade combattent l'inflammation locale causée par un type de bactérie résistante à certains antibiotiques, ce qui peut contribuer à trouver de nouveaux traitements pour ce type d'inflammation

Des chercheurs de la British University of Kingston ont réussi à faire référence au rôle des croûtes de grenade dans la lutte contre les infections topiques, causées par la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à l'antiméthylcilline (Méthicilline), connue sous le nom de (MRSA). Selon les résultats de l'étude publiée par le British Journal of Biomedical Science, la composition topique préparée à partir de croûtes de grenade et de sels minéraux a réussi à combattre les infections topiques causées par la méthicilline-bactéries résistantes isolées chez les patients hospitalisés [23]

4.4. Activité anticancéreuse :

Les plantes alimentaires telles que la grenade sont une source de composés bio-actifs naturels avec une activité anticancéreuse. [24]

En raison de l'incidence élevée du cancer de la thyroïde et de l'inefficacité des méthodes thérapeutiques utilisées, d'autres méthodes ont été essayées, y compris la valorisation de l'extrait d'écorce de grenade en matière de son activité anticancer de la thyroïde. Les résultats de cette étude ont été que l'extrait de peau de grenade a supprimé la propagation de deux types de cellules cancéreuses car il inhibe la mort programmée des cellules cancéreuses thyroïdiennes en réduisant l'activité de la membrane mitochondriale et en affaiblissant considérablement la migration des cellules thyroïdiennes cancérogènes ainsi que l'invasion en exprimant la matrice (Métalloprotéinase9) qui est une classe d'enzymes appartenant à la famille des protéines minérales responsables du remodelage des endopeptidases dont les résultats indiquent qu'il pourrait s'agir d'un extrait d'écorce de grenade sont un agent chimique efficace[25]

Parmi les études qui prouvent l'importance thérapeutique de l'extrait d'écorce de grenade. La cytotoxicité de l'extrait de lignane a été étudiée sur des cellules cancéreuses de la prostate, des cellules cancéreuses de l'ovaire, des cellules de carcinome pulmonaire et enfin des cellules d'adénocarcinome mammaire. Les résultats ont été que l'extrait réduisait la viabilité des cellules cancéreuses étudiées à moins de 42 %, même à petites doses, dans tous les types de cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses du sein étaient plus réactives et les cellules cancéreuses de l'ovaire moins réactives. On peut dire que l'extrait de grenade a exercé un effet efficace de prolifération des cellules anticancéreuses[26]

l'écorce de grenade contient plusieurs composés tels que l'acide ellagique, l'acide caféique, la lutéoline, et l'acide punicique, utilisés ensemble dans des proportions équivalentes, possèdent une synergie d'action pour lutter contre la prolifération de certaines cellules du cancer de la prostate. [27]

Dans une autre étude, des expériences ont été menées sur des souris in vitro , où le nombre de tumeurs par souris a été compté, après 20 semaines d'expériences, le nombre moyen de tumeurs chez les souris non traitées avec de l'huile de grenade est de 20,8, tandis que 16,3 chez les souris traitées à l'huile de grenade, comme le montre le graphique ci-dessous :

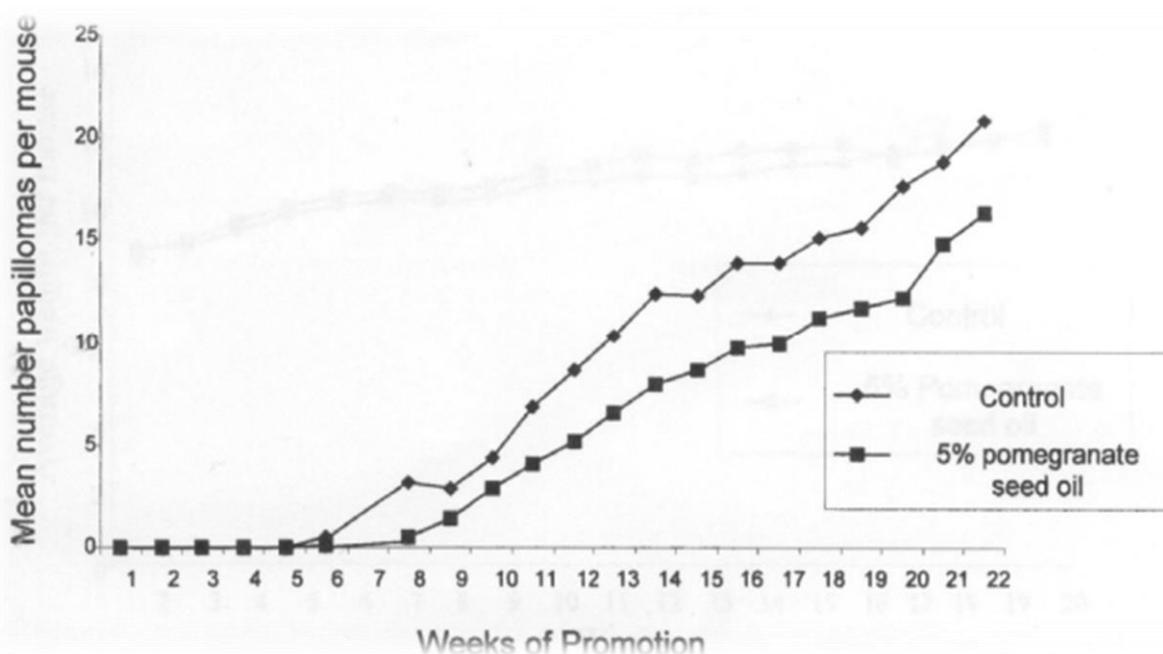


Figure 05 : Nombre moyen de tumeurs cutanées chez des souris CD1, traitées ou non localement par de l'huile de graines de grenade, durant 20 semaines. [28]

L'extrait de peau de grenade s'est également prouvé efficace pour réduire le risque de cancer de la peau en inhibant la prolifération des mélanocytes et la synthèse de mélanines dans les cellules cancéreuses. Les études ont montré que le composé elagitanine trouvé dans l'extrait a la capacité d'inhiber la production de radicaux libres dans la peau humaine exposée aux rayons UVB et UVA, protégeant ainsi contre la fragmentation de l'ADN, les brûlures cutanées et la dépigmentation. [29]

4.5. Activité antidiabétique

Les résultats d'une étude menée par des chercheurs australiens se sont avérés positifs, l'apport oral d'extraits méthanoliques de fleurs de *Punica granatum* pendant six semaines à 500 mg/kg par jour faisant baisser le taux de glycémie chez les souris diabétiques de type 2. Par conséquent, la fleur de grenade semble avoir de véritables propriétés hypoglycémiantes [30].

(Saad et al 2015) ils ont également testé les effets protecteurs de l'extrait d'écorce de grenade sur le foie et le pancréas de rats diabétiques, où les résultats ont montré la restauration des îlots de Langerhans à leur taille normale et la restauration et le renouvellement des cellules bêta au niveau du pancréas [31].

La consommation de concentré de jus de grenade semble avoir un impact positif sur la régulation du métabolisme du cholestérol total. Une étude a révélé qu'un groupe de 22 patients diabétiques atteints de troubles du métabolisme des lipides et d'hypercholestérolémie, qui ont consommé 30 ml de concentré de jus de grenade par jour pendant 8 semaines, a constaté une diminution significative du cholestérol LDL et du cholestérol total. Les taux de triglycérides et de cholestérol HDL n'ont pas subi de modifications. [32]

4.6. Activité antiulcéreuse

D'après certaines études scientifiques, l'effet anti-ulcère de *pinica granatum L* a été associé à une augmentation de la sécrétion croissante de mucus par la paroi de l'estomac. Cet effet peut empêcher la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène et réduire la consommation de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase. De plus, il peut maintenir la teneur en oxyde nitrique à son niveau normal. [33]

Des études *in vivo* ont montré que l'écorce de grenade possède des propriétés antioxydantes qui lui confèrent une activité inhibitrice contre les ulcères gastriques induits

par l'aspirine et l'éthanol. L'effet du extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol/vol.) a été étudié à des doses de 250 et 500 mg/kg, montrant des taux d'inhibition respectifs de 22,37% et 74,21% pour les ulcères causés par l'aspirine, et 21,95% et 63,41% pour les ulcères causés par l'éthanol. [34]

4.7. Action cicatrisante :

Une équipe de chercheurs indiens a mené une étude pour évaluer l'effet des extraits méthanoliques de la peau de grenade sur la cicatrisation des plaies chez des souris. Des gels aquatiques contenant 2,5 % et 5 % d'extraits méthanoliques de la peau de grenade ont été fabriqués dans ce but. Des examens ont été réalisés pour surveiller l'évolution de la lésion, mesurer le taux d'hydroxyproline des tissus endommagés et analyser les changements microscopiques des tissus. Les résultats ont montré que le groupe de souris traité avec le gel de grenade à 5 % guérissait en 10 jours, alors que celui traité avec le gel à 2,5 % guérissait en 12 jours. En revanche, le groupe témoin traité uniquement avec le gel nécessitait une cicatrisation de 16 à 18 jours.

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que l'extrait de peau de grenade possède des propriétés thérapeutiques bénéfiques pour la cicatrisation des blessures cutanées. Les analyses par HPLC ont révélé que la catéchine et l'acide gallique sont les principaux constituants de cet extrait, ce qui en fait des molécules potentiellement intéressantes à explorer dans le développement de thérapies dermatologiques. [35]

4.8. Autres propriétés :

Une étude a été menée pour évaluer l'effet de l'extrait de peau de grenade sur la relaxation dépendante de l'endothélium de l'artère coronaire chez des souris souffrant d'hypertension artérielle. Les résultats ont montré une augmentation de la relaxation de l'artère coronaire chez les souris traitées avec l'extrait, ainsi qu'une diminution des niveaux de nitrite plasmatique. [36]

Les études ont clairement démontré que la grenade était une option naturelle pour le traitement chimiothérapeutique en raison de son efficacité dans le traitement des maladies chroniques. En effet, elle est considérée bénéfique pour la prévention des maladies cardiaques, des maladies vasculaires et de l'athérosclérose. [37]

Certaines études ont montré que l'extrait de peau de grenade possède des propriétés antiparasitaires et antihelminthiques. [38]

Une autre étude ait montré l'efficacité de l'extrait de croûte de grenade contre la coccidiose in vivo, en particulier contre *Eimeria papillata*. Les résultats ont montré que l'utilisation de l'extrait de croûte de grenade a conduit à une diminution significative du nombre d'œufs de parasites dans les selles de souris infectées. De plus, il a été constaté que les peaux de grenade réduisent le développement des parasites dans le tractus intestinal avant la formation d'œufs relativement inertes, tout en améliorant le nouveau tissu causé par les papilles E. [39]

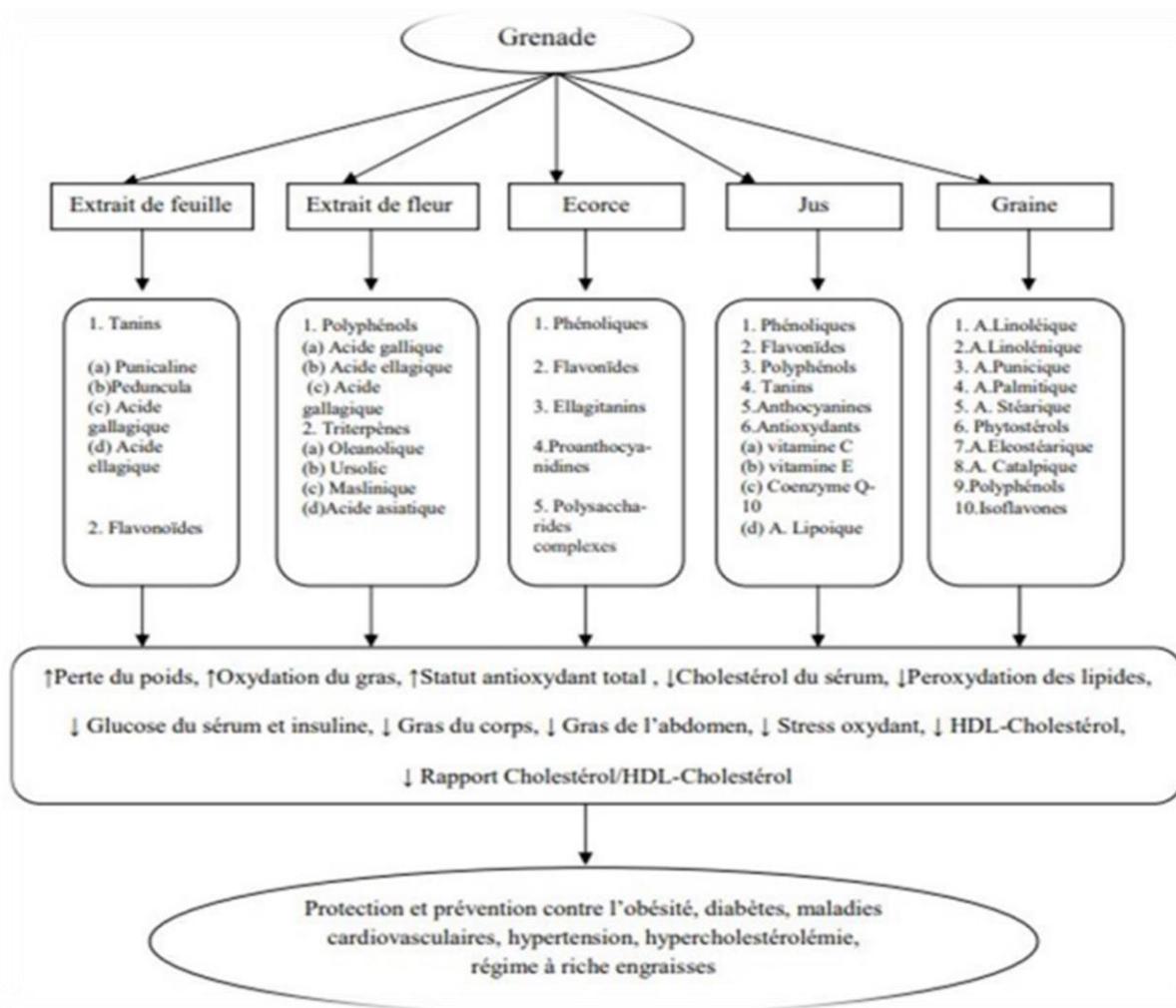


Figure 06: Effets bénéfiques de peau de grenade et ses extraits.[48]

5. Composition chimique du fruit de *Punica granatum L*

La recherche sur les composants bioactifs de la grenade et leurs bienfaits pour la santé humaine est un domaine de recherche très pertinent et d'un grand intérêt. De nombreuses études scientifiques ont révélé que la grenade et ses dérivés contiennent une multitude de

composants qui peuvent être bénéfiques pour prévenir certaines maladies et maintenir une bonne santé.[40]

Grâce aux techniques de chromatographie, de résonance magnétique et de spectrométrie de masse, la composition des différents organes du grenadier a pu être identifiée avec précision[41].Le grenadier contient une grande quantité de phytoconstituants qui se répartissent dans ses différentes parties, notamment les fruits, les graines, les feuilles, les fleurs, les racines, les jus et les écorces de fruits. Le tableau présente un récapitulatif des principaux composés thérapeutiques présents dans le grenadier.

Tableau 02: Principaux constituants des différentes parties du grenadier (Jurenka, 2008).

Partie du grenadier	Constituants
Jus de fruit	Anthocyanines, glucose, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, catéchines, EGCG, quercétine, rutine, nombreux minéraux, acides aminés.
Huile de graine	95% acide punique, acide helladique et autre acides gras, stérols.
Péricarpe (écorce et zeste) de fruit	Punicalagins phénoliques, acide gallique et autres acides gras, catéchine, EGCG, quercétine, rutine, et autres flavonoles, flavones, flavonones, anthocyanidines.
Feuilles	Tanins (punicalin et punicafolin) et flavones glycosides (lutéoléine et apigénine).
Fleurs	Acide gallique, acide ursolique, triterpénoïdes.
Racines et écorce	Ellagitannins (punicalins et punicalagins), nombreux alcaloïdes.

Chapitre 2 :

Les composés phénoliques

1. Généralités :

Les plantes produisent des composés phénoliques en tant que métabolites secondaires, qui leur permettent de se défendre contre les agressions de leur environnement. En réalité, les molécules phénoliques remplissent de nombreuses fonctions dans les plantes. Elles contribuent à la résistance de la plante contre les organismes pathogènes, améliorent la tolérance des plantes aux différents stress et agissent comme des signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie) ainsi qu'entre les plantes et leurs symbiotes. [42]

Les composés phénoliques naturels présentent une grande diversité de structures allant des molécules simples telles que les acides phénoliques, jusqu'aux molécules hautement polymérisées comme les tanins condensés [42], ils comprennent une grande variété de familles, parmi lesquelles on peut citer les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes, les lignines ainsi que les xanthones. [43]

2. Structure et catégories des composés phénoliques :

Les composés phénoliques rassemblent un large éventail de substances chimiques contenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, ainsi que d'autres constituants. Les polyphénols naturels présentent une gamme de structures allant des molécules simples, telles que les acides phénoliques, jusqu'aux composés hautement polymérisés tels que les tanins. se répartissent en diverses catégories, notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou les phytostanols. Parmi celles-ci, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont les plus prédominants. [44]

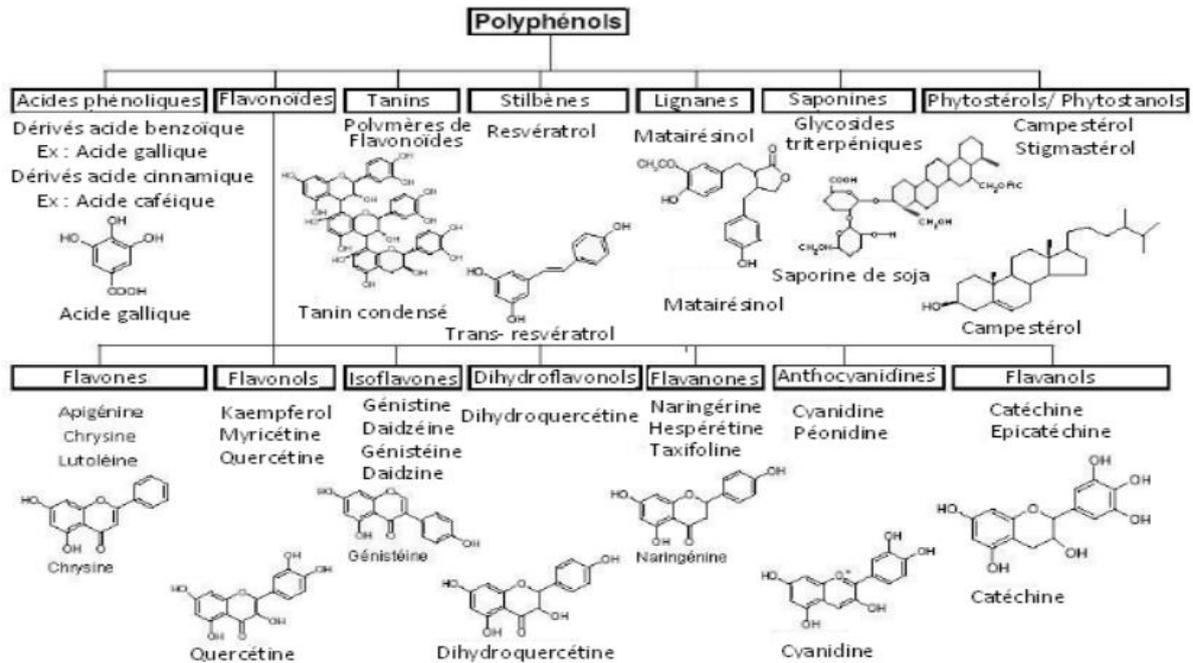


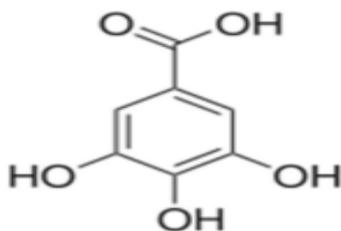
Figure 07: Différentes classes des composés phénoliques.

2.1. Polyphénols simples :

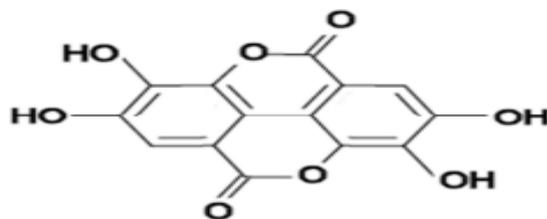
2.1.1. Acides phénoliques :

Les acides phénoliques constituent les formes les plus simples des composés phénoliques et sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone, principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique[45].

✚ Structure :



Acide gallique



Acide ellagique

Figure 08: Structures chimiques de l'acide gallique et ellagiques

Ils se divisent en deux classes : ceux qui sont dérivés de l'acide benzoïque, qui ont une structure (C6-C3 où C6-C1), et ceux qui sont dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) [46].

2.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques :

En règle générale, les végétaux comestibles contiennent une faible concentration d'acide hydroxybenzoïque. Cependant, les dérivés de ce composé sont assez rares dans l'alimentation humaine. En revanche, les dérivés d'acides hydroxycinnamiques sont abondamment présents.[47]

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque contenant un groupe hydroxyle (-OH) lié à un noyau benzénique. Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques[49].

✚ Structure :

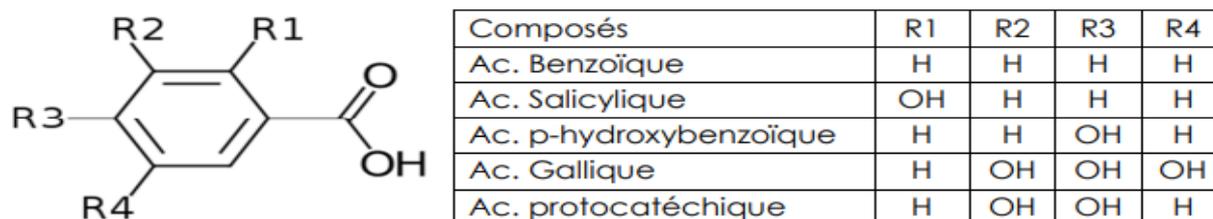
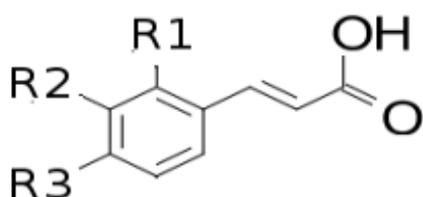


Figure 09: Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque [49].

2.1.1.2. Les acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques sont une famille de composés organiques dérivés de l'acide cinnamique, présentant une structure de base en C6-C3. Parmi eux, on retrouve les acides p-coumarique, o-coumarique, caféique et cinnamique qui sont les plus fréquents. Ces composés sont abondamment présents dans les plantes et les aliments d'origine végétale, où ils ont des propriétés antioxydantes et offrent des bienfaits pour la santé humaine. [50]

✚ Structure :



Composés	R1	R2	R3
Ac. Cinnamique	H	H	H
Ac. o-coumarique	OH	H	H
Ac. p-coumarique	H	H	OH
Ac. Caféique	H	OH	OH

Figure 10 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques[50]

2.1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent une catégorie de substances chimiques produites par les plantes, appelées métabolites secondaires. Ils sont omniprésents dans le monde végétal et agissent comme pigments naturels, contribuant à la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavonoïdes sont souvent présents dans les cellules végétales sous forme de hétérosides dissous dans les vacuoles, ou sous forme de constituants de plastes particuliers appelés chromoplastes. [49]

Les flavonoïdes sont une famille étendue de composés naturels polyphénoliques, regroupant une gamme variée de molécules. On estime qu'il existe près de 6500 flavonoïdes différents, classés en 12 catégories distinctes[51]. Ils sont caractérisés par différentes structures chimiques, parmi lesquelles on peut citer les flavones, les flavanones, les flavonols, les flavanes, les flavanonols, les flavylum, les flavan-3-ols, les chalcones, les aurones, les isoflavones, les isoflavanes, les isoflavonols, les pterocarpanes, les coumaronochromones, les 3-arylcoumarines, les roténoïdes et les coumestanes.

✚ Structure et classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en 6 familles, qui comprennent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols. Ils se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central est ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C6 (A et B), reliés par une chaîne à 3 carbones formant ainsi l'hétérocycle (C) [52]

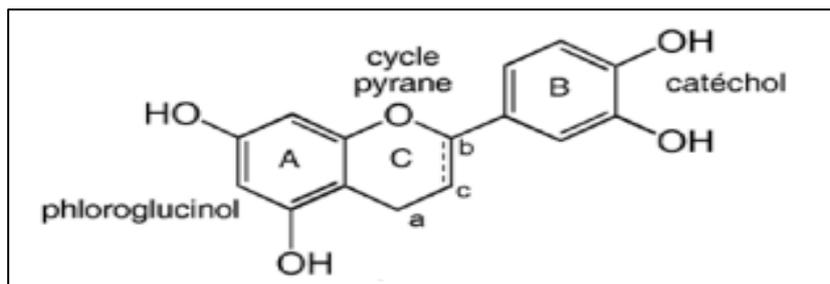


Figure 11 : squelette de base des flavonoïdes. [53]

Tableau 03 : Principales classes de flavonoïdes et leurs Structure [54] :

Classe	Structure chimique
les flavonols et les flavones	<p>R= H, flavone R= OH, flavonol</p>
les flavanes et les flavanols	<p>R= H, flavane R= OH, flavanol</p>
Les isoflavones	<p>Isoflavone</p>
les anthocyanines	

2.1.3. Alcools phénoliques :

Les alcools phénoliques appartiennent à une classe de composés organiques qui possèdent un groupe hydroxyle (-OH) lié à un cycle benzénique (phényle). Le cycle benzénique est constitué d'un anneau hexagonal composé de six atomes de carbone et de six atomes d'hydrogène, chaque atome de carbone étant lié à un atome d'hydrogène et à un autre atome de carbone par une liaison covalente. Il est à noter que les alcools phénoliques peuvent se présenter sous différentes formes en fonction des groupes fonctionnels qui sont liés au cycle benzénique. Leurs structures peuvent varier en fonction de leur degré de

Substitution ainsi que de la position du groupe hydroxyle (-OH) sur le cycle benzénique. Ci-dessous, vous trouverez quelques exemples d'alcools phénoliques et leurs formules moléculaires [55] :

- Phénol : C₆H₅OH
- Acide gallique : C₇H₆O₅
- Resvératrol : C₁₄H₁₂O₃
- Thymol : C₁₀H₁₄O
- EugénoL : C₁₀H₁₂O₂
- Catéchine : C₁₅H₁₄O₆
- Quercétine : C₁₅H₁₀O₇
- Tyrosol : C₈H₁₀O₂
- Hydroxytyrosol : C₈H₁₀O₃

2.2. Polyphénols complexes (tannins) :

Le terme "tanin" provient de la capacité de ces composés à transformer la peau animale en cuir par le processus de tannage. Les tanins sont une classe de polyphénols de haut poids moléculaire, qui se caractérisent par leur forte teneur en groupes hydroxyle. Lorsqu'ils sont associés à des glucides, des protéines ou des enzymes digestives, ils peuvent former des complexes insolubles, ce qui réduit la digestibilité des aliments. En outre, ils peuvent se lier à la cellulose et à divers éléments minéraux [56].

On distingue : les tanins hydrolysables et condensés.

➤ **les tanins hydrolysables :**

Ces tanins sont des molécules composées de dimères d'acide gallique liés à un dérivé glycosyle. Ils comprennent également des produits de condensation du dimère d'acide gallique, tels que l'acide hexahydroxydiphénique. Contrairement aux tanins condensés, ces tanins peuvent facilement subir une hydrolyse acide et basique. En effet, ils sont sensibles à l'action enzymatique et à l'eau chaude [57].

• **Structure :**

Les tanins hydrolysables sont composés d'un noyau central, le glucose, et de chaînes latérales contenant 1 à n monomères d'acide-phénol, situées en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose. Les noyaux peuvent être reliés par des liaisons carbone à carbone, appelées liaisons biphenyle, qui résultent d'un couplage oxydatif[49].

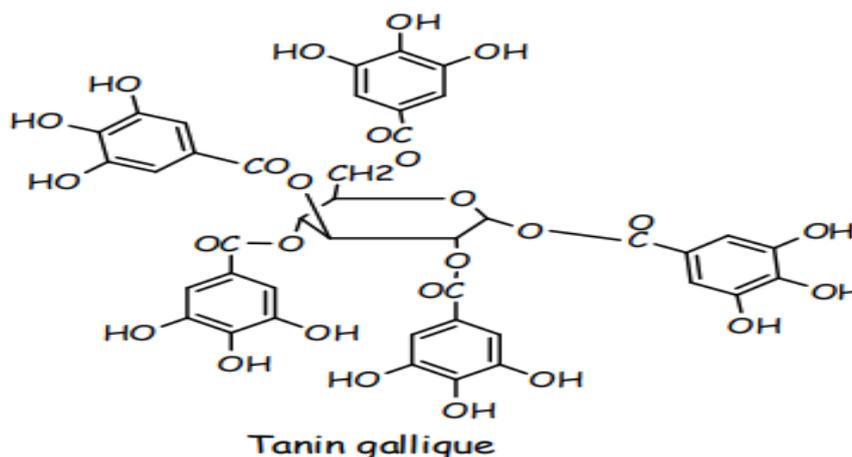


Figure 12 : tannin hydrolysable ou gallotanin [49].

➤ **Les tanins condensés :**

Les tanins condensés, également connus sous le nom de proanthocyanidines ou procyanidines, sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils sont produits par la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol, principalement liées par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, ce qui leur confère le nom de proanthocyanidines de type B. Si la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et une liaison éther supplémentaire entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont alors appelées de type A. Les tanins condensés sont présents dans de nombreux aliments, tels que le vin rouge, le thé, les fruits rouges et le chocolat noir [58].

- Structure :

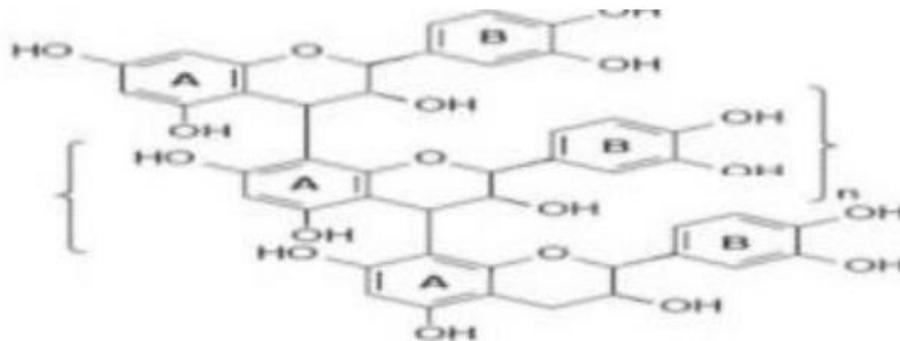


Figure 13 : Structure des tanins condensés [42].

3. Rôles et intérêts des composés phénoliques :

Les composés phénoliques, tels que l'acide gallique et ses dérivés, ont un large éventail d'applications dans différents domaines biologiques et pharmaceutiques [59]. Une étude récente a démontré que l'acide gallique, et ces dérivés sont largement utilisés pour le traitement de plusieurs maladies [60].

Chez les plantes, les tanins sont considérés comme la source d'énergie consommée par la plante dans le processus de conversion alimentaire, de sorte que leur quantité diminue avec leur épuisement lors du processus de maturation. Ce qui reste se transforme en acides qui donnent le goût acide. Les tanins sont des composés phénoliques désinfectants qui protègent les plantes contre les insectes et les champignons, préservant ainsi la vie de la plante et contribuant à la protection des pelures et des pulpes [61].

Chapitre 3 :

Les entérocoques et l'antibioresistance

1. Généralités sur les entérocoques :

1.1. Historique :

Le microbiologiste français FELIX THIERCELIN a utilisé pour la première fois le terme "entérocoque" en 1899 pour décrire un nouveau diplocoque à Gram positif qu'il avait isolé dans le tube digestif humain. Par la suite, en 1906, ANDREWES et HORDER ont proposé les noms "Streptococcus faecalis" et "Streptococcus faecium" pour désigner des streptocoques présentant des caractéristiques similaires à celles des entérocoques décrites par THIERCELIN et JOUHAUD. [62]

En 1984, afin de clarifier la confusion entourant ces espèces bactériennes, les résultats des techniques de chimio-taxonomie et de génétique moléculaire, tels que l'hybridation ADN-ADN et le séquençage des oligonucléotides de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique, ont confirmé que les espèces *S. faecalis* et *S. faecium* étaient distinctes des autres streptocoques. Ces découvertes ont conduit à la création du genre *Enterococcus*, le genre *Streptococcus* a été divisé en trois genres apparentés *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* [63].

Les connaissances relatives au genre *Enterococcus* augmentent avec le temps et le nombre d'espèces associées a augmenté avec plus de 30 espèces d'entérocoques différentes décrites en 2012. Jusqu'à présent, 57 espèces d'entérocoques différentes ont été identifiées [64].

1.2. Caractéristique bactériennes :

1.2.1. Caractères morphologiques :

Les *Enterococcus* sont des bactéries à Gram positif qui se présentent sous la forme de coques ovoïdes. Elles peuvent se trouver de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes. Il est fréquent de les observer sous une forme allongée dans la direction de la chaîne. Ils ont souvent tendance à former des amas en tétrades ou de courts éléments bacillaires, Les *Enterococcus* ont une apparence similaire au pneumocoque isolé ou en chaînette dans l'organisme. En culture en bouillon, ils présentent une ressemblance avec les streptocoques. Lorsqu'ils se présentent sous forme de diplocoques, les deux cocci sont de taille inégale. [67]

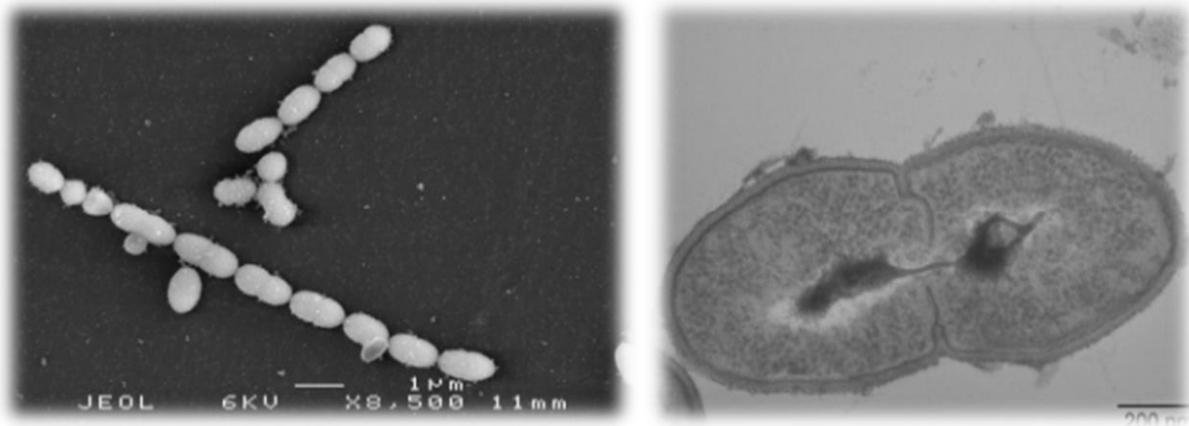


Figure 14 : Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite) [68]

1.2.2. Caractères physiologiques :

Les Enterococcus sont des bactéries en forme de coques, dépourvues de spores. Ils peuvent être mobiles. Elles sont caractérisées comme des bactéries anaérobies facultatives, Leur Température optimale de croissance est de 35°C. Les souches poussent à 10 et 45°C. La plupart des souches survivent à une exposition à 60°C pendant 30 minutes. Elles sont capables de croître dans un milieu contenant 6,5% de NaCl et à un pH de 9,6. Les Enterococcus sont des chimio-organotrophes et leur métabolisme est de type fermentaire homofermentaire. Elles sont négatives pour les tests d'oxydase et de catalase. Certaines souches peuvent produire une pseudo-catalase. De plus, en présence de 40% de sels biliaires, elles sont capables d'hydrolyser l'esculine. [69]

1.2.3. Caractères cultureux :

Selon l'étude menée par CARIP et al. (2015), le diagnostic des entérocoques peut être réalisé par culture ou par sérodiagnostic. Ce qui différencie les entérocoques des streptocoques et du pneumocoque, ce sont les caractéristiques suivantes :

- Polymorphisme : les entérocoques ont la capacité de présenter différentes formes ou morphologies.
- Culture en bouillon bilié : les entérocoques ont une croissance caractéristique dans ce milieu spécifique.

- Culture avec une teinte noire sur gélose à l'esculine : contrairement au streptocoque et au pneumocoque, les entérocoques produisent une coloration noire lorsqu'ils sont cultivés sur cette gélose. [67]

Ces différences dans les caractéristiques de culture permettent de distinguer les entérocoques des autres bactéries du genre *Streptococcus*, notamment le pneumocoque. [70]

Les entérocoques se distinguent facilement des streptocoques par leur capacité à se développer dans des conditions spécifiques, telles qu'une concentration de 6,5% de NaCl et un pH de 9,6. Contrairement à la plupart des streptocoques (à l'exception de *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus uberis*), les entérocoques peuvent également se développer à des températures aussi basses que 10°C. De plus, la plupart des entérocoques donnent une réaction positive au test de Voges-Proskaur, qui est couramment utilisé pour différencier les *Enterococcus* et *Streptococcus* [71].

2. Multirésistance des entérocoques aux antibiotiques :

On désigne par antibiotique toute substance qui présente une activité antibactérienne sans être toxique pour l'organisme hôte [72]. Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des processus physiologiques spécifiques tels que la synthèse de la paroi cellulaire, la réplication ou la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou encore la respiration cellulaire [73].

L'utilisation excessive d'antibiotiques est le principal facteur contribuant à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Cela a entraîné l'émergence et la propagation de bactéries résistantes ainsi que de gènes de résistance chez les humains et les animaux [74]. Selon l'OMS, la résistance aux antibiotiques est la capacité des populations bactériennes à survivre à des concentrations inhibitrices d'agents antimicrobiens [75].

Les entérocoques résistants aux antibiotiques se trouvent à la fois chez l'homme et chez l'animal en raison de l'utilisation d'agents antimicrobiens dans ces deux environnements. Cette résistance est principalement due à la présence de gènes de résistance qui sont acquis par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons [76]. Ils ont une grande plasticité génomique qui leur permet de s'adapter en permanence à leur environnement et de développer une résistance à une large gamme d'antibiotiques [77].

2.1. Résistance des entérocoques vis-à-vis les β -lactamines :

2.1.1. Résistance naturelle :

Les entérocoques se distinguent par leur résistance intrinsèque aux céphalosporines, qui est due à la présence d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP). La résistance des entérocoques aux pénicillines et carbapénèmes se manifeste par une concentration minimale inhibitrice (CMI) 10 à 100 fois plus élevée que celle des autres streptocoques, en raison d'une faible affinité de la protéine de liaison à la pénicilline (PLP) pour ces β -lactamines. De plus, les entérocoques sont considérés comme tolérants aux β -lactamines, car ils nécessitent des concentrations bactéricides minimales (CMB) d'antibiotiques beaucoup plus élevées que la CMI ($CMB/CMI > 32$) pour être éliminés [78].

2.1.2. Résistance acquise :

Les entérocoques développent deux types de mécanismes de résistance aux antibiotiques, soit par l'acquisition d'une β -lactamase, soit par une mutation de la PLP. L'antibiotique se lie normalement à cette protéine et l'inhibe, ce qui bloque la formation de la paroi cellulaire bactérienne. Cependant, en cas de mutation de cette protéine, les pénicillines ne peuvent plus agir efficacement [78].

2.2. Résistance des entérocoques vis-à-vis les glycopeptides :

Les glycopeptides sont des agents antibactériens qui agissent en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Ils se lient de manière spécifique au dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) présent dans les précurseurs du peptidoglycane. Cette interaction forme des complexes nocifs qui perturbent la formation normale de la paroi cellulaire, entraînant ainsi l'inhibition de la croissance bactérienne [79].

Il existe neuf types d'entérocoques résistants qui ont été identifiés en fonction de critères phénotypiques et génotypiques. Huit de ces types résultent d'une résistance acquise, à savoir VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM et VanN. Le neuvième type, VanC, est une caractéristique intrinsèque d'*E.gallinarum* et *E. casseliflavus* [85].

2.2.1. Résistance naturelle :

La résistance à la vancomycine est observée naturellement chez trois espèces d'entérocoques : *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*. Cependant, ces souches demeurent sensibles à la teicoplanine. Cette résistance est médiée par le gène *vanC*, qui est présent dans le chromosome bactérien et n'est pas transférable à d'autres bactéries [80].

2.2.2. Résistance acquise :

Selon LECLERCQ (1997), la résistance aux glycopeptides concerne principalement les espèces *E. faecium* et *E. faecalis*.

- Le phénotype VanA est associé au gène *vanA*, qui code pour une enzyme appelée ligase. Cette enzyme est responsable de la formation d'un dipeptide terminal anormal (D-alanyl-D-lactate) ayant une faible affinité pour les glycopeptides. Le déterminant de résistance *vanA* est inducible par les glycopeptides et confère une résistance de haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Ce déterminant est porté par un plasmide ou un transposon [81].
- Le phénotype VanB est associé au gène *vanB*, chromosomique, est retrouvé chez *E. faecium* et *E. faecalis*. La résistance conférée par ce phénotype est inducible par la vancomycine, mais non inducible par la teicoplanine [82].
- Le phénotype VanD est observé uniquement chez une souche d'*E. faecium*. Le gène *vanD* code également pour une ligase qui est responsable de la formation d'un dipeptide terminal D-alanyl-D-lactate [83].
- Le phénotype VanE a été observé chez *E. faecalis* et il est associé à la formation d'un dipeptide terminal de forme D-alanine-D-serine [84].
- Les phénotypes VanG, VanE, VanL et VanN présentent une résistance aux faibles niveaux de vancomycine, mais ils restent sensibles à la teicoplanine [85].

2.3. Résistance des entérocoques vis-à-vis les aminosides :

Les entérocoques sont moins sensibles aux aminoglycosides que d'autres bactéries en raison d'une perméabilité réduite de leur paroi. Cependant, lorsque les aminoglycosides sont utilisés en combinaison avec un agent qui bloque la synthèse des peptidoglycanes, tels qu'une β -lactamine ou un glycopeptide, leur pénétration est améliorée et leur efficacité est restaurée [86].

2.3.1. Résistance naturelle :

Les entérocoques, comme tous les streptocoques, ont naturellement une résistance de base aux aminosides en raison d'une anomalie dans le transport membranaire de ces antibiotiques. Chez *E. faecium*, la présence de l'enzyme ARNm ribosomal 16S méthyltransférase, EfmM, confère une résistance intrinsèque aux aminoglycosides [87].

En plus de la résistance naturelle aux aminoglycosides chez les entérocoques, la production naturelle d'une enzyme appelée 6-N'-acétyltransférase confère un phénotype de résistance de type K (kanamycine), T (tobramycine) et N (nétilmicine), tout en épargnant la gentamicine [81].

2.3.2. Résistance acquise :

La résistance acquise aux aminoglycosides chez les entérocoques est due à trois mécanismes principaux : l'altération de la cible ribosomale, la modification du transport de l'antibiotique et la détoxification enzymatique de l'antibiotique. Les deux premiers mécanismes sont, en général, la conséquence de mutation chromosomique. Le troisième, de support principalement plasmidique est le plus fréquemment rencontré [88].

Chez *E. faecium*, la résistance à un niveau élevé aux aminoglycosides (CMI > 1 000 µg/mL) est principalement due à des enzymes plasmidiques. Ces enzymes sont similaires à celles présentes chez les staphylocoques et confèrent les mêmes phénotypes de résistance aux aminoglycosides [82].

La résistance de haut niveau à la gentamicine est généralement due à la présence d'un transposon qui contient le gène codant pour l'enzyme bifonctionnelle AAC (6')-Ie-APH (2'')-Ia. Cette enzyme confère une résistance à tous les aminoglycosides commercialement disponibles, à l'exception de la streptomycine [89].

2.4. Résistance des entérocoques vis-à-vis les tétracyclines :

La résistance à la tétracycline chez les entérocoques peut être causée par différents gènes et mécanismes. Parmi ceux-ci, on retrouve les mécanismes d'efflux codés par les gènes tet(K) et tet(L), la protection ribosomale codée par les gènes tet(M), tet(O) et tet(S), ainsi qu'un mécanisme encore inconnu codé par le gène tet(U) [90].

2.5. Résistance des entérocoques vis-à-vis la daptomycine :

Lorsqu'il s'agit d'*E. Faecium*, la résistance à la daptomycine se manifeste par un épaissement de la membrane bactérienne, une augmentation de la charge électrique et une diminution de la polarisation de la membrane lorsqu'elle est exposée à la daptomycine [91].

Chez *E. faecalis*, le mécanisme de résistance à la daptomycine implique une altération du site de liaison de ce médicament. Contrairement aux souches sensibles, la daptomycine est incapable de se fixer au niveau du septum, qui est le site de fixation privilégié, sur les souches résistantes. Au lieu de cela, la fixation se produit en périphérie de la bactérie, ce qui rend la daptomycine inefficace [92].

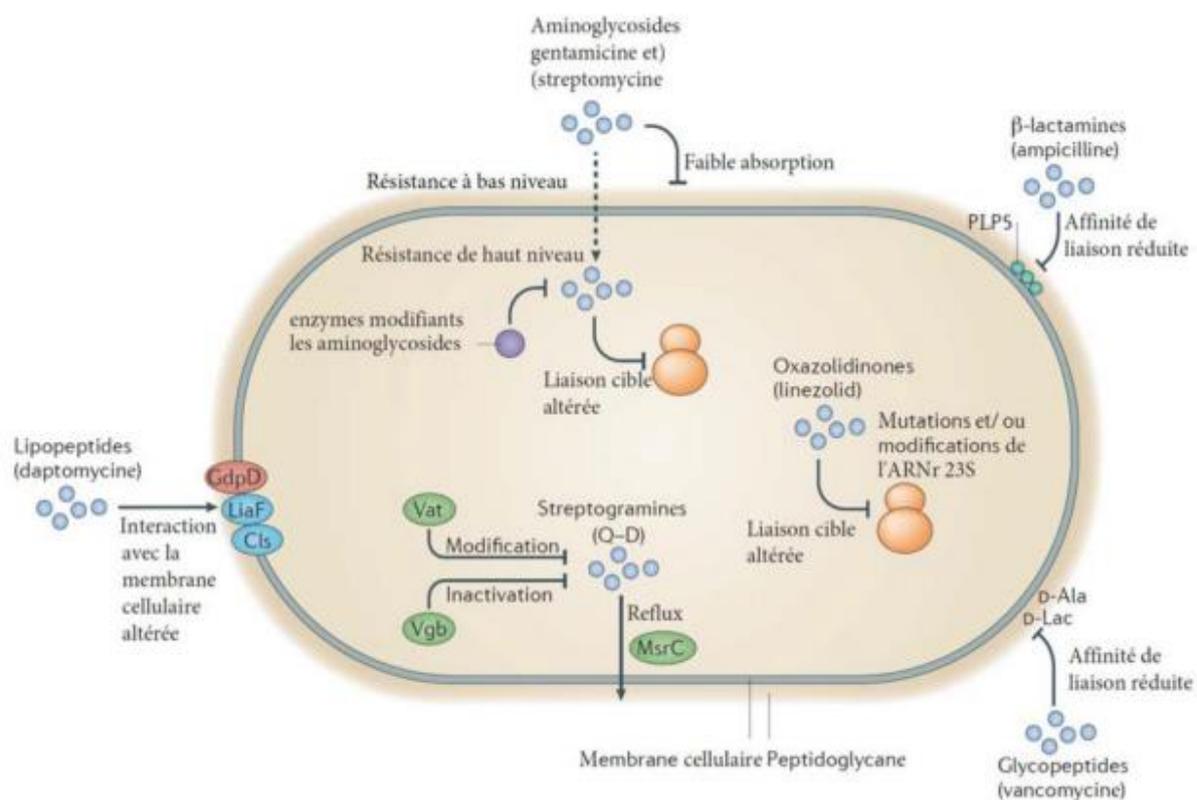


Figure 15 : Principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques des entérocoques

[93]

Etude expérimentale

1. Problématique :

L'utilisation abusive des antibiotiques a entraîné l'apparition de résistances chez les bactéries, ce qui peut se propager à l'homme par la chaîne alimentaire ou par contact avec des bactéries résistantes au via les mécanismes de transfert entre bactéries, il est devenu nécessaire de développer des alternatives naturelles, telles que les extraits de plantes naturelles et les huiles essentielles.

2. Objectif :

L'objectif de cette recherche consiste à étudier les propriétés antibactériennes des extraits du fruit de *Punica granatum L* envers des espèces d'entérocoques multirésistants d'origine aviaire, tout en analysant leur composition chimique. Le but est de valoriser ces extraits en tant qu'alternatives potentielles aux antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes résistantes.

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 :

Les peaux de *Punica granatum L*. ont été récoltées manuellement puis séchées à l'air libre dans un espace obscur à température ambiante pendant 6 mois. Ensuite, elles ont été transférées dans une étuve à 40 °C pendant 24 heures pour parfaire le séchage et faciliter le broyage et l'extraction. Une fois sèches, les peaux ont été broyées en une fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a ensuite été tamisée à travers un tamis de 100 µm pour obtenir une poudre homogène. Cette dernière a été stockée dans un récipient hermétique, à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'à l'étape d'extraction (figure 16).



Figure 16 : 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 ré extraite 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.

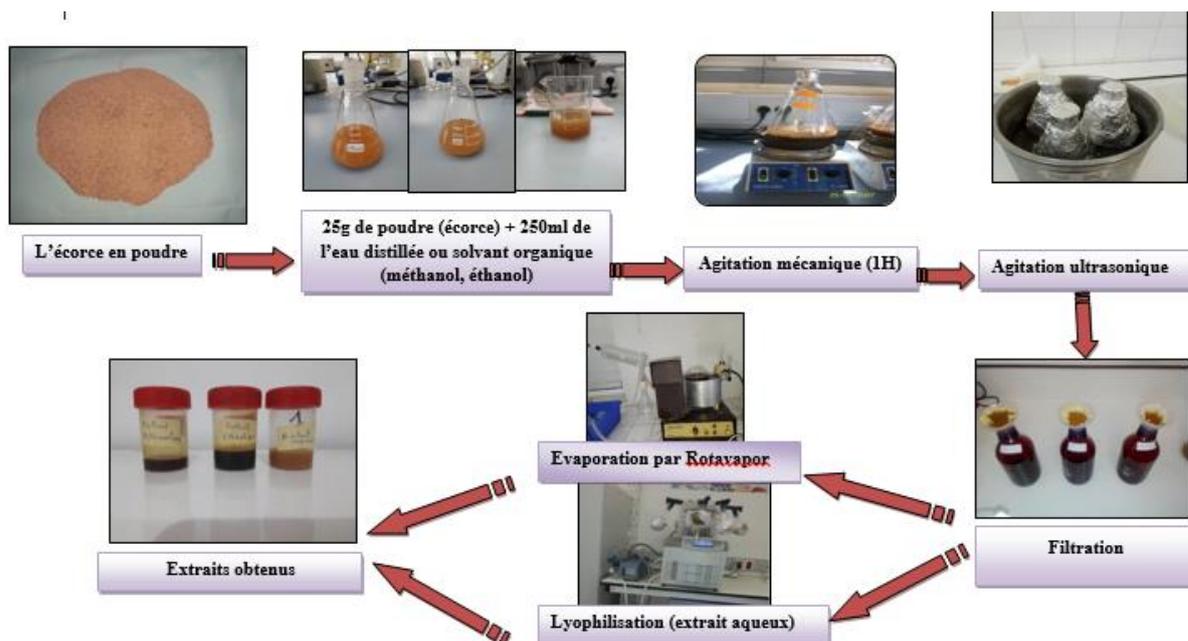


Figure 17 : Protocole expérimental de l'extraction des Polyphénols.

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.

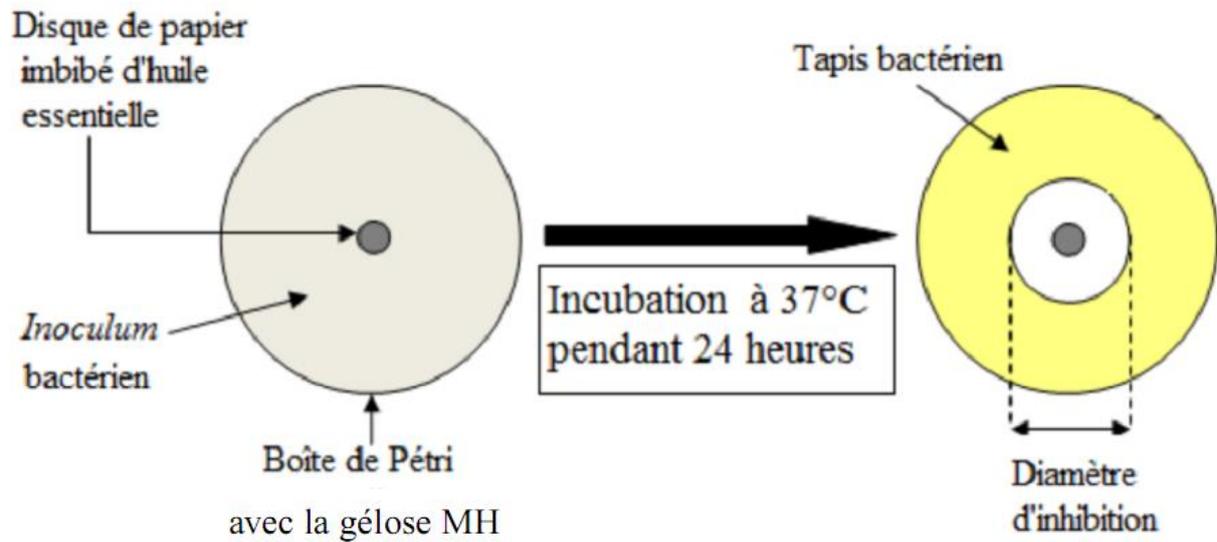


Figure 18 : Illustration de la méthode d'aromatogramme (Zaiki, 1988).

3.2.1. Espèces bactériennes cibles :

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

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

Tableau 04 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes cibles.

espèces 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 espèces 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 Mc Farland.
- 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 19 : Extraits de fruit de *Punica granatum L.*



Figure 20 : 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 05.

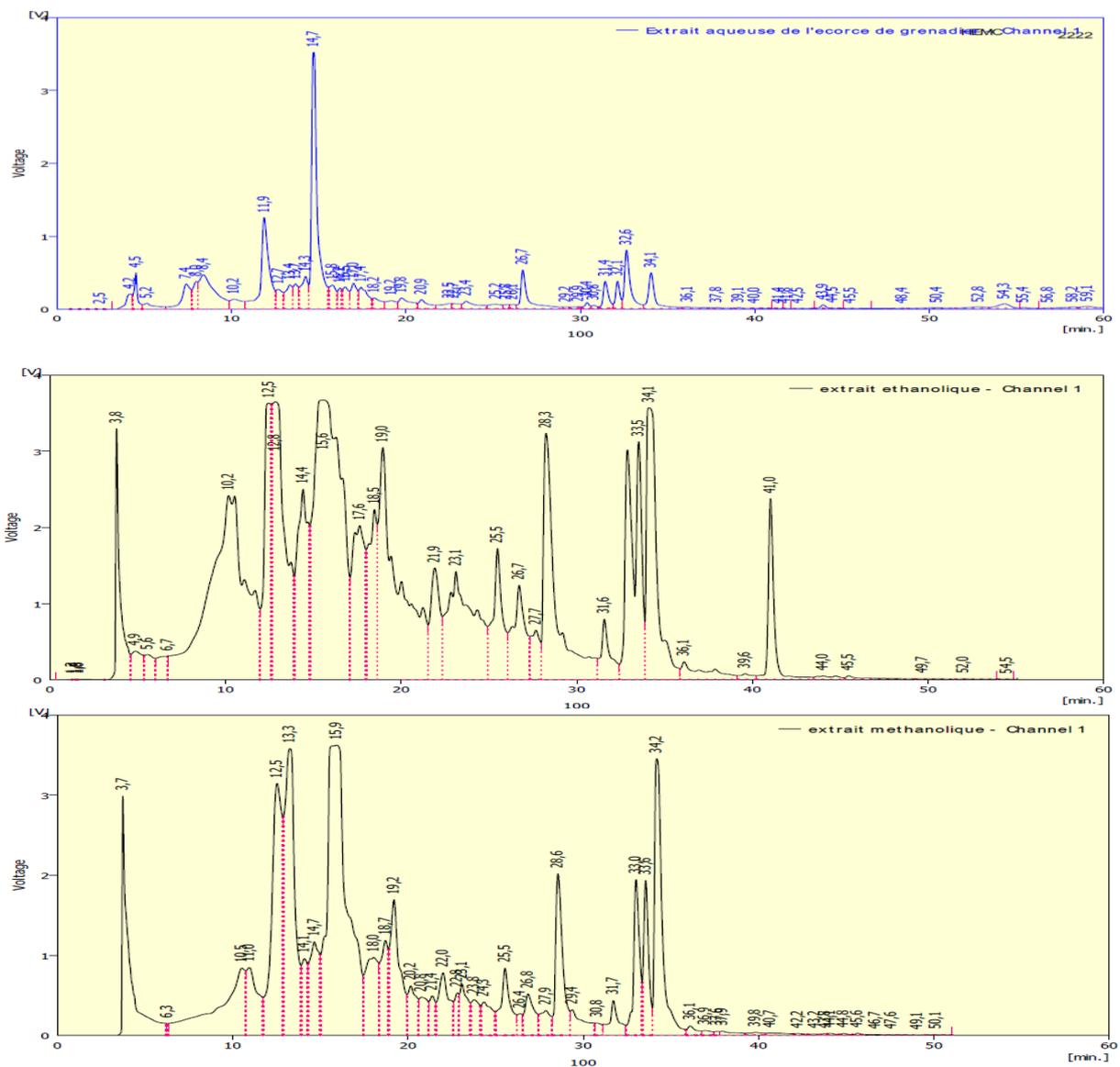


Tableau 05 : Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit *Punica granatum L.*

Extrait	Temps de rétention	La hauteur (mAU)	Surface du Pic (%)	Composé
Extrait Aqueux (a)	11,883	1255,354	10,90	Resorcinol
	22,490	70,765	00,90	Epicatechin
	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
Extrait éthanolique (b)	28,253	3235,007	06,10	Acide 3 hydroxy 4-metoxy cinamic
Extrait méthanolique (c)	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 flavonoïdes identifiés sont la Quercitine, le résorcinol, 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 espèces testées aux extraits étudiés :

Les figures 22 et 23 montrent l'effet des extraits du fruit de *Punica granatum L* vis-à-vis des deux espèces d'entérocoques étudiées.

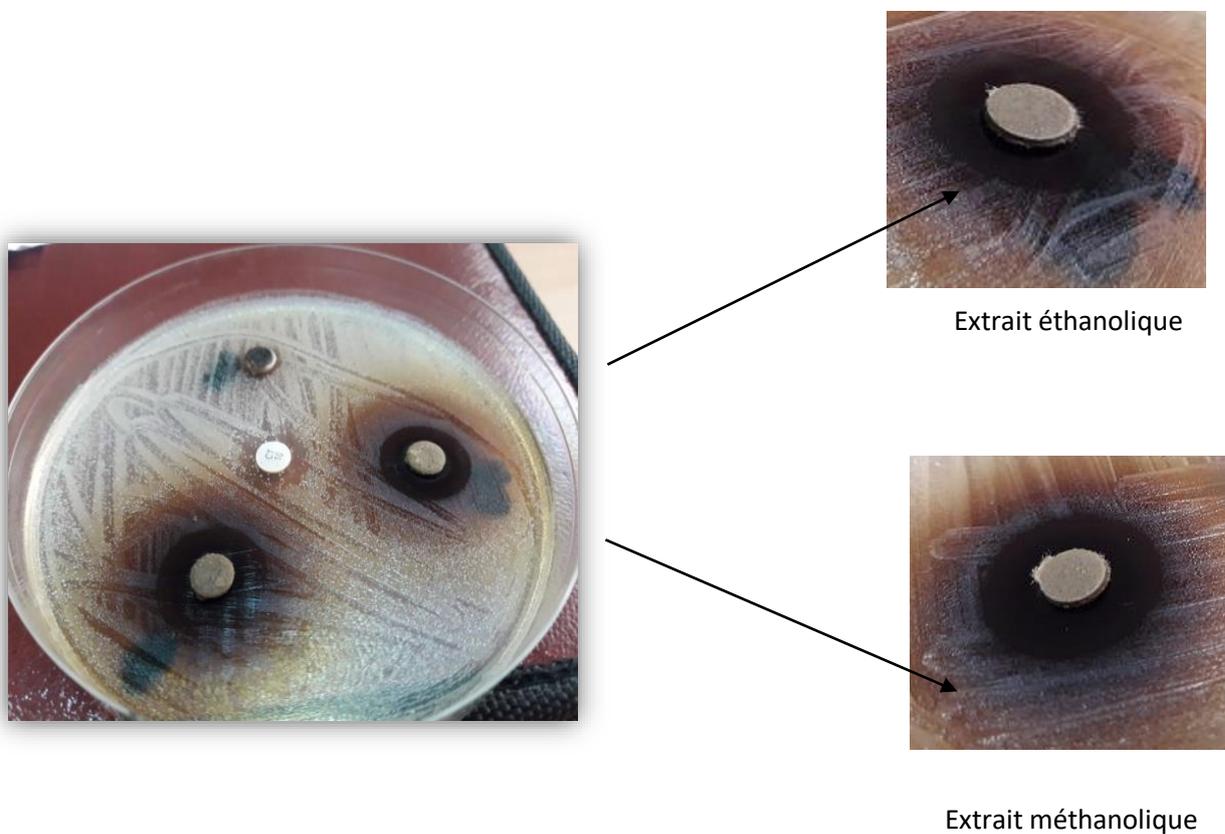


Figure 22 : Aromatogramme d'*E. Faecium* après 24h d'incubation à 37°C.

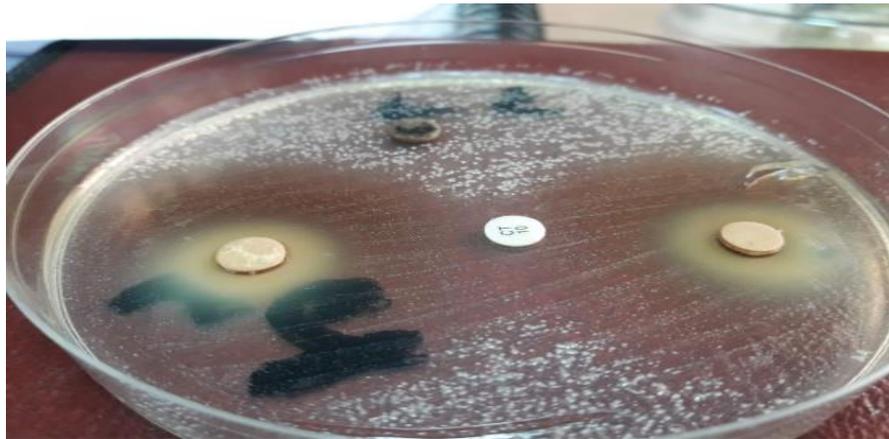


Figure 23 : Aromatogramme d'*E.faecalis* après 24h d'incubation à 37°C.

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

Tableau 06 : 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 qu'*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 espèces vis-à-vis de l'extrait aqueux ont montré qu'il n'y avait pas d'effet antimicrobien, cela pourrait être dû 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 et perspectives

Notre étude porte sur l'analyse chimique et l'activité antibactérienne des extraits de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. Nous avons identifié la présence de flavonoïdes et d'acides phénoliques dans la composition chimique de ces extraits.

Les tests d'activité antimicrobienne réalisés sur les extraits éthanolique et méthanolique ont révélé leur activité contre les germes étudiés. Cependant, aucun effet antibactérien n'a été observé avec l'extrait aqueux aux concentrations utilisées. Il serait donc pertinent de déterminer les concentrations minimales à partir desquelles les extraits présentent des effets antibactériens (CMI - Concentration Minimale Inhibitrice).

Les résultats obtenus sont très prometteurs et ouvrent la voie à de futures études cliniques visant à confirmer l'efficacité antibactérienne de ces produits naturels. Ces études pourraient également explorer l'utilisation de ces extraits en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs, offrant ainsi une alternative aux antibiotiques et atténuant les effets secondaires associés à ces derniers ainsi que la montée de la résistance bactérienne.

Il est crucial de poursuivre ces recherches pour approfondir notre compréhension des activités antibactériennes significatives de ces extraits. En raison de l'augmentation de la résistance bactérienne et des effets néfastes sur la santé humaine liés aux additifs de synthèse, il est essentiel d'explorer des solutions alternatives plus naturelles et durables.

En continuant cette étude, nous pourrions mieux caractériser les mécanismes d'action des extraits de *Punica granatum* L. et déterminer leur potentiel pour combattre les infections bactériennes. De plus, des études supplémentaires pourraient être menées pour évaluer leur innocuité et leur efficacité chez l'homme, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles options thérapeutiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] REGUIEG YSSAAD Athmen, M. (2019). IN VITRO ET IN VIVO CHEZ LE RAT. 161. Rummun, N., Somanah, J., Ramsaha, S., Bahorun, T., & Neergheen-Bhujun, V. S. (2013). Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L.: A Potential Source of Functional Ingredients. *International Journal of Food Science*, 2013, 1-12.

[2]<https://jardinage.lemonde.fr/dossier-352-grenadier-punica-granatum-bon-sirop-grenadine.html>

[3]Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales

[4] Muhammad al-Saga Aid (2009) La grenade EST le fruit des habitants du Paradis. Dar Al-Yaqin pour publication ET diffusion.

[5]MT.Shalaby.DH.Dawood.MHefni.BasmaM.Murad (2019) Phytochemical Constituents Antimicrobial and antitumor Effet of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L).*Journal of food and dairy sciences*.

[6] Yassin Mohamed Taha et al (2021). "In Vitro Evaluation of Biological Activities and Phytochemical Analysis of Different Solvent Extracts of *Punica granatum* L. (Pomegranate) Peels." *Plants* (Basel, Switzerland) vol. 10, 12 2742. 13 Dec.

[7] Naziri Z. Rajaian H. Firouzi R (2012).Antibacterial effects of Iranian native sour and sweet pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts against various pathogenic bacteria. *Iran. J. Vet. Res*; 13:282–288.

[8]Dahham SS. Ali MN. Tabassum H and Khan M (2010).Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *AmEurasian J Agric Environ Sci*9:273–281

[9] Rosas-Burgos EC. Cortez-Rocha MO. Cinco-Moroyoqui FJ. RoblesZepeda RE. López-Cervantes J. Sánchez-Machado DI. Et al. (2009).Antifungal activity in vitro of *Baccharisglutinosa* and *Ambrosia conferti* flora extracts on *Aspegillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World J MicrobiolBiotechnol* 25:2257–2261.

- [10] AidaDoostkam. Et al (2020). Punica Granatum with Multiple Effects in Chronic Diseases. International Journal of Fruit Science.<https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1653809>
- [11] Mason TL.Wasserman BP. (1987). Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds *Phytochemistry*26:2197–202.
- [12] Suad Ali Al-Hamali et autres (1116). L'effet des extraits secs de zeste de grenade sur la croissance de certains Bactéries Gram-négatives et Gram-positives. *Sebha University Journal (Recherche et Sciences Appliquées)* Volume 25, Numéro 2
- [13]Stoilova, I., A. Krastanov, A. Stoyanova, P. Denev and S. Gargova. (2007) : Antioxydant activity of a gingerextract (*Zingiber officinale*) *Food Chemistry*. 102 (3):764-770
- [14] Al-Ghanimi. Ali Abdul Kadhim Jassim et Adhari(2011). Cher Yasser Hassan et Al-Daami. Alaa Abdul Hussein Karim, Activité antioxydante de certains extraits végétaux à teneur phénolique. *Journal scientifique de l'Université de Karbala*. Tome 9. Numéro 3
- [15]Abdalla E. El-Hadary| Mohamed Fawzy Ramadan (1980) Phenolic profilent, anti-hyperglycemic, anti_hyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peelExtract,<https://doi.org/10.1111/jfbc.12803>
- [16] Zahra Rahim Kazem Al Morshedy (1111) Extraction et purification des flavonoïdes des feuilles de thé vert et des écorces de grenade et détermination de leur efficacité antioxydante. Une lettre soumise au Conseil de la Faculté des sciences. Université de Karbala, qui fait partie des exigences pour l'obtention d'une maîtrise en sciences de la vie
- [17]Abdalla E. El-Hadary| Mohamed Fawzy Ramadan (1980) Phenolic profiles, anti-hyperglycemic, anti_hyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peelExtract,<https://doi.org/10.1111/jfbc.12803>
- [18] S. Yu-qing¹, T. Xin, M. Xiao-ming, X. Zi-wei¹, W. Tian¹(2017)In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagicacid, punicalin, and punicalagin ,*Journal of Integrative Agriculture*, 16(8): 1808–1818

- [19] S.Soni, V. Lambole, D. Modi, B. Shah, (2012), *Phytopharmacologie of Punica Granatum linn. – A review*, *pharma science monitor*, 3: 2222-2245
- [20] Akroum, S.; Satta, D. and Lalaoui, K. (2009). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some Algerian plants. *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450 – 216X, Vol.31, No. 2 (2009), pp: 289 –295.
- [21]- SEERAM N., SCHULMAN R., et al. - *Pomegranates. Ancient roots to modern medicine*. Editions Taylor & Francis. 2006. 244 pages.
- [22] RBachoual. W Talmoudi. T.Boussetta. F Braut. J El-Benna (2011). An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food and Chemical Toxicology*.49: 1224–1228.
- [23]<https://www.kingston.ac.uk/news/article/67/16-dec-2009-pomegranates-the-latest-weapon-in-the-fight-against-mrsa>
- [24] Huang, H., Yu, Z., Zhang, S., Liang, X., Chen, J., Li, C., Ma, J., Jiao, R. (2010). Drosophila CAF-1 regulates HP1-mediated epigenetic silencing and pericentromeric chromatin instability. *J. Cell Sci.* 123(16): 2853--2861.
- [25] Yujue Li et al (2016) Correction for ‘Punica granatum (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer’. *RSC Adv.*, 6, 84523–84535.
- [26] Khaled Seidi et al (2016). *Anti Tumoral Properties of Punica granatum (Pomegranate) Seed Extract in Different Human Cancer Cells*
- [27] Lansky E., Newman R (2007). *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. *Journal of Ethno pharmacology*, 109.P:177-206.
- [28] HORA J. J., MAYDEW E. R., et al. - Chemo preventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *Journal of medicinal food*. 2003. N°6. Pages 157-161.

- [29] T. Ismail, P. Sestili, S. Akhtar. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects, *Journal of Ethno pharmacology* 143:397–405, 2012
- [30] TOM H.W. H., GANG P., et al. - Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005. N°207. Pages 160-169.
- [31] Entsar A. Saad (2015). Antidiabetic, Hypolipidemic And Antioxidant Activities And Protective Effects Of Punica Granatum Peels Powder Against Pancreatic And Hepatic Tissues Injuries In Streptozotocin Induced Iddm In Rats, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- [32] Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H., Azad- Bakht L., «Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia.», *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2006; 76, 3: 147–151.
- [33] Lai S., Zhou Q., Zhang Y., Shang J et Yu T. (2009). Effects of pomegranate tannins on experimental gastric damages. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 34: 1290-1294
- [34] Ajaikumar KB. Asheef M., Babu BH ET Padikkala J. (2005). The inhibition of astric mucosal injury by Punica granatum L (pomegranate) methanolic extract. *Journal Ethnopharmacol*. 4(96):171-6.
- [35] MURTHY K. N. C., VITTA K. R., et al. - Study on wound healing activity of Punica granatum peel. *Journal of medicinal food*. 2004. Vol. 7. N°2. Pages 256-259.
- [36] Delgado NTB et al (2017). Pomegranate extract enhances endothelium dependent coronary relaxation in isolated perfused hearts from spontaneously hypertensive ovariectomized rats. 04 January 2017 <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00522>
- [37] AidaDoostkam. Et al (2020). Punica granatum with Multiple Effects in Chronic Diseases. *International Journal of Fruit Science*. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1653809>
- [38] Abdel-Ghaffar Fet al (2010). The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. *Parasitol Res* 108: 979–984.

- [39]Toulah FH, Ismeel HA, Khan S (2010).Effect of treatment with Neem (*Azadirachta indica*) compared with Baycox drug on the caecumof chicken experimentally infected with *Eimeria tenella*. *J EgyptSocParasitol*40:93–106
- [40]Koyama S., Cobb LJ., Mehta HH., Seeram NP., Heber D., Pantuck AJ et Cohen P. (2010). Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF/IGFBP axis. *Growth Hormone & IGF Research*. 20: 55-62.
- [41]Wald Elodie, 2009. Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et évolution Thérapeutique récentes. Université Henri Poincare. Thèse. 158p.
- [42]Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses poly technologiques et universitaires romandes, 345 :4-5.
- [43]Stalikas, C.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci*, 30: 3268–3295.
- [44]Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.
- [45]Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000b. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography an* 896, 87–93
- [46]Hollman, P.C.H. 2001. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects *J. Sci. Food Agric*, 81: 842-852.
- [47]Fleuriet, A., Jay-Allemand. C. Macheix. J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121-216.
- [48]BENDJABEUR, S. (2012). Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *Punica granatum* L.) en vue de leur utilisation alimentaire.
- [49]Guignard, J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson. Paris. 160 p.

- [50]Malagas, D., 1992. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala. p. 232.
- [51]. Stöckigt J., Sheludko Y. Unger M. Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization very spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
- [52]138. De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63.
- [53]Moringuschi, T., Kita, M., Hasegawa, S. and Omoru, M. 2003. Molecular approach to citrus
Flavonoid and limonoid biosynthesis. *Food, Agriculture and Environment*, 1: 22-25.
- [54]Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*, 63: 1035-1042.
- [55]Molyneux, R. J. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- [56] Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.
- [57] Conrad J; Vogler B.; Klaiber I.; Roos G., Walter U.; Kraus W., 1998. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Photochemistry* 48: 647 - 650.
- [58]Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H. (2005). Anthocyaninhydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumor genesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer*. 113(3), 423-433.
- [59]Madlener S., Illmer C., Horvath Z., Saiko P., Losert A et Herbacek I. (2007). L'acide gallique

Inhibe la RIB nucléotide réductase et les cyclooxygénases dans les cellules leucémiques promyélocyaires humaines HL-60. *Cancer Letters*. p. 156-62.

[60] Borde VU., Pangrikar PP et Tekale SU. (2011). Acide gallique dans les herbes et formulations

Ayurvédiques. *Recent research in science and technology*. p. 51-4.

(61) Al-Khatiber 2018. Pharmacologie Tanins et coumarines. Collège de pharmacie, troisième année, page 20

[62] THIERCELIN, M. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir

Pathogène. *CR Soc Biol* 5, 269–271.

[63] Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R., "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, (1984), 31-34.

[64] Parte, A. C. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net),

20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1825–1829 (2018).

[65] Zaika L.L. 1988. Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J of Food Safety*. 9, 97-117.

[66] 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.

[67] GUYON, R. L., 1960. « Précis de bactériologie », G. DOIN et Cie, Paris, 245-247.

[68] Ladjouzi, R. (2013). Analyse des mécanismes de tolérance aux antibiotiques ciblant la paroi chez les entérocoques. Travail de diplôme en vue de l'obtention du diplôme doctorat, aspect moléculaire et cellulaire de la biologie, Ecole doctorale normande biologie Intégrative, Santé, Environnement, p. 225.

[69] REISSIER, S. 2016. « Daptomycine et infections sévères à entérocoques. », *Journal des Anti-infectieux* ; 18, 177-181.

- [70]CARIP, C., SALAVERT, H., TANDEAU, A. 2015. « Microbiologie, hygiène et droit alimentaire (la manuelle deuxième édition). », Lavoisier 323 :107-109.
- [71]AGUILAR-GALVEZ, A., DUBOIS-DAUPHIN, R., DESTAIN, J., CAMPOS D., THONART, P. 2012. « Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16(1), 67-76.
- [72]BRYSKIER, A. (1999). « Antibiotiques et agents antibactériens. In. Antibiotiques agents antibactériens et anti fongiques. », Ellipses, Paris, p1190.
- [73]PLESIAT, P. 2012. « CHAPITRE 02 : biochimie de la résistance. In : COURVALIN, R et LECLERCQ, R., *Antibiogramme*. », 3 eme Edition, Eska. Paris.
- [74]LUKASOVA, J., SUSTACKOV, A.A.2003. «Enterococci and Antibiotic Resistance. », *Acta Vet. Brno*, 72: 315-323.
- [75]LOCHMANN, O .1994. « Zaklady antimikrobialni terapie. », Praha, Triton: 175.
- [76] HAMMERUM, A. M. 2012. «Enterococci of animal origin and their significance for public health. », *Clinical Microbiology and Infection Rev*; 101111/j. 1469-0691. 03829.
- [77]INOUE, T., TOMITA, H., & IKE, Y. 2006. «Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. » *Antimicrob. Agent's chemother*, 50(4), 1202-1212.
- [78]STUCKI, K., HARBARTH, S., NENDAZ, M.2014. « Infections à entérocoques: du plus simple au plus complexe. », *Rev Med Suisse*; volume 10.1918-1923.
- [79]ARTHUR, M., REYNOLDS, P., et COURVALIN, P.1996. « Glycopeptide resistance in enterococci». *Trends Microbiol*.4:401-407.
- [80]UTTLEY, A.H., COLLINS, C.H., NAIDOO, J., ET GEORGES, R.C.1988. «Vancomycin resistance enterococci. » *Lancet i*: 57-58.
- [81]LECLERCQ, R. 1997. « Enterococci acquire new kinds of resistance. », *Clin Infect Dis*, 24 (suppl 1): 9080-4.

- [82]QUINCAMPOIX et MAINARDI. 2001. « Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. », Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS ; 10 : 267-75.
- [83]PERICHON, B., REYNOLDS, P., COURVALIN, P.1997. «VanD type glycopeptideresistant *Enterococcus faecium* BM4339. », *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 2016-8.
- [84] FINES, M., PERICHON, B., REYNOLDS, P., SAHM, D.F., COURVALIN, P.1999. «Van E, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405», *Antimicrob Agents Chemother*, 43:2161-4.
- [85]COURVALIN, P .2012. « Chapitre 24 : glycopeptides et entérocoques. In : Courvalin P, et LECLERQ, *Antibiogramme*. », 3eme édition Eska, paris.
- [86]STUCKI, K., HARBARTH, S., NENDAZ, M.2014. « Infections à entérocoques: du plus simple au plus complexe. », *Rev Med Suisse*; volume 10.1918-1923.
- [87]GALIMAND, M., SCHMITT, E., PANVERT, M., DESMOLAIZE, B., DOUTHWAITE, S., MECHULAM, Y., and COURVALIN, P.2011. «Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific méthyltransférase EfmM. », *RNA* 17, 251–262
- [88]DUTKA-MALEN, S et COURVALIN, P.1994. « Résistance aux glycopeptides et aux aminosides chez les entérocoques », *Med Mal Infect*, 24, Spécial : 158 -164.
- [89] ARIAS, C.A, MURRAY, B.E.2012. «The rise of the *Enterococcus*: beyond Vancomycin resistance. », *Nat Rev Microbiol*; 10(4):266–278. [PubMed: 22421879].
- [90]CHOPRA, I., ROBERTS, M.2001. « Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. », *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232–260. Doi: 10.1128/ mibr.65.2. 232-260. 2001
- [91]REISSIER, S. 2016. « Daptomycine et infections sévères à entérocoques. », *Journal des Anti-infectieux* ; 18, 177-181.
- [92]TRAN, T.T, PANESSO, D., MISHRA, N.N, MILEYKOVSKAYA, E., GUAN, Z., MUNITA, J.M, ET al.2013. «daptomycine-resistant *enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. », *mbio*; 4

[93] ARIAS, C.A, MURRAY, B.E.2012. «The rise of the Enterococcus: beyond Vancomycin resistance. », Nat Rev Microbiol; 10(4):266–278. [PubMed: 22421879].

English summary

Introduction:

The discovery of antibiotics was a revolutionary advancement in the field of healthcare, as their use contributed to reducing mortality and disease rates worldwide for a long period. However, the overuse and excessive use of these antimicrobial agents have led to the emergence of certain forms of resistance in microbial strains, compromising the effectiveness of antibiotics.

The increasing resistance of bacteria to antibiotics is a serious global problem that has prompted the search for new biomolecules with broad antibacterial activity. Plants and their derivatives, such as essential oils and plant extracts, are widely used in traditional medicine. These plants contain a multitude of secondary metabolites that have the ability to inhibit or slow down the growth of bacteria.

The objective of this research is to study the antibacterial properties of extracts from the fruit of *Punica granatum* L. against multi-resistant enterococci species of avian origin while analyzing their chemical composition. The aim is to valorize these extracts as potential alternatives to antibiotics for combating antibiotic-resistant bacterial infections.

Chapter 01: general information on *Punica granatum* L

Botanical Characteristics:

A small tree or shrub with deciduous leaves in arid desert regions and semi-deciduous leaves in coastal areas. The height of the tree is typically 4 to 5 meters or even much taller. It has numerous slender branches that are often ascending and sometimes erect, with branches that are often spiny. The leaves have very short petioles and are entire, opposite, smooth, and shiny, with an oblong-elliptical shape.

Geographic Distribution:

Pomegranate trees can be found in Persia, the Middle East, and the northern Himalayas of India. They are also present in the Mediterranean basin and have been cultivated for some time in countries such as Iran, Iraq, Central Asia, India, China, Malaysia, Egypt, Saudi Arabia, and Southern Europe.

Additionally, pomegranate trees are found in the Americas, specifically in California and Arizona, where Spanish colonizers introduced them in 1769.

Therapeutic Properties of Punica granatum L:

In recent years, pomegranate peel extracts have been studied extensively due to their therapeutic benefits on a large scale. Among the numerous health benefits that these extracts offer to the body, the following potential biological properties have been found to be significant in the presented studies: anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, anticancer, antifungal, antiviral, and especially beneficial for heart disease and diabetes. In addition to these functions, other modern studies have explored its anti-algal and antiretroviral parasite properties. In this section, we will examine the main findings.

Chemical Composition of Punica granatum L Fruit:

Research on the bioactive components of pomegranate and their health benefits is a highly relevant and of great interest. Many scientific studies have revealed that pomegranate and its derivatives contain a multitude of components that can be beneficial in preventing certain diseases and maintaining good health.

Using chromatography, magnetic resonance, and mass spectrometry techniques, the composition of various parts of the pomegranate has been precisely identified. The pomegranate contains a large quantity of phytoconstituents distributed in its different parts, including fruits, seeds, leaves, flowers, and roots, juices, and fruit peels. The table provides a summary of the main therapeutic compounds present in the pomegranate.

Chapter 02: phenolic compounds

Overview:

Plants produce phenolic compounds as secondary metabolites, which enable them to defend against environmental threats. In reality, phenolic molecules serve multiple functions in plants. They contribute to the plant's resistance against pathogenic organisms, enhance plant tolerance to various stresses, and act as signaling molecules for recognition between plants (allelopathy) and between plants and their symbionts.

Natural phenolic compounds exhibit a wide diversity of structures, ranging from simple molecules like phenolic acids to highly polymerized molecules such as condensed tannins. They encompass a variety of compound families, including simple phenols, phenolic acids, stilbenes, flavonoids, hydrolysable and condensed tannins, coumarins, lignans, lignins, and xanthenes.

Structure and Categories of Phenolic Compounds:

Phenolic compounds encompass a wide range of chemical substances that contain at least one aromatic ring and one or more hydroxyl groups, among other constituents. Natural polyphenols exhibit a spectrum of structures, from simple molecules like phenolic acids to highly polymerized compounds like tannins. They are categorized into various groups, including phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes, lignans, saponins, phytosterols, or phytostanols. Among these, phenolic acids, flavonoids, and tannins are the most predominant.

Roles and Benefits of Phenolic Compounds:

Phenolic compounds, such as Gallic acid and its derivatives, have a wide range of applications in various biological and pharmaceutical fields. A recent study has demonstrated that Gallic acid and its derivatives are widely used for the treatment of several diseases.

In plants, tannins are considered the source of energy consumed by the plant in the food conversion process, so their quantity decreases as they are depleted during the maturation process. What remains transforms into acids that give the fruit a sour taste. Tannins are disinfecting phenolic compounds that protect plants from insects and fungi, thus preserving the plant's life and contributing to the protection of peels and pulp.

Chapter 03: enterococci and antibiotic resistance.

General Information on Enterococci:

Historical Background

The French microbiologist Felix Thiercelin first used the term «enterococcus» in 1899 to describe a new Gram-positive diplococcus that he had isolated from the human digestive tract. Subsequently, in 1906, Andrews and Herder proposed the names "Streptococcus faecalis" and "Streptococcus faecium" to designate streptococci with characteristics similar to those of the enterococci described by Thiercelin and Jouhaud.

In 1984, to clarify the confusion surrounding these bacterial species, the results of chemotaxonomy and molecular genetics techniques, such as DNA-DNA hybridization and sequencing of the 16S ribosomal RNA subunit oligonucleotides, confirmed that the species *S. faecalis* and *S. faecium* were distinct from other streptococci. These discoveries led to the creation of the genus *Enterococcus*, with the genus *Streptococcus* being divided into three related genera: *Streptococcus*, *Lactococcus*, and *Enterococcus*.

Knowledge about the *Enterococcus* genus has grown over time, and the number of associated species has increased, with over 30 different *Enterococcus* species described by 2012. To date, 57 different *Enterococcus* species have been identified.

Bacterial Characteristics:

Enterococci are Gram-positive bacteria that appear as ovoid cocci. They can be found individually, in pairs, or in short chains, often taking on an elongated shape in the direction of the chain. They tend to form clusters in tetrad arrangements or short rod-like elements. Enterococci have a similar appearance to isolated or chained pneumococci within the body. In broth culture, they may resemble streptococci. When they appear as diplococci, the two cocci are of unequal size.

Physiological Characteristics:

Enterococci are cocci-shaped bacteria, devoid of spores. They can be mobile and are characterized as facultative anaerobic bacteria. Their optimal growth temperature is 35°C, although some strains can grow between 10 and 45°C. Most strains can survive exposure to 60°C for 30 minutes. They are capable of growing in a medium containing 6.5% NaCl and at a pH of 9.6.

Enterococci are chemo-organotrophs, and their metabolism is of the homofermentative fermentative type. They test negative for oxidase and catalase, although some strains can produce a pseudo-catalase. Additionally, in the presence of 40% bile salts, they are capable of esculin hydrolysis.

Cultural Characteristics:

According to a study conducted by CARIP et al. (2015), the diagnosis of enterococci can be performed through culture or serodiagnosis. What differentiates enterococci from streptococci and pneumococci are the following characteristics:

Polymorphism: Enterococci have the ability to exhibit different shapes or morphologies.

Growth in bile broth: Enterococci exhibit characteristic growth in this specific medium.

Black coloration on esculin agar culture: Unlike streptococci and pneumococci, enterococci produce a black coloration when cultured on this agar.

These differences in cultural characteristics allow for the distinction of enterococci from other *Streptococcus* bacteria, especially pneumococci. Enterococci are easily distinguished from streptococci by their ability to grow under specific conditions, such as a concentration of 6.5% NaCl and a pH of 9.6. In contrast to most streptococci (with the exception of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and *Streptococcus uberis*), enterococci can also grow at temperatures as low as 10°C.

Multidrug Resistance in Enterococci to Antibiotics:

Antibiotics are substances that exhibit antibacterial activity without being toxic to the host organism. Antibiotics act on bacteria by inhibiting specific physiological processes, such as cell wall synthesis, DNA replication or transcription, protein synthesis, and cellular respiration.

The overuse of antibiotics is the primary factor contributing to the increase in antibiotic resistance. This has led to the emergence and spread of resistant bacteria and resistance genes in both humans and animals. According to the World Health Organization (WHO), antibiotic resistance is the ability of bacterial populations to survive inhibitory concentrations of antimicrobial agents.

Antibiotic-resistant enterococci are found in both humans and animals due to the use of antimicrobial agents in both environments. This resistance is mainly attributed to the presence of resistance genes acquired through mobile genetic elements such as plasmids or transposons. Enterococci have a high degree of genomic plasticity, allowing them to continually adapt to their environment and develop resistance to a wide range of antibiotics.

Experimental study

Problem Statement:

The overuse of antibiotics has led to the development of resistance in bacteria, which can spread to humans through the food chain or contact with antibiotic-resistant bacteria via mechanisms of bacterial transfer. It has become necessary to develop natural alternatives, such as extracts from natural plants and essential oils.

Objective:

The objective of this research is to study the antibacterial properties of extracts from the fruit of *Punica granatum* L. against multi-resistant avian-origin enterococci species while analyzing their chemical composition. The goal is to valorize these extracts as potential alternatives to antibiotics for combating antibiotic-resistant bacterial infections.

Extraction of Phenolic Compounds from Punica granatum L. Fruit Peel:

Preparation of Plant Material:

The peels of *Punica granatum* L. were manually harvested and air-dried in a dark environment at room temperature for 6 months. Subsequently, they were transferred to an oven at 40°C for 24 hours to ensure complete drying and facilitate grinding and extraction. Once dried, the peels were finely ground using an electric grinder. The resulting powder was then sieved through a 100- μ m sieve to obtain a homogeneous powder. This final powder was stored in an airtight container, protected from light and moisture, until the extraction phase.

Extraction Protocol:

25 grams of finely ground plant material were prepared to maximize the contact surface with the solvent (distilled water, methanol, and ethanol) for the best possible extraction yield without an excessively long extraction time. The plant material was macerated in 250 ml of the solvent and subjected to mechanical agitation for 1 hour, followed by extraction in an ultrasonic bath from "FRITSCH" for 2 hours. The solutions were then filtered using filter paper to separate the filtrate from the residue. The residue was re-extracted with 100 ml of the solvent following the same protocol for 1 hour. Finally, 50 ml of solvent was used for a 30-minute extraction. The three extraction fractions were combined to reach a final volume of 400 ml.

The solvent (methanol and ethanol) was evaporated using a rotary evaporator at a temperature of 50°C or dehydrated in a freeze dryer (48 to 72 hours). The obtained extracts were stored at 4°C.

Identification of Phenolic Compounds by HPLC Analysis:

Chromatograms were recorded and their processing was carried out using the YL CLARITY software. Phenolic compounds are identified based on their wavelengths and retention times. The identification of phenolic compounds is conducted by comparing the peaks found with well-defined reference standards.

Study of Antibacterial Activity (Aromatogram):

The aromatogram is a method inspired by the antibiogram, which allows the determination of the inhibitory activity of the essential oil or natural extract by measuring the diameter of inhibition around a disc impregnated with them.

Culture Media:

To obtain young colonies of 24 hours, the species were subculture on nutrient agar. For the study of antibacterial activity, Mueller-Hinton agar (IPA) was used.

Reading:

The reading is performed by measuring the diameter of the inhibition zone around each disc using a ruler, taking the average of two perpendicular diameters passing through the center of the disc. Three repetitions were carried out for each strain.

The interpretation of results is done by measuring the diameter (\emptyset) of the inhibition zone in millimeters according to the range proposed by PONCE et al. (2003) as follows:

6 mm $\leq \emptyset \leq$ 8 mm: Not sensitive.

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

15 mm $\leq \emptyset \leq$ 19 mm: Very sensitive.

$\emptyset \geq$ 20 mm: Extremely sensitive.

Results and Discussion:

The phenolic compounds present in the three studied extracts were flavonoids and phenolic acids. Specifically, we identified vanillin acid, trans-cinamic acid, and salicylic acid in the aqueous extract.

In contrast, we found syringique acid, mannish acid, and salicylic acid in the methanolic extract. While in the ethanolic extract, we only found 3-hydroxy-4-methoxy cinamic acid.

The identified flavonoids include Quercétine, resorcinol, Epicatechin, and berberine. Additionally, oleuropeine, an ortho-diphenol frequently identified in olive fruits, was also found in the aqueous extract.

According to several studies, the majority of polyphenols in pomegranates are concentrated in the fruit peels rather than the fruit seeds or whole fruits. This means that pomegranate peels contain a higher amount of phenolic compounds.

Our results show that *E. faecium* is sensitive to both the ethanolic and methanolic extracts, with inhibition zone diameters of 13.5 mm and 13 mm, respectively. *E. faecalis* is extremely sensitive to both extracts, with inhibition zone diameters of 21.5 mm and 21 mm.

These results are consistent with the findings of REDDY et al. (2007), who demonstrated that pomegranate extracts exhibit significant antimicrobial activity against certain Gram-negative and Gram-positive bacteria. They also align with the work of AL-ZOREKY (2009), who showed that pomegranate peel extracts are potent inhibitors of the growth of *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *Yersinia enterocolitica*.

The antimicrobial activity of these extracts is, at least in part, attributed to the presence of polyphenols. This is confirmed by other research attributing antimicrobial activity to the presence of polyphenols (King and Young, 1999).

The sensitivity results of the species to the aqueous extract showed no antimicrobial effect, which could be due to an insufficient concentration of the extract. Indeed, CHOI et al. (2009) studied the in vivo and in vitro effect of applying various concentrations of pomegranate peel extracts to inhibit the growth of Salmonella, noting that the minimal dose required was 62.5 mg/l.

The work of LAIRINI et al. (2014) indicates that the inhibitory activity against microorganisms starts at a concentration of 0.12 mg/ml of the extract, and inhibition zones increase with higher extract concentrations.

Conclusion and Perspectives

Our study focused on the chemical analysis and antibacterial activity of Punica granatum L. fruit peel extracts. We identified the presence of flavonoids and phenolic acids in the chemical composition of these extracts.

The antimicrobial activity tests conducted on the ethanolic and methanolic extracts revealed their activity against the studied microorganisms. However, no antibacterial effect was observed with the aqueous extract at the concentrations used. It would be pertinent to determine the minimum concentrations at which the extracts exhibit antibacterial effects (MIC - Minimum Inhibitory Concentration).

The results obtained are very promising and pave the way for future clinical studies to confirm the antibacterial effectiveness of these natural products. These studies could also explore the use of these extracts as alternative antimicrobial agents, offering an alternative to antibiotics and mitigating the side effects associated with them, as well as the rise of bacterial resistance.

Continuing this research is crucial to deepen our understanding of the significant antibacterial activities of these extracts. Due to the increasing bacterial resistance and the adverse health effects associated with synthetic additives, it is essential to explore more natural and sustainable alternative solutions.

By continuing this study, we can better characterize the mechanisms of action of Punica granatum L. extracts and determine their potential in combating bacterial infections. Furthermore, additional studies could be conducted to assess their safety and efficacy in humans, thus opening the door to new therapeutic options.

HEBBACHE Bader Eddine

Université de blida-1 / Institut des Sciences Vétérinaires

Promoteur : HAMMAMI Nabila

Co-Promoteur : YOUSFI Safia

**Effet de biomolécules du grenadier *Punica granatum* L sur les entérocoques
isolés du tube digestif de volaille**

Résumé :

Depuis les temps anciens, les plantes ont été utilisées pour les soins du corps et la prévention des maladies en raison de leurs propriétés curatives. De nos jours, les plantes sont devenues une véritable source de médicaments, de compléments alimentaires et de produits cosmétiques. Leurs utilisations sont constamment développées et leur champ d'application est élargi.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la grenade (*Punica granatum* L), dans le but de déterminer l'effet de ses composés et d'évaluer leurs activités antibactériennes contre des espèces multirésistantes d'*Enterococcus* (*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*) isolées du système digestif des volailles.

Nous avons testé deux espèces et étudié leur sensibilité à l'extrait de l'écorce de grenade en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Nos résultats ont montré que l'espèce intestinale *E. faecium* était sensible à l'extrait éthanolique et à l'extrait méthanolique, avec des diamètres d'inhibition respectifs de 13,5 mm et 13 mm. De plus, l'espèce *E. faecalis* était très sensible aux deux extraits, avec des diamètres d'inhibition de 21,5 mm et 21mm.

Mots clé : la grenade, antibactériennes, multirésistantes, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium*

