

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saïda Dr MOULAY Tahar



كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation de l'activité antioxydant, anti microbienne de pelure de grenade de la terre région de Saïda

Présenté par :

- Mr : BOUSSAYED Maroua
- Mr : REMMAS Amaria

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mme. CHALANE Fatiha

MCA Université de Saïda

Examineur

Mme. BELGACEM Habiba

MCB Université de Saïda

Rapporteur

Mme. GHOUTI Dalila

MCA Université de Saïda

Année universitaire 2024/2025



Remerciement

En premier lieu, je remercie Allah tout puissant de m'avoir donné le courage et santé pour réaliser ce travail. J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à Dr.GHOUTI D qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour sa disponibilité et sa simplicité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Madame, j'ai été satisfaite de votre qualité de bonne enseignante, je ne peux que sincèrement vous exprimer mon profond respect et ma gratitude. Mes vifs remerciements vont à tous ceux qui ont accepté d'associer leurs compétences et leur savoir afin de juger ce travail : A Me. BELGACEM Habiba d'avoir accepté de faire partie de jury. A Me CHAALANE Fatiha qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce travail. un grand merci au responsable de laboratoire de l'Université de Saïda pour leur aide précieuse durant la réalisation de notre travail et au mes camarades et collègues de promotion ,avec qui j'ai partagé efforts , entraide et souvenirs inoubliables durant ces années

Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé, à titre Professionnel ou personnel à la réalisation de ce travail.

Dédicace



À ma chère maman,

Mon pilier, mon refuge, celle dont l'amour et les prières m'ont portée jusqu'ici. Merci pour ta patience, tes sacrifices silencieux et ton soutien inconditionnel. Ce travail est avant tout le fruit de ton amour.

À ma sœur sara

Merci pour votre affection, vos encouragements et votre présence rassurante. Vous avez été une force invisible qui m'a aidée à avancer.

À mon fiancé,

Merci pour ta compréhension, ton soutien constant et ta foi en moi, même dans les moments les plus difficiles. Ta présence a rendu ce parcours plus doux et plus fort.

À ma précieuse amie maroua,

Merci d'avoir été là, dans les rires comme dans les larmes. Ton amitié sincère a été un rayon de soleil tout au long de ce chemin.

À vous tous,

Je dédie humblement cette étape de ma vie, avec tout mon amour et ma gratitude.

AMARIA

2025

Dédicace



*À mon dieu, le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail
Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste
Travail :*

*A mes très chers parent : BELFETOUH et FATIMA sans eux je n'est pas pu
être ce que je*

*Suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours leurs soutiens et leurs
Encouragements durant toutes mes études et mes recherches, Je prie Dieu pour
qu'il vous accorde santé et une longue vie.*

A Ma soeurs : NAZIHA ; et mes frères

*Seif eddine ; mohamedelmabrouk pour votre amour, Votre soutien et votre
confiance, Je*

Vous remercie de tout coeur.

*A ma binômes MANINA ; qui est partagés avec moi tous les moments de joie et
De bonheur, je vous remercie pour votre amitié et votre soutien, sans elles ce
Travail n'aurait pas été accompli.*

*A tout le membre de ma famille BOUSSAYED et a tout personnes qui m'ont
encouragé ou aidé au long de mes études*

MAROUA

2025

Liste des abréviations

ACE :enzyme de conversion de l'angiotensine.

ROS: espèces réactives de l'oxygène

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

FRAP : FerricReducingAntioxidant Power

ABTS : 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acid)

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

ATB : Antibiotique

mm : Millimètre

mg : Milligramme

µl : Microlitre

DO : Densité Optique

UFC : Unité Formant Colonie

IC₅₀ : Inhibitory Concentration 50%

PDA : Potato Dextrose Agar

Liste des tableaux

Tableau 1: classification taxonomique de <i>punica granatum</i>	7
Tableau 2: les différents souches utilisés	37
Tableau 3: Résultats des tests phytochimiques sur les deux régions de <i>Punica granatum</i>	41
Tableau 4: Activité antibactérienne d'extrait éthanolique de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	42
Tableau 5: Activité antibactérienne d'extrait infusion de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	42
Tableau 6 : Activité antibactérienne d'extrait aqueux de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	43
Tableau 7 : Activité antibactérienne d'extrait aqueux de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.....	44
Tableau 8: Activité antibactérienne d'extrait infusion de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.....	44
Tableau 9: Activité antibactérienne d'extrait éthanolique de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.....	44
Tableau 10 : Activité fongique d'extrait éthanolique de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	48
Tableau 11: Activité fongique d'extrait aqueux de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	48
Tableau 12:Activité fongique d'extrait infusion de <i>Punica granatum</i> de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	48
Tableau 13: Activité fongique d'extrait éthanolique de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.....	49
Tableau 14: Activité fongique d'extrait aqueux de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm	49

Tableau 15: Activité fongique d'extrait infusion de <i>Punica granatum</i> de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.....	50
Tableau 16 : les différentes concentrations minimales inhibitrice des différents extraits enmg/ml.	52
Tableau 17 : les différentes concentrations minimales inhibitrice des différents extraits en mg/ml	54

Liste des figures

Figure 1: centre d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov (Sanchez-Monge, 1974)	7
Figure 2: Arbre de grenadier.....	8
Figure 3: feuilles du grenadier.....	9
Figure 4: Fleurs du grenadier.....	9
Figure 5: fruit du grenadier.....	10
Figure 6: L'écorce du grenadier	10
Figure 7: Structure générale des composés flavonoïdes (Miramont, 2021).....	14
Figure 8 : structures dessous-groupes de flavonoides	15
Figure 9 : structure de la molécule de tanin.....	16
Figure 10: structure principaux anthocyanes (labbé ,2008).....	17
Figure 11: structure de base des coumarines (Karamat ,2013).....	17
Figure 12 : structure générale des dérivés des stérols (Chemdoodle et al., 2016)	19
Figure 13: structure chimique des hormones stéroïdes (Musial et al., 2021).....	20
Figure 14: Structure typique des saponosides (Frasca et al.,2012)	21
Figure 15: Schéma de l'extraction éthanolique et aqueux des écorces de fruits de <i>Punica granatum</i>	30
Figure 16 : mécanisme réactionnelle du test DPPH	35
Figure 17: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait éthanolique A.....	57
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait éthanolique B.....	57
Figure19: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait aqueux A	58
Figure 20: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait aqueux B	58

Figure 21: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait Infusion A	58
Figure 22: pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait Infusion B	59
Figure 23: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour acide ascorbique	59
Figure 24: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait Aqueux B	61
Figure 25: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait Aqueux A	61
Figure 26: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait d'Infusion A	61
Figure 27: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait d'infusion B.....	62
Figure 28: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'acide ascorbique	62

Résumé

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités biologiques des extraits (infusion, extrait aqueux et extrait éthanolique) de l'écorce de la plante *Punicagranatum* (grenadier) récolté de deux régions de la wilaya de Saïda : Hammam Rabi(A) et Ain sultane(B).

Les tests phytochimiques ont révélé la richesse des extraits en flavonoïdes, tanins, stérols triterpènes et les composés réducteurs avec une absence totale d'amidon dans les extraits des deux régions.

L'activité antioxydant a été évaluée par le test de piégeage des radicaux libres DPPH. Les extraits de la région A ont montré une activité antioxydant remarquable notamment pour l'infusion aqueuse suivie par l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique avec des IC₅₀ de 0,01 mg/ml, 0,03mg/m et 0,48 mg/ml respectivement, Alors que les extraits de la région B ont présenté une bonne activité légèrement inférieure a la précédente avec des IC₅₀=0,11 mg/ml, 0,06, 0,77 mg/ml pour l'extrait aqueux, l'infusion aqueuse et l'extrait éthanolique dans cet ordre. Le Test de FRAP .l'extrait aqueux B (AB) s'est révélé le plus prometteur, avec une IC₅₀ de 0,20 mg/ml, traduisant une forte activité antioxydante. Il est suivi de l'extrait aqueux A (AA) et de l'infusion A (IA), qui présentent des activités modérées avec des IC₅₀ respectives de 1,37 mg/ml et 1,38 mg/ml. En revanche, l'infusion B (IB) a montré une activité antioxydante faible, avec une IC₅₀ relativement élevée de 3,84 mg/ml

L'évaluation de l'activité antimicrobienne, effectuée par la méthode de diffusion sur gélose en puits a ciblé huit souches microbiennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albican*, *fusarium oxysporum*, *phytophthora*). L'extrait éthanolique de la région (A) a montré une forte inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (13–16 mm) et *Escherichia coli* (19–25 mm) alors que les deux extraits (aqueux et infusion) ont présenté une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètre de zone d'inhibition de (20 à 14 mm) et (23 à 10 mm) respectivement. La souche *Klebsiella pneumoniae* s'est révélée très sensible envers l'extrait aqueux de la région B (17–7 mm ; CMI = 8,5 mg/ml) et les autres extraits (infusion et éthanolique) montrent une bonne activité contre *staphylococcus* avec des diamètres de zones d'inhibitions allant de 20 à 8 mm et CMI (0,97 et 2,5 mg/ml) respectivement. Concernant les souches fongiques, *Candida albican* à montrer une forte sensibilité aux trois extraits de la région A avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 25 mm et des CMI de (0,46 à 7,5 mg/ml) tandis que pour la région B, les deux extrait éthanolique et aqueux ont montré une activité élevés contre la souche *fusarium oxysporum* avec des diamètres de zones d'inhibitions (23à 20mm) de CMI 3,89mg/ml pour le premier et diamètres de zones d'inhibitions (15 à 11) mm de CMI 2,12mg/ml pour le deuxième.

Enfin, les résultats du test de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont démontré que les extraits des deux régions étudiées ont un effet bactériostatique contre les souches bactériennes testés. Ces résultats suggèrent que l'écorce de *Punicagranatum* constitue une source naturelle prometteuse de composés bioactifs pouvant être exploités à des fins thérapeutiques.

Mots-clés: *Punicagranatum*, tests phytochimique, activité antioxydant, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

As part of this study, we focused on evaluating the biological activities of extracts (infusion, aqueous extract, and ethanolic extract) from the bark of the *Punicagranatum* (pomegranate) plant, collected from two regions of the Wilaya of Saida: Hammam Rabi (A) and Ain Sultane (B).

Phytochemical tests revealed the richness of the extracts in flavonoids, tannins, triterpenes sterols, and reducing compounds, with a complete absence of starch in the extracts from both regions.

The antioxidant activity was evaluated using the DPPH free radical scavenging test. Extracts from region A showed remarkable antioxidant activity, particularly the aqueous infusion, followed by the aqueous extract and ethanolic extract, with IC₅₀ values of 0.01 mg/ml, 0.03 mg/ml, and 0.48 mg/ml, respectively. In comparison, extracts from region B also presented good antioxidant activity, slightly low than the previous, with IC₅₀ values of 0.11 mg/ml, 0.06 mg/ml, and 0.77 mg/ml for the aqueous extract, aqueous infusion, and ethanolic extract, respectively. FRAP Test .Aqueous extract B (AB) proved the most promising, with an IC₅₀ of 0.20 mg/ml, reflecting strong antioxidant activity. It was followed by Aqueous Extract A (AA) and Infusion A (IA), which showed moderate activities with IC₅₀ of 1.37 mg/ml and 1.38 mg/ml respectively. In contrast, infusion B (IB) showed low antioxidant activity, with a relatively high IC₅₀ of 3.84 mg/ml

The evaluation of antimicrobial activity was carried out using the agar well diffusion method, targeting eight microbial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, and *Phytophthora sp.*). The ethanolic extract from region A showed strong inhibition against *Staphylococcus aureus* (13–16 mm) and *Escherichia coli* (19–25 mm), while the aqueous and infusion extracts also demonstrated good activity against *Staphylococcus aureus*, with inhibition zone diameter ranging from 20 to 14 mm and 23 to 10 mm, respectively. The *Klebsiella pneumonia* strain was found to be very sensitive to the aqueous extract from region B (17–7 mm; MIC = 8.5 mg/ml), while the other extracts (infusion and ethanolic) also showed good activity against *Staphylococcus*, with inhibition zones ranging from 20 to 8 mm and MICs of 0.97 and 2.5 mg/ml, respectively.

As for the fungal strains, *Candida albicans* showed high sensitivity to all three extracts from region A, with inhibition zones reaching up to 25 mm and MIC ranging from 0.46 to 7.5 mg/ml. In region B, both the ethanolic and aqueous extracts exhibited strong activity against the *Fusarium oxysporum* strain, with inhibition zones ranging from 23 to 20 mm (MIC = 3.89 mg/ml) for the former, and 15 to 11 mm (MIC = 2.12 mg/ml) for the latter.

Finally, the results of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test showed that the extracts from both studied regions had a **bacteriostatic effect** on the tested bacterial strains. These results suggest that *Punicagranatum* bark is a promising natural source of **bioactive compounds** that can be exploited for therapeutic purposes.

Keywords: *Punicagranatum*, phytochemical tests, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.

ملخص

في إطار هذه الدراسة، ركزنا على تقييم الأنشطة البيولوجية لمستخلصات (النقيع، المستخلص المائي، والمستخلص الإيثانول) لقشور نبات *Punicagranatum* (الرمان)، والتي تم جمعها من منطقتين في ولاية سعيدة: حمام ربي (A) وعين سلطان. (B)

كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية عن غنى هذه المستخلصات بالفلافونويدات، والعفص (التانينات)، والستيرولات ثلاثية التربينات، والمركبات المختزلة، مع غياب تام للنشاء في المستخلصات المستخرجة من كلا المنطقتين.

تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام اختبار احتجاز الجذور الحرة DPPH. وقد أظهرت مستخلصات المنطقة A نشاطاً مضاداً للأوكسدة ملحوظاً، خصوصاً النقيع المائي، يليه المستخلص المائي، ثم المستخلص الإيثانولي، حيث بلغت قيم IC50 على التوالي: 0.01 ملغ/مل، 0.03 ملغ/مل، و0.48 ملغ/مل. أما مستخلصات المنطقة B، فقد أظهرت بدورها نشاطاً جيداً ولكن أقل قليلاً من سابقتها، حيث كانت قيم IC50: 0.11 ملغ/مل، 0.06 ملغ/مل، و0.77 ملغ/مل للمستخلص المائي، النقيع المائي، والمستخلص الإيثانولي، على الترتيب. اختبار FRAP أظهر المستخلص المائي B أكثر نشاطاً واعداءً، حيث بلغ التركيز الفعال لمضادات الأوكسدة 0.20 ملغ/مل مما يعكس نشاطاً قوياً مضاداً للأوكسدة. وأعقب ذلك المستخلص المائي A و النقيع المائي A، اللذان أظهرتا نشاطاً معتدلاً مع تركيز مركب IC50 لكل منهما قدره 1.37 مجم/مل و1.38 مجم/مل. في المقابل، أظهر النقيع المائي B نشاطاً منخفضاً مضاداً للأوكسدة، مع تركيز مركزي فعال مرتفع نسبياً يبلغ 3.84 مجم/مل.

تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة النشر في الأجار عبر الآبار، واستهدف التقييم ثمانية سلالات ميكروبية هي: *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus sp.*، *Bacillus cereus*، *Candida albican*، *Klebsiella pneumoniae*، *Fusarium oxysporum*، و *Phytophthora sp.* وقد أظهر المستخلص الإيثانولي من المنطقة A قدرة تثبيط قوية تجاه *Staphylococcus aureus* (13–16 مم) و *Escherichia coli* (19–25 مم)، بينما أظهر كل من المستخلص المائي والنقيع نشاطاً جيداً ضد *Staphylococcus aureus*، حيث تراوحت أقطار مناطق التثبيط بين (20–14 مم) و(23–10 مم) على التوالي.

أما سلالة *Klebsiella pneumoniae* فقد أظهرت حساسية عالية للمستخلص المائي من المنطقة 7–17 B مم؛ MIC = 8.5 ملغ/مل)، كما أظهرت المستخلصات الأخرى (النقيع والإيثانولي) نشاطاً جيداً ضد *Staphylococcus aureus*، بأقطار تثبيط تراوحت بين 20 و8 مم، وقيم MIC بلغت 0.97 و2.5 ملغ/مل على التوالي.

بالنسبة للسلالات الفطرية، فقد أبدت *Candida albican* حساسية قوية لجميع المستخلصات من المنطقة A، بأقطار تثبيط بلغت حتى 25 مم وقيم MIC تراوحت بين 0.46 إلى 7.5 ملغ/مل. أما في المنطقة B، فقد أظهر كل من المستخلص الإيثانولي والمائي نشاطاً مرتفعاً ضد *Fusarium oxysporum*، بأقطار تثبيط تراوحت بين 23 و20 مم (MIC = 3.89 ملغ/مل) للمستخلص الإيثانولي، و15 إلى 11 مم (MIC = 2.12 ملغ/مل) للمستخلص المائي.

أخيراً، أظهرت نتائج اختبار التركيز القاتل البكتيري الأدنى (CMB) أن المستخلصات من كلا المنطقتين المدروستين لها تأثير مثبط للبكتيريا على السلالات البكتيرية المختبرة. وتشير هذه النتائج إلى أن قشور *Punicagranatum* تمثل مصدراً طبيعياً واعدداً للمركبات الحيوية النشطة التي يمكن استغلالها لأغراض علاجية.

الكلمات المفتاحية: *Punicagranatum*: اختبارات كيميائية نباتية، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات.

Table des matières

REMERCIEMENT.....	I
DEDICACE.....	II
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VIII
RESUME.....	VIII
ABSTRACT	IX
ملخص	X
TABLE DES MATIERES	XI
PARTIE I : INTRODUCTION.....	1
INTRODUCTION.....	2
PARTIE II : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1. LES PLANTES MEDICINALES	5
I.1.1. GENERALITES	5
I.2. LA PLANTE <i>PUNICAGRANATUM</i>	6
I.2.1. GENERALITES SUR LE GRENADIER	6
I.2.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU GRENADIER.....	6
I.2.3. CLASSIFICATION TAXONOMIQUE	7
I.2.4. NOMENCLATURE	8
I.2.5. DESCRIPTION BOTANIQUE.....	8
I.2.5.1. Les feuilles	9
I.2.5.2. Les fleurs.....	9
I.2.5.3. Les fruits.....	9
I.2.5.4. L'écorce	10
I.2.6. L'UTILISATION DE LA GRENADE	11
I.2.6.1. L'utilisation en médecine traditionnelle.....	11
I.2.6.2. Activité antibactérienne.....	11
I.2.6.3. L'activité antifongique.....	11
I.2.6.4. Lutte contre le cancer	12
I.2.6.5. Activité contre le diabète	12
I.2.6.6. Effet cardiovasculaire.....	12
I.3. LES COMPOSES PHENOLIQUES	13
I.3.1. LES METABOLITES SECONDAIRES.....	13
I.3.2. LES COMPOSES PHENOLIQUE.....	14
I.3.2.1. Les flavonoïdes	14
I.3.2.2. Les tannins	15
I.3.2.3. Anthocyanines.....	16
I.3.2.4. Commarin.....	17
I.3.2.5. Les alcaloïdes	18
I.3.2.5.1. Classification des alcaloïdes.....	18
I.3.2.6. Les stérols.....	19
I.3.2.7. Les stéroïdes :.....	19

I.3.2.7.1. Types de stéroïdes et leurs principales fonctions:	20
I.3.2.8. Saponines (saponosides):	21
I.4. LES ACTIVITES BIOLOGIQUES	22
I.4.1. L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	22
I.4.1.1. Le stress oxydant.....	22
I.4.1.2. Les antioxydants.....	22
I.4.1.2.1. Antioxydants endogènes	22
I.4.1.2.2. Antioxydants exogènes	23
I.4.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydant.....	23
I.4.1.3.1. Le test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyl (DPPH).....	23
I.4.1.3.2. . Le test de la réduction de fer FRAP	24
I.4.2. L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	24
PARTIE III : MATERIEL ET METHODES	26
III. INTRODUCTION	27
III.1.MATERIEL VEGETAL	27
III.2. METHODES	28
III.2.1. PREPARATION DES DIFFERENTS EXTRAITS DE <i>PUNICAGRANATUM</i>	28
II.1.1. EXTRAIT BRUT ETHANOLIQUE	29
II.1.2. EXTRAIT BRUT AQUEUX.....	29
II.1.3. INFUSION AQUEUSE	30
II.2.TESTS PHYTOCHIMIQUES.....	30
1. DIFFERENTES CLASSES RECHERCHEES	30
1.1. LES TANNINS.....	30
1.2. LES FLAVONOÏDES	31
1.3. LES ANTHOCYANES.....	31
1.4. LES COUMARINES	31
1.5. LES ALCALOÏDES.....	31
1.6. STEROLS ET TRITERPENES	32
1.7. LES SAPONOSIDES	32
1.8. LES COMPOSES REDUCTEURS	33
1.9. L'AMIDON.....	34
II.3.EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	34
II.3.1.TEST DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH. (2,2-DIPHENYL 1-1PICRYLHYDRAZYL) 34	
II.3.2.REDUCTION DU FER : FRAP (<i>FERRICREDUCING ANTIOXYDANT POWER</i>)	36
II.4.EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE :	37
II.4.1.LES SOUCHES BACTERIENNES.....	37
II.4.2.REPIQUAGEDES SOUCHE MICROBIENNE	37
II.4.3.PREPARATION DE L'INOCULUM :	37
II.4.4. METHODE DES PUIITS	38
3.DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) ET BACTERICIDE (CMB).....	39
PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSION.....	40
IV. LES TESTS PHYTOCHIMIQUES	41

ACTIVITES BIOLOGIQUES IN VITRO DES EXTRAITS DE <i>PUNICAGRANATUM</i> :	42
ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE <i>PUNICAGRANATUM</i>	42
ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	42
EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE	47
DETERMINATION DE LA (CMI)ET (CMB).....	52
CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE (CMB).....	56
ACTIVITE ANTIOXYDANTS	57
TEST DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH	57
LE TEST DE LA REDUCTION DE FER FRAP	60
PARTIE V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	64
CONCLUSION	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
PARTIE VII : ANNEXES.....	70
ANNEXE.....	71

Partie I : Introduction

Introduction

Depuis l'Antiquité, l'homme s'appuie sur les plantes pour promouvoir la santé et traiter diverses maladies. Les plantes produisent une large gamme de composés bioactifs qui jouent un rôle de défense contre les agents pathogènes et les stress environnementaux. Ces composés sont classés comme métabolites secondaires et ont de multiples fonctions biologiques, notamment des propriétés anti-inflammatoires.

Les plantes médicinales continuent d'être une riche source de remèdes naturels ciblant un large éventail de maladies. Environ 150 000 espèces de plantes ont été étudiées et on a découvert que nombre d'entre elles contenaient des composés médicalement actifs. Ces dernières années, les applications des extraits de plantes dans le domaine pharmaceutique ont connu un développement remarquable, l'accent étant mis de plus en plus sur la découverte de nouveaux composés chimiques dotés d'un pouvoir thérapeutique.(**jancydani ,2024**).

Le fruit de grenadier (*Punicagranatum* L.), qui appartient à la famille des Punicaceae, est une plante qui suscite un grand intérêt depuis l'Antiquité en raison de ses propriétés uniques. Des recherches ont montré que la grenade est riche en tanins et en composés phénoliques. On attribue à ces composés la capacité de la grenade à perturber les processus cellulaires des parasites, ce qui lui confère un effet antiparasitaire. Ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires contribuent également à réduire la croissance des cellules cancéreuses.(**kubrakelleci ,2025**)

Originnaire de la région méditerranéenne, la grenade est connue pour ses nombreux bienfaits médicaux. Son intégration dans le régime alimentaire aide à réguler la tension artérielle, le taux de cholestérol et de sucre dans le sang, et à traiter les problèmes digestifs, les maux de gorge, la toux, les maladies cardiaques, ainsi que les infections des voies urinaires. Des études cliniques suggèrent que la grenade peut améliorer le flux sanguin vers le cœur, empêcher la coagulation du sang et réduire l'accumulation de plaque dans les artères, contribuant ainsi à prévenir les maladies cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux et les crises cardiaques. Certaines recherches ont également montré son efficacité dans la lutte contre divers types de cancer, tels que le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer de la peau. Les fruits, les écorces et les graines de grenade possèdent diverses propriétés thérapeutiques. Le jus de grenade est utilisé pour traiter la diarrhée et la jaunisse, tandis

que l'extrait de fleur de grenade est utilisé pour arrêter les saignements du nez et des gencives, unifier le teint de la peau et pour d'autres usages médicaux et cosmétiques.(**Maureen Mohan,2024**)

L'objectif principal de ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'écorce de *Punicagranatum* utilisée dans la médecine traditionnelle tout en évaluant leur propriété biologique à savoir, l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne. Notre travail est divisé en trois parties principales

La première partie est consacrée à un résumé bibliographique qui comprend des informations générales sur la grenade, sa composition phytochimique et ses utilisations thérapeutiques, les activités antioxydantes, la classification et les propriétés des composés phénoliques et les activités biologiques.

La deuxième partie décrit le protocole expérimental, en exposant les techniques utilisées pour préparer différents extraits de l'écorce du fruit de *Punicagranatum*, effectuer des tests phytochimiques avec l'identification des composés phénoliques dans les extraits préparés, et évaluer les propriétés antioxydantes des composés phénoliques dans les extraits préparés. La partie II décrit les techniques utilisées pour préparer les différents extraits et évaluer l'activité antioxydante des différents extraits en utilisant la technique de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazylhydrazine (DPPH) et le pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP), puis à l'étude leur effet antibactérien et antifongique et méthode de CMI et CMB.

La troisième partie présentera les résultats obtenus, suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

Partie II : synthèse bibliographique

I.1. Les plantes médicinales

I.1.1. Généralités

Depuis des milliers d'années, les plantes médicinales fournissent des substances thérapeutiques essentielles et établissent des pratiques de guérison traditionnelles. Elles sont d'une importance capitale pour le bien-être de l'homme dans le monde entier (**Manisha et al.,2025**)

Une plante médicinale est une plante qui porte dans l'une de ses parties des composés utiles pour le traitement ou pour la fabrication de médicaments modernes. La richesse de ses récepteurs secondaires, notamment les alcaloïdes, les tri nucléotides, les glycosides, les amines, les stéroïdes et les flavonoïdes, constitue une ressource essentielle pour la découverte et la production de médicaments. À l'échelle mondiale, on estime qu'entre 50 000 et 80 000 espèces de plantes à fleurs remplissent ces fonctions bénéfiques pour la santé(**Yurong Yang et al.,2025**)

Les avancées scientifiques des dernières décennies ont confirmé l'efficacité des propriétés médicinales de nombreuses plantes, et malgré le développement de la chimie de synthèse, les plantes médicinales ne sont pas encore disponibles. Les plantes médicinales conservent une place importante grâce à leurs effets bénéfiques dans diverses thérapies. Elles contiennent des principes actifs essentiels dans la lutte contre de nombreuses maladies et sont également présentes dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. (**Mohamed et Farh,2022**).

I.2. La plante *Punicagranatum*

I.2.1. Généralités sur le grenadier

Ces dernières années, le fruit de la grenade (*Punicagranatum*) a fait l'objet d'une attention croissante en raison de ses bienfaits potentiels pour la santé(**Charalampia et Antonios,2017**)

La grenade est cultivée depuis l'Antiquité pour son goût délicieux, mais elle est aussi utilisée comme plante ornementale grâce à ses fleurs de couleur distinctive allant du rouge-orange au jaune crème. Elle est connue sous plusieurs noms, notamment pomme chinoise, pomme de Carthage ou pomme à pépins. Elle est considérée comme l'un des superfruits modernes en raison de ses bienfaits pour la santé et de sa haute valeur nutritionnelle. La grenade (*Punicagranatum*) appartient à la famille des Punicaceae. Les grenades sont originaires d'Iran et de la région de l'Himalaya et sont largement cultivées dans des pays tels que l'Iran, l'Inde, l'Espagne, les États-Unis et la plupart des pays du Proche et du Moyen-Orient(**Sengram D,2014**)

I.2.2. Répartition géographique du grenadier

Les grenades sont originaires de Perse, plus précisément de la région d'Ajin, actuellement située en Iran, ainsi que de certaines régions d'Afghanistan, d'Azerbaïdjan et d'autres pays. Elle s'est ensuite répandue vers l'est en Inde et en Chine, et vers l'ouest dans les pays méditerranéens tels que le Maroc, l'Égypte, la Tunisie et la Turquie. Les grenadiers s'adaptent très bien aux différentes conditions climatiques et poussent avec succès dans les régions subtropicales et tropicales, ce qui témoigne de leur résistance et de leur capacité d'adaptation à une grande variété d'environnements et de zones géographiques. (**Sarkhosh et al.,2020**)

L'Algérie occupe une place de choix parmi les pays producteurs de grenade. Malgré les défis techniques et économiques qui entravent la filière, notamment en termes d'exportation, lors de la campagne 2013/2014, la situation de l'Algérie au sein du bassin méditerranéen lui a permis d'être l'un des premiers producteurs de grenade, avec une production de 81 390 tonnes. La superficie cultivée était estimée à 9 439 hectares, avec un rendement de 8 620 kg/ha (**Lahouel et Belhadj, 2022**).



Figure 1: centre d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov (**Sanchez-Monge, 1974**)

I.2.3. Classification taxonomique

Tableau 1: classification taxonomique de *Punicagranatum*

Règne	Plantae
Sous-règne	<i>Trachéobionte</i>
Super division	<i>Spermatophytes</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>MYR tale</i>
Famille	<i>Punicaceae</i>
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punicagranatum</i> <i>Linn</i>

I.2.4. Nomenclature

Nom scientifique : *Punicagranatum*

Nom français : grenadier

Nom anglais : pomegranate

Nom espagnol : Granados

Nom italien : Melograno

Nom arabe : Romane

(**Kaci Meziane et al., 2016**)

I.2.5. Description botanique

La grenade est une petite plante très ramifiée, mais elle peut atteindre jusqu'à 10 mètres de haut dans des environnements difficiles (**A Kumari et al., 2012**)

Les feuilles sont opposées et étroites, avec une longueur moyenne de 3,7 cm et une largeur d'environ 2 cm. Elle fleurit avec des fleurs aux couleurs vives, allant du rouge au rose, d'environ 3 cm de diamètre, avec quatre à cinq pétales.

Les fruits sont généralement de forme ronde à hexagonale, d'un diamètre de 5 à 12 cm et d'un poids moyen d'environ 200 grammes. Le fruit est propre à la consommation humaine. Le fruit se caractérise par une peau épaisse entourant environ 600 graines, et chaque graine est enfermée dans une coquille juteuse appelée arille (**Aida et al., 2014**)



Figure 2: Arbre de grenadier.

I.2.5.1. Les feuilles

Les grenades ont des feuilles coriaces, brillantes, étroites et en forme de lance (A Kumari et *al.*,2012)



Figure 3: feuilles du grenadier

I.2.5.2. Les fleurs

Les fleurs mesurent environ 3 cm de diamètre, avec des calices rouges pointus et un grand nombre d'étamines, deux fleurs sur sept apparaissant généralement à la périphérie de chaque branche (Syed Zameer et *al.*, 2021).



Figure 4: Fleurs du grenadier

I.2.5.3. Les fruits

Les fruits de la grenade sont grossièrement sphériques, d'un diamètre de 2 à 5 pouces, avec une peau extérieure dure et épaisse qui dépasse à la base. La couleur va généralement du jaune avec des accents roses au rouge foncé (CSivaraj et *al.*, 2018).



Figure 5: fruit du grenadier

I.2.5.4. L'écorce

Constituant plus de 40 % de l'ensemble du fruit, la peau de la grenade est une source importante de minéraux, en particulier de potassium, de calcium, de phosphore, de magnésium et de sodium (**Shubham et Anjali ,2017**).

L'écorce de grenade est reconnue pour ses nombreux bienfaits pour la santé (**Al-Obaidi et al., 2017**).

Le jus et l'écorce de grenade contiennent tous deux des catéchines, connues pour leur forte concentration en antioxydants et en anti-inflammatoires (**Madhura et al., 2024**).



Figure 6: L'écorce du grenadier

I.2.6. L'utilisation de la grenade

I.2.6.1. L'utilisation en médecine traditionnelle

Dans l'Antiquité, la grenade était considérée comme un symbole de fertilité en raison de sa richesse en graines, et faisait partie des sept espèces bénies de la terre. Les médecins grecs l'utilisaient pour traiter toute une série de maladies, telles que les infections, les vers intestinaux, la toux chronique, la diarrhée et la dysenterie, recommandant son jus comme traitement efficace pour ces affections (**A Kumari et al., 2012**)

Les premiers textes médicaux connus, tels que le Charaka Samhitâ, font référence aux propriétés curatives des racines et des écorces de grenade, qui sont utilisées depuis l'Antiquité dans la médecine traditionnelle pour traiter les parasites intestinaux. Ces utilisations étaient également connues dans les civilisations chinoise, romaine et arabe, ce qui démontre la diffusion des connaissances médicinales liées à cette plante à travers les cultures. Des rapports récents suggèrent que l'extrait d'éthanol de grenade possède des propriétés antibactériennes et peut contribuer à soulager les maladies inflammatoires (**Aida et al., 2014**)

I.2.6.2. Activité antibactérienne

La grenade, dont le nom scientifique est *Punicagranatum*, est reconnue pour ses nombreuses propriétés médicinales. Le fruit est une riche source de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes, qui ont démontré une forte activité antimicrobienne et anti-inflammatoire. Des recherches ont montré que l'écorce de grenade, en particulier, peut inhiber la croissance de plusieurs souches bactériennes, car ses composés phytochimiques sont censés détruire les parois cellulaires bactériennes et inhiber l'activité de leurs enzymes vitales(**RameshetMukil, 2025**).

I.2.6.3. L'activité antifongique

de l'écorce, des graines, du jus et des extraits de fruits entiers de grenade a été évaluée. Les résultats ont montré que l'activité antibactérienne la plus élevée concernait *Staphylococcus aureus*, tandis que l'effet antifongique le plus fort concernait *Aspergillus Niger*. Les données de l'étude utilisant *Punicagranatum* ont

également confirmé son puissant potentiel antimicrobien, en particulier contre les cellules de levure du genre *Candida* (**Rahmani et al., 2017**)

I.2.6.4. Lutte contre le cancer

La grenade est une riche source d'antioxydants tels que les polyphénols, les tanins et les anthocyanines, qui jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les radicaux libres, qui sont des sous-produits des processus oxydatifs associés à un risque accru de divers types de cancer tels que le cancer du sein, de la prostate et du poumon. Des études suggèrent que la consommation de jus de grenade peut contribuer à réduire la taille des tumeurs de la prostate chez les souris, ce qui serait dû à l'effet des antioxydants sur la réduction des dommages causés par les radicaux libres. Ainsi, la grenade renforce l'immunité de l'organisme, ce qui peut contribuer à réduire la probabilité de cancer (**Debjit et al., 2013**)

I.2.6.5. Activité contre le diabète

Le diabète est un problème de santé mondial croissant et il est nécessaire de trouver des solutions efficaces en matière de traitement et de prévention. Parmi les remèdes naturels utilisés dans la médecine traditionnelle indienne, la grenade (*Punicagranatum*) a été reconnue pour ses propriétés antidiabétiques, en particulier dans ses fleurs, ses graines et son jus. Ces propriétés sont dues à une série de composés actifs, notamment les acides oléanolique, ursolique et gallique, qui contribuent à réguler la glycémie et à améliorer la santé métabolique (**Neelam et Singh, 2012**).

I.2.6.6. Effet cardiovasculaire

La grenade est connue pour ses effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire, notamment pour abaisser la tension artérielle et prévenir les maladies cardiaques. Elle contient une série d'antioxydants puissants tels que les polyphénols, les tanins et les anthocyanes, qui aident à lutter contre l'athérosclérose. Des études montrent que la consommation de jus de grenade pendant deux semaines réduit l'activité de l'ACE dans le sang jusqu'à 36 %, ce qui entraîne une réduction significative de la pression artérielle systolique. Il a également été démontré que la grenade réduit les niveaux de lipoprotéines oxydées et stimule la production d'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales des artères coronaires, améliorant ainsi la

santé cardiaque et réduisant le risque de complications vasculaires (**Maureen et al., 2024**).

I.3. Les composés phénoliques

I.3.1. Les métabolites secondaires

Sont principalement des composés organiques de faible poids moléculaire produits par les bactéries, les champignons et les plantes, et se caractérisent par leur diversité chimique et leur capacité à réagir biologiquement (**Khade et al., 2023**)

Les métabolites secondaires des plantes ne sont pas impliqués dans des processus métaboliques essentiels tels que la croissance, mais ils sont d'une grande importance pour la survie des plantes. Ils agissent comme des mécanismes de défense contre les microbes et les insectes nuisibles, aident la plante à s'adapter à divers facteurs environnementaux et jouent un rôle dans la communication et l'adaptation avec les organismes environnants (**Singh et Pal, 2024**).

Les métabolites secondaires des plantes jouent un rôle vital en matière de défense et d'adaptation :

1. Propriétés antimicrobiennes:

- Inhibition de la croissance des agents pathogènes (bactéries et champignons)

2. Interactions compétitives :

- Sécrétion de composés allopathiques
- Inhibent la croissance des plantes concurrentes environnantes

3. Systèmes de signalisation biologique :

- Attirer les prédateurs naturels des ravageurs
- Transmission des signaux de stress entre les différentes parties de la plante
- Coordination des réponses de défense à l'intérieur du tissu végétal (**Bell et Olaoye, 2024**)

I.3.2. Les composés phénolique

Les composés phénoliques, largement présents dans toutes les espèces végétales, sont des métabolites secondaires issus de la voie du Shikimate et du métabolisme des phénylpropanoïde. Ils se caractérisent par la présence d'au moins un anneau aromatique de type benzène attaché à un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ces composés peuvent prendre des formes simples, comme les acides phénoliques, ou des structures polymériques complexes, comme les tanins condensés (**Laguna, 2019**).

I.3.2.1. Les flavonoïdes

Appartiennent à la famille des polyphénols, qui sont des molécules organiques réparties dans de nombreuses parties de la plante (**Karanga et al., 2024**)

Les flavonoïdes sont composés chimiquement d'un squelette de 15 carbones, dont un cycle aromatique hétérocyclique et un cycle phényle. Ces composés jouent un rôle essentiel dans la pigmentation et la défense des plantes, en plus de leurs multiples bienfaits pour la santé. Grâce à leurs propriétés antioxydantes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, les flavonoïdes sont largement utilisés dans les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les thérapies médicamenteuses. Ils peuvent influencer des processus enzymatiques vitaux au sein des cellules, ce qui renforce leur valeur thérapeutique et prophylactique. (**Parmanik et al., 2024**).

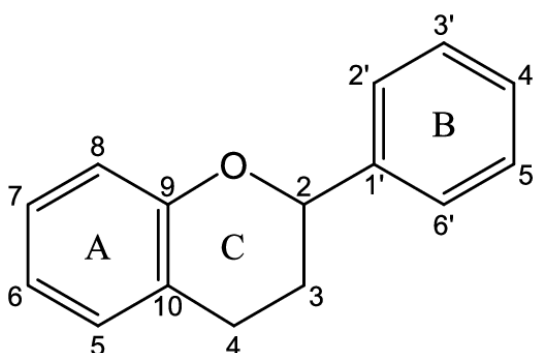


Figure 7: Structure générale des composés flavonoïdes (**Miramont, 2021**)

Les flavonoïdes sont classés dans les groupes suivants :

Flavanols

Les flavones

Les flavanones

Anthocyanidines

Les isoflavones.

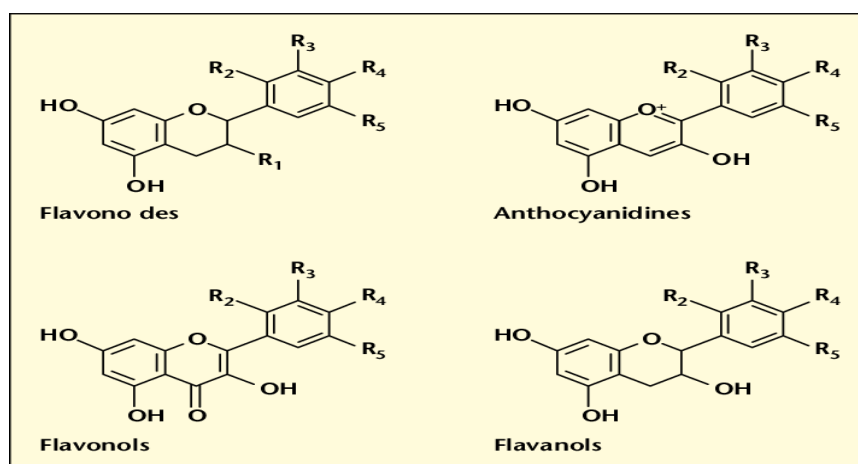


Figure 8 :structures dessous-groupes de flavonoides
(Tzanova et al., 2020)

I.3.2.2. Les tannins

Sont des composés chimiques appartenant au groupe des **polymères phénoliques**, qui se composent de plusieurs unités phénoliques liées entre elles.(Benarous ,2022).

Les tanins sont généralement divisés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Il joue un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les attaques de parasites et les aide à résister aux conditions climatiques extrêmes, notamment aux sécheresses, aux températures élevées et à l'effet néfaste des rayons UV (Khade et al., 2023).

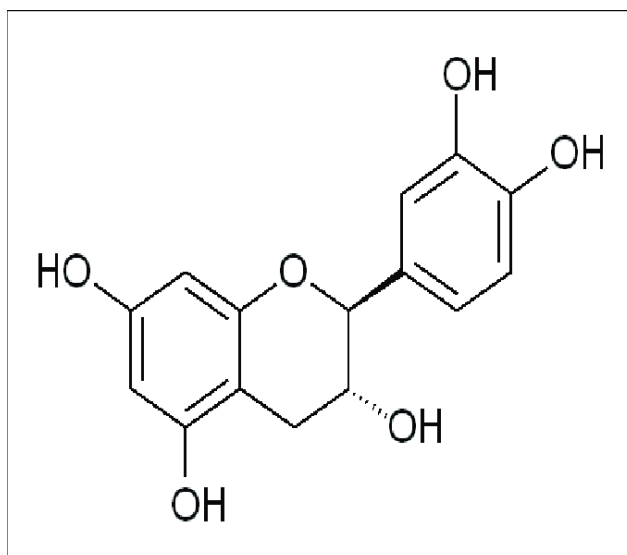


Figure 9 :structure de la molécule de tanin

(Komalasari et *al.*, 2018)

I.3.2.3. Anthocyanines

Sont des glycosides hydrosolubles des anthocyanidines (Ruth Alara et *al.*, 2021).

Les anthocyanes appartiennent au groupe des flavonoïdes et sont des composés polys phénoliques qui font partie du métabolisme secondaire des plantes. L'apparition de couleurs violettes, rouges et bleues dans de nombreuses plantes indique la présence de ces composés (Khade et *al.*, 2023).

Les anthocyanes sont des pigments phénoliques naturels dotés d'une puissante activité biologique, en particulier de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces composés ont une grande variété de propriétés biophysiques et des études ont montré leur efficacité dans le traitement du diabète et du cancer, ainsi que leur rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires et les troubles neurologiques. Les anthocyanes font partie des flavonoïdes les plus étudiés et se retrouvent comme les pigments dans de nombreux aliments, auxquels ils donnent leurs couleurs violette, rouge et rose. Sur le plan structural, ces composés sont le résultat de la dégradation des flavonoïdes et sont composés d'unités aglycones hétérogènes. Les molécules d'anthocyanes diffèrent les unes des autres principalement par plusieurs facteurs, tels que la position des ligands, la nature et le nombre d'unités de sucre aliphatiques ou de groupes carboxyliques aromatiques attachés au sucre, ainsi que le nombre de groupes fonctionnels attachés à l'unité aglycone (Ruth Alara et *al.*, 2021).

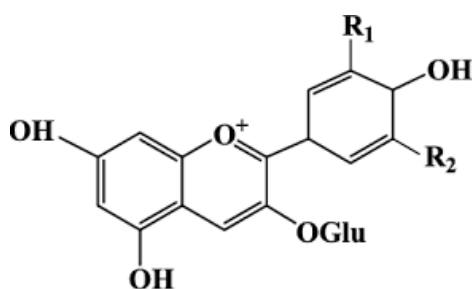


Figure 10: structure principaux anthocyanes (Iabbé ,2008)

I.3.2.4. Commarin

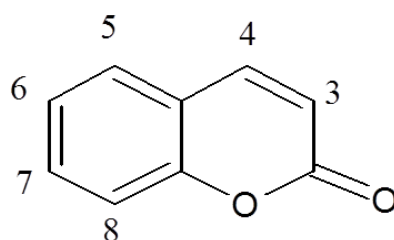
Appartient au groupe des composés phénoliques et est formée par la fusion d'un anneau de benzène avec un anneau de pyrone (**Khade et al., 2023**).

La coumarine se caractérise par une structure cyclo coumarine (C6-C3), formant un système hétérocyclique (**Benarous ,2022**).

Propriétés et fonctions biologiques Elle possède une activité antibactérienne, ainsi que des propriétés protectrices contre les champignons et les herbivores, grâce à une série de composés bioactifs présents dans toute la plante.

Classification chimique: Les dérivés de la coumarine peuvent être classés en six groupes principaux en fonction de leur structure moléculaire :

1. Dihydrofuranes simples
2. Type de limerine
3. Pi coumarine(**Parmanik et al., 2024**)

Figure 11: structure de base des coumarines (**Karamat ,2013**)

I.3.2.5. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels que l'on trouve principalement dans les plantes, telles que les algues marines, et rarement dans certains organismes animaux.

Les alcaloïdes sont concentrés dans différentes parties des plantes productrices de graines, telles que : - coquilles - l'écorce - les fruits - les racines - Feuilles

La plupart des alcaloïdes se caractérisent par la présence d'un **hétérocycle** (anneau contenant au moins un atome d'azote) dans leur structure moléculaire (**Dumore et al., 2023**).

I.3.2.5.1. Classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont classés en plusieurs groupes sur la base des critères suivants. Le système hétérocyclique de leur structure chimique.

Les précurseurs biosynthétiques (les composés primaires dont ils sont dérivés).
Principaux groupes: - Alcaloïdes indoliques par exemple l'ergotamine, Alcaloïdes puriques par exemple la caféine, Alcaloïdes de quinoléine par exemple la quinine, Alcaloïdes de l'iso quinoléine ex. morphine, Alcaloïdes du propane ex atropine, Alcaloïdes de l'imidazole par exemple l'histamine

. Chaque type diffère dans ses propriétés pharmacologiques et physiologiques en fonction de sa structure chimique unique (**Babazed and Zandavar, 2023**).

Pendant des siècles, les alcaloïdes des plantes ont été utilisés dans le domaine médical, formant la base de nombreux médicaments et poisons traditionnels, Nombre de ces composés sont encore utilisés aujourd'hui dans l'industrie pharmaceutique. Les anciens l'utilisaient pour traiter diverses maladies, telles que les morsures de scorpion et de serpent Les morsures de scorpion et de serpent, La fièvre et les maladies infectieuses, Les troubles mentaux et nerveux, Entre dans la composition de médicaments liquides et de remèdes populaires.

Certains alcaloïdes (comme la strychnine et le curare) sont **très toxiques**, mais présentent des effets thérapeutiques efficaces lorsqu'ils sont utilisés à des doses précises, Ils jouent un rôle de défense dans les plantes, les protégeant contre :

- Les insectes et les herbivores, Les plantes concurrentes inhibent leur croissance grâce à des substances chimiques actives. Les alcaloïdes combinent avantages thérapeutiques et risques toxicologiques, ce qui en fait certains des composés naturels les plus intéressants en pharmacologie et en biochimie (**Roy, 2017**).

I.3.2.6. Les stérols

Stérol sont des composés stéroïdiens de structure spécifique, caractérisés par le fait qu'ils sont des molécules amphiphiles (**Noiriel**).

Les stérols appartiennent au groupe des stéroïdes et se composent de trois anneaux à six carbones et d'un anneau à cinq carbones, avec une chaîne latérale au niveau du carbone 17. Ils se caractérisent par la présence d'une double liaison entre le cinquième et sixième atome de carbone, ainsi que d'un groupe hydroxyle sur le troisième atome de carbone (**Derwiaka et Pydym, 2024**).

Ils ont de vastes applications thérapeutiques en raison de leur puissance biologique, étant utilisés comme anti-inflammatoires, antioxydants, ainsi que dans le traitement du diabète et la prévention du cancer (**Pereira et al., 2017**).

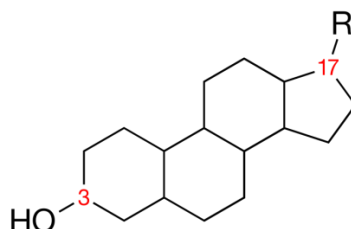


Figure 12 : structure générale des dérivés des stérols (**Chemdoodle et al., 2016**)

I.3.2.7. Les stéroïdes :

Les stéroïdes sont des composés dont le noyau tanopréhydro-phénanthrène est hydrophobe (non polaire) et qui sont modifiés par l'ajout de groupes fonctionnels hydrophiles (polaires), soit sur la structure du noyau lui-même, soit sur les chaînes latérales qui y sont attachées (**Makin et al., 2010**).

Les stéroïdes forment une grande famille de composés biologiques qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. L'un des plus importants est le **cholestérol**, qui est un composant essentiel des membranes cellulaires et le point central de la synthèse d'autres hormones stéroïdiennes.

I.3.2.7.1. Types de stéroïdes et leurs principales fonctions:

1. Hormones corticosurrénales (telles que le cortisol et l'aldostérone) :
Contrôlent le métabolisme et l'équilibre hydrosodé dans l'organisme.

2. Hormones sexuelles (androgènes, œstrogènes, progestatifs) :

- Régulent le développement et la fonction sexuels et contribuent aux caractéristiques sexuelles secondaires.

3. Sels biliaires (par exemple, sels d'acide cholique et désoxycholique, liés à la glycine ou à la taurine) :

- Contribuent à la digestion et à l'absorption des graisses dans les intestins.

4. Vitamine D (calcitriol):

- Joue un rôle clé dans la régulation du taux de calcium et la santé des os.

Les stéroïdes se caractérisent par leur capacité à influencer les réponses physiologiques telles que :

- Homéostasie métabolique (glucocorticoïdes).

- L'équilibre électrolytique (minéralocorticoïdes).

- La reproduction et la maturation sexuelle (hormones sexuelles).

- La digestion (sels biliaires).

- Régulation minérale et osseuse (vitamine D).

Avec une telle diversité, les stéroïdes restent des éléments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme (**Bhawani et al., 2010**)

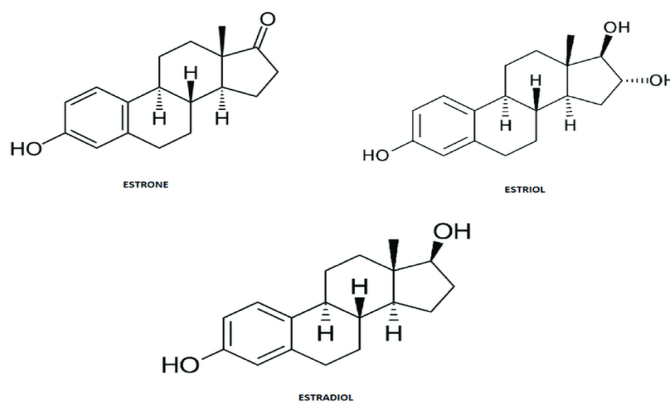


Figure 13: structure chimique des hormones stéroïdes (**Musial et al., 2021**)

I.3.2.8. Saponines (saponosides):

Composés végétaux constitués d'une partie stéroïdienne (Sapogène) attachée à un sucre. Ils se dissolvent dans l'eau pour former une mousse et ont des propriétés tensioactives, ce qui les rend utiles dans les applications pharmaceutiques et industrielles. Propriétés - Amphiphiles hydrophiles et hydrophobes, Commun dans les plantes supérieures, Forme des solutions colloïdales mousseuses (**Bétina, 2014**).

Les saponines sont classées en deux catégories : les saponines naturelles et les saponines acides (**Desai et al., 2009**).

Il a été prouvé que les saponines ont des effets bénéfiques sur la santé, comme la réduction du cholestérol et les propriétés anticancéreuses. Il est l'un des ingrédients actifs de nombreux médicaments à base de plantes qui contribuent aux effets bénéfiques sur la santé d'aliments tels que les graines de soja et l'ail (**Ustundag et Mazza, 2007**).

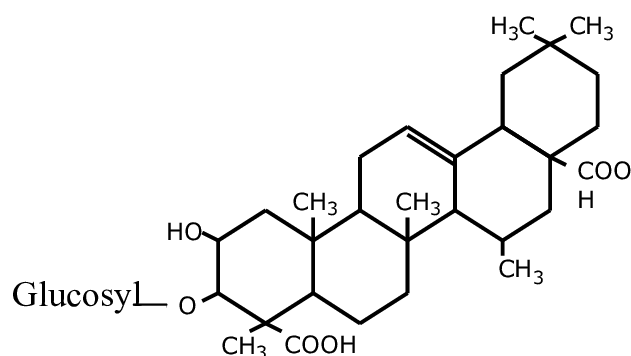


Figure 14: Structure typique des saponosides (**Frasca et al., 2012**)

I.4. Les Activités biologiques

L'écorce de grenade (*Punicagranatum* L.) est riche en composés bioactifs tels que les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes, ce qui lui confère de nombreuses activités biologiques. Des études récentes ont montré que cette partie du fruit possède des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antiparasitaires, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Grâce à cette richesse phytochimique, l'écorce est aujourd'hui considérée comme un ingrédient prometteur dans le développement de traitements naturels à visée thérapeutique.(**Johann et al., 2022**).

I.4.1. L'activité antioxydante

I.4.1.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant désigne un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les systèmes de défense antioxydants de l'organisme. Lorsqu'il y a excès de ROS ou déficit d'antioxydants, ces molécules peuvent endommager les lipides, les protéines et l'ADN, contribuant ainsi au développement de nombreuses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le cancer et le vieillissement prématuré. Ce phénomène est aujourd'hui au cœur de nombreuses recherches biomédicales. (**Sies.,2020**)

I.4.1.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés capables de neutraliser les radicaux libres ou de limiter les dommages qu'ils provoquent dans l'organisme, contribuant ainsi au maintien de concentrations intracellulaires de ROS à des niveaux non toxiques. Face à la production continue de ces espèces réactives, l'organisme met en œuvre une réponse adaptative permanente, reposant sur deux principales lignes de défense cellulaires, de puissances inégales, permettant la détoxification et la protection de la cellule contre le stress oxydatif.(**Favier A. 2003**).

I.4.1.2.1. Antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes sont produits naturellement par l'organisme pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et prévenir le stress oxydatif.(**Singh, R. et al. 2021**)

Enzymatiques :

- Superoxyde dismutase (SOD)

- Catalase (CAT)
- Glutathion peroxydase (GPx)

Non-enzymatiques :

- Glutathion (GSH)
- Acide urique
- Coenzyme Q10
- Bilirubine

I.4.1.2.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont apportés à l'organisme par l'alimentation, notamment par les plantes médicinales riches en métabolites secondaires. (Ali, T. et *al.* 2023).

- Polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques)
- Caroténoïdes(β -carotène, lycopène)
- Vitamines antioxydantes (Vitamine C, E)
- Alcaloïdes, tanins, lignanes

I.4.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydant

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante constitue une étape essentielle dans l'étude des extraits naturels, notamment d'origine végétale. Ces méthodes reposent sur des principes physico-chimiques permettant de quantifier la capacité des composés à piéger les radicaux libres ou à réduire des agents oxydants. Parmi les tests les plus utilisés figurent les méthodes colorimétriques comme le DPPH, le FRAP, l'ABTS ou encore l'ORAC. Ces techniques sont appréciées pour leur simplicité, leur faible coût et leur efficacité dans le criblage rapide de l'activité antioxydante des extraits bruts ou des composés isolés(Prioret *al.*, 2005)

I.4.1.3.1. Le test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, agissent comme piègeurs efficaces de radicaux libres grâce à leur capacité à donner un électron ou un atome d'hydrogène, stabilisant ainsi les espèces réactives. En neutralisant ces radicaux par transfert direct d'électron, ils génèrent des radicaux phénoxyles ou flavonoïdes

beaucoup plus stables et moins réactifs, limitant les dommages oxydatifs aux structures cellulaires(Mishra et al., 2020).

Principe

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des composés naturels ou synthétiques. Il repose sur la réduction du radical libre DPPH•, de couleur violette intense, par un donneur d'hydrogène (antioxydant). Lorsqu'un antioxydant est présent, il cède un électron ou un atome d'hydrogène au radical DPPH•, qui est alors converti en sa forme réduite, DPPH-H, de couleur jaune pâle. Cette réduction est mesurée par la diminution de l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de cette diminution est proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon testé(Kadaré et al 2021).

I.4.1.3.2. . Le test de la réduction de fer FRAP

Le test FRAP (FerriqueReducingAntioxydant Power) est utilisé pour mesurer la capacité antioxydante globale d'un extrait à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) en milieu acide. Ce test repose sur la réduction du complexe ferrique-TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), incolore, en complexe ferreux-TPTZ, de couleur bleue, mesurable par spectrophotométrie à 593 nm. Dans le cas de *Punicagranatum*, les polyphénols (notamment les ellagitétanins, les acides phénoliques et les flavonoïdes) présents dans les écorces, les arilles et les graines jouent un rôle majeur dans cette réduction en transférant des électrons au complexe ferrique. Cette forte activité réductrice reflète le pouvoir antioxydant élevé de la plante, en particulier de son écorce, souvent plus concentrée en composés phénoliques que les autres parties du fruit(Mphahlele et al 2020)

I.4.2. L'activité antimicrobienne

La plante *Punicagranatum* est reconnue pour sa richesse en composés phénoliques, notamment les tanins hydrolysables, l'acide ellagique et l'acide gallique, qui contribuent largement à son activité biologique. Ces métabolites secondaires exercent une action antimicrobienne multiple, agissant à la fois sur la perméabilité membranaire des cellules bactériennes et sur l'inhibition de certaines enzymes essentielles à leur métabolisme. De nombreuses études in vitro ont démontré une activité antibactérienne significative des extraits de grenade contre des

souches pathogènes, y compris des bactéries multirésistantes telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et *Escherichia coli* producteur de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de *P. granatum* en tant qu'alternative naturelle aux antibiotiques conventionnels (**Zahin, et al 2021**).

Partie III : matériel et méthodes

III. Introduction

L'Algérie, de par sa situation géographique stratégique en Afrique du Nord et sa diversité écologique allant des zones côtières méditerranéennes aux vastes étendues désertiques, jouit d'une richesse végétale exceptionnelle (benarba, 2015)

Dans ce cadre, notre étude s'est focalisée sur l'évaluation des extraits aqueux, éthanoliques ainsi que l'infusion de la plante *Punicagranatum*, en mettant en évidence leurs activités biologiques, notamment les propriétés antioxydants, antibactériennes et antifongiques

Notre étude à comme objectif de vise les principaux axes suivants :

- Faire un screening phytochimique afin de déterminer les différentes familles des composés chimiques qui existent dans nos plantes.

- Evaluer le pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de piégeage des radicaux libre (DPPH) et la méthode réduction de fer (FRAP)

- Evaluer l'activité antibactérienne et antifongique contre 5 souches bactériennes et 2 souches fongiques et 1 levure

Evaluer la concentration minimale inhibitrice CMI et concentration minimale bactéricide CMB

III.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude consiste en des écorces de fruits de *Punicagranatum*, récoltées dans deux régions de la wilaya de Saïda (ouest de l'Algérie) la région A (Hamam Rabbi) et la région B (Ain Sultane). Après la récolte, les écorces ont été séchées à l'abri de la lumière directe et de l'humidité, à température ambiante pendant une période de 15 jours. Une fois séchées, les échantillons ont été broyés à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir une poudre homogène. Cette poudre a ensuite été soumise à des procédés d'extraction et à des tests phytochimiques.



Photo1:les écorces de région B (Ain Sultane)

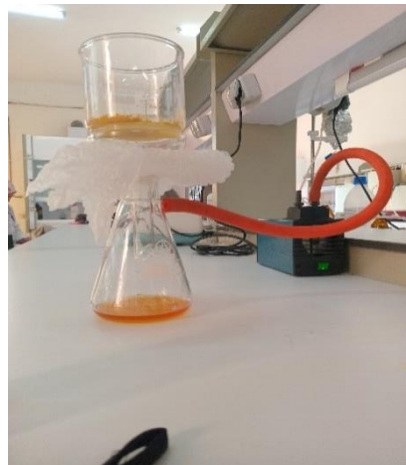


Photo 2:Les écorces de région A (Hammam Rabi)

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation des différents extraits de *Punicagranatum*

Pour l'évaluation de les activité biologiques des écorces de fruits, des extraits bruts sont préparés.

**Photo 3 :** Montage d'extraction des extraits**Photo 4 :** filtration sous vide de nos extraits

II.1.1. Extrait brut éthanolique

L'extraction solide-liquide de la poudre de *Punicagranatum* est réalisée par ébullition sous reflux : 5 g de poudre sont mélangés à 50mL d'éthanol dans un ballon, chauffés à reflux pendant 1 heure, suivis d'une filtration pour récupérer l'extrait.

II.1.2. Extrait brut aqueux

Le même protocole d'extraction solide-liquide a été appliqué en remplaçant l'éthanol par de l'eau distillée. Ainsi, 5 g de poudre d'écorce de *Punicagranatum* ont été mélangés à 50mL d'eau, puis portés à ébullition sous reflux pendant 1 heure. Après refroidissement, la solution a été filtrée pour éliminer les résidus solides, obtenant un extrait aqueux.

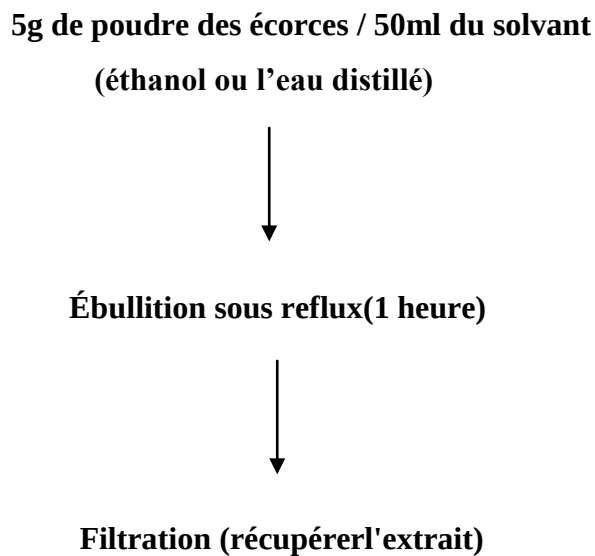


Figure 15: Schéma de l'extraction éthanolique et aqueuse des écorces de fruits de *Punicagranatum*.

II.1.3. Infusion aqueuse

5 g de poudre de *Punicagranatum L* a été ajouté à 100 ml d'eau distillée puis mis à ébullition pendant 15 min. puis filtré et le filtrat a été récupéré pour utilisation

II.2. Tests phytochimiques

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les écorces de fruits de *Punicagranatum*.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

1. Différentes classes recherchées

1.1. Les tannins

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galiques, verte ou bleu-verte celle des tannins Catecholiques (Trease et Evans, 1987).



Photo 5: Test de révélation les tanins

1.2. Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

1.3. Les anthocyanes

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debray et al., 1971 ; Paris et al., 1969).

1.4. Les coumarines

Une masse de 1gramme de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée

Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (Rizk, 1982).

1.5. Les alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H₂SO₄ dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner.

La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al., 1969**).

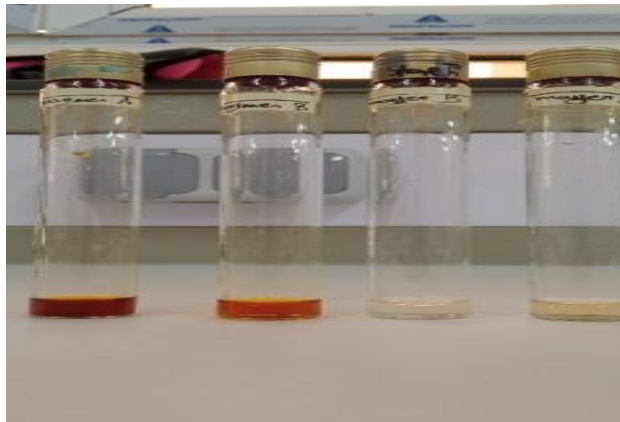


Photo 6 : résultats du test alcaloïdes

1.6. Stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

► **Essai 1** : Test pour les stérols et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans une Arlène Meyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21 °C) (**Trease et Evans, 1987**).

► **Essai 2** : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydride acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt).

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (**Trease et Evans, 1987**).

1.7. Les saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions

déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10^{ème} tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (en cm) dans le 10}^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5}{0,0 X}$$

Figure La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).



Photo 7 : résultats de saponosides de région A



Photo 8 : résultats de saponosides B

1.8. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

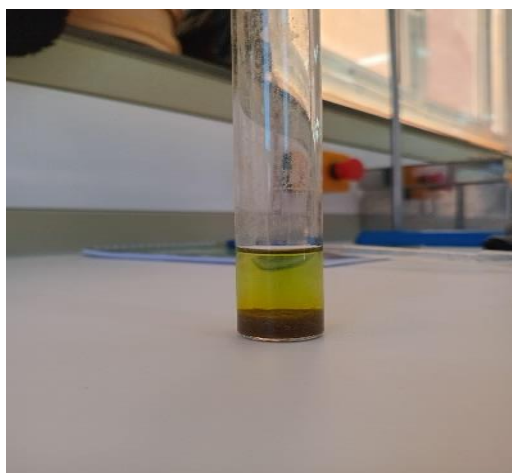


Photo 9 : résultat de composés réducteurs

1.9. L'amidon

On Chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violeté (**Bruneton, 1999**).

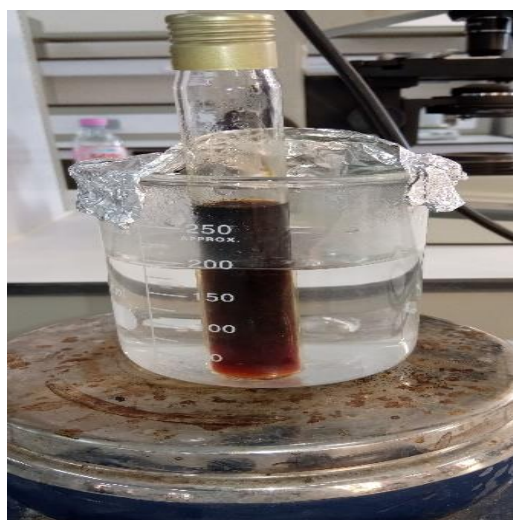


Photo 10 : résultat d'amidon

II.3.Evaluation de l'activité antioxydante

II.3.1.Test de piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphenyl 1-1picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH, selon une méthode adaptée de **Clarke et al. (2013)**, en utilisant des tubes. Une solution mère de l'extrait a été préparée à une concentration de 1 mg/ml dans le méthanol. Une série de dilutions successives a été réalisée sur huit tubes, chacun contenant 500 µL de méthanol. À partir du premier tube, 500 µL de solution ont été transférés dans le second, puis successivement jusqu'au huitième, afin d'obtenir une gamme de concentrations décroissantes. Deux répétitions de la dilution ont été effectuées pour assurer la reproductibilité des résultats. Ensuite, un volume de 150 µL de chaque dilution a été mélangé à 1350 µL d'une solution de DPPH (100 µM) dans un tube propre. Les mélanges ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un témoin blanc (DPPH + méthanol) et un contrôle négatif (méthanol seul). Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé à l'aide de la formule standard, et les résultats ont permis d'estimer l'IC₅₀ pour chaque extrait testé.

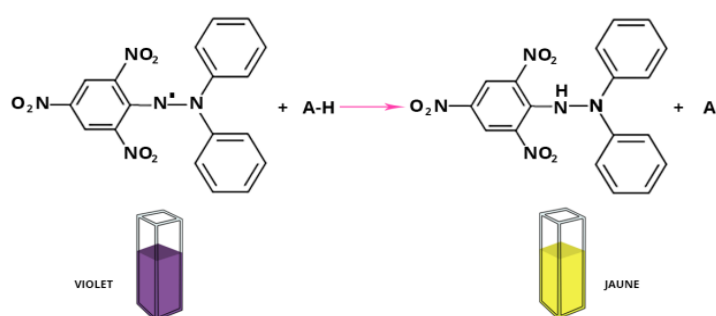


Figure 16 : mécanisme réactionnelle du test DPPH

L'équation ci-dessous a été utilisée pour calculer l'activité de piégeage :

$$\text{Activité de piégeage (\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100 \%$$

A_c = Absorbance du contrôle

A_s = Absorbance de l'échantillon

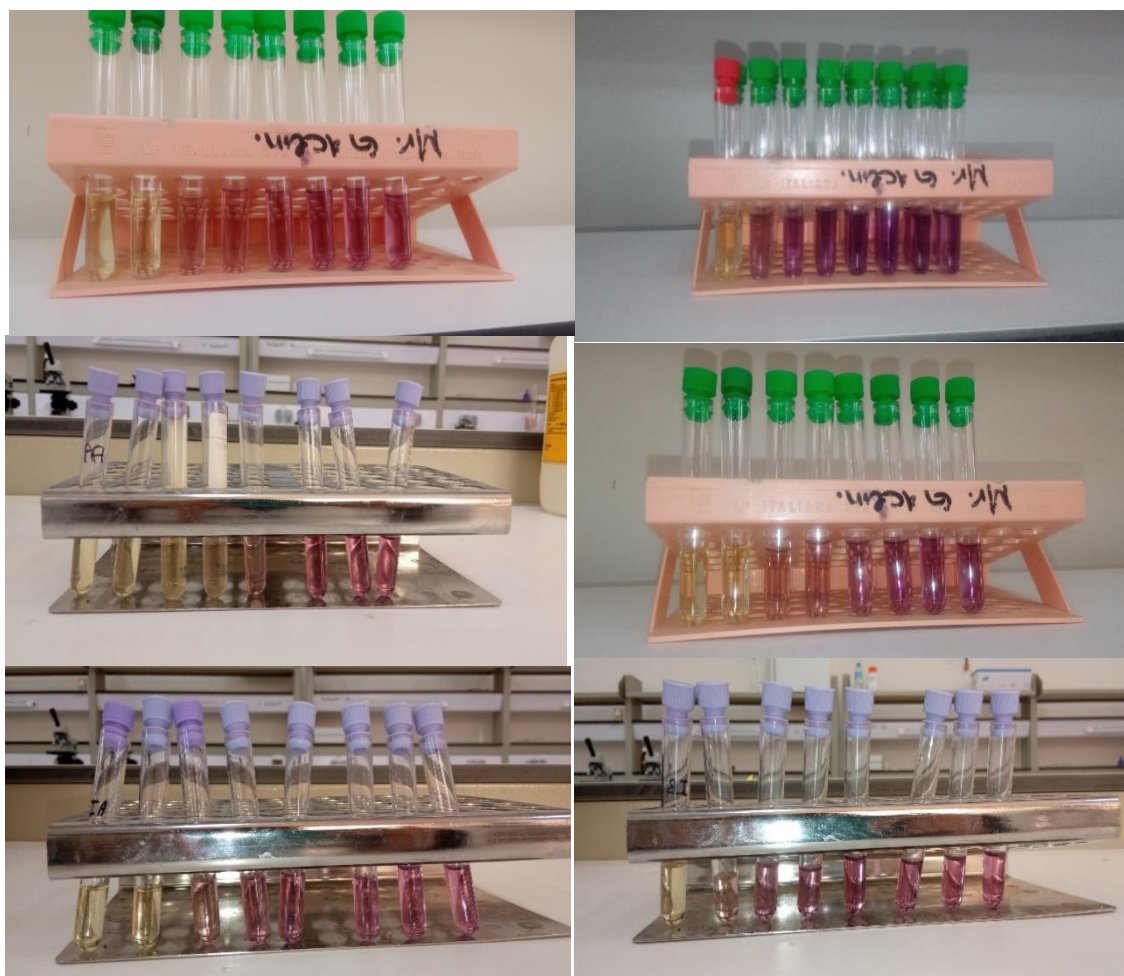


Photo 11 : résultats du test DPPH°

II.3.2. Réduction du Fer : FRAP (*Ferricreducing antioxidant power*)

Le pouvoir antioxydant ferrique a été déterminé à l'aide de l'essai au ferricyanure de potassium et au chlorure ferrique. Une aliquote de 500 µl d'extrait a été mélangée à 1 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et à 1 ml de K₃Fe(CN)₆ à 1 %. Les mélanges ont été bien agités et incubés à 50 °C pendant 20 min, après quoi 1mL de TCA 10% a été ajouté. Ils ont ensuite été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Les surnageants (1,5mL) ont été mélangés avec 1,5mL d'eau distillée et 0,1mL de FeCl₃ à 0,1%. L'absorbance a été lue à 700 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon de référence. L'activité antioxydante totale (TAA) déterminée par FRAP a été exprimée en mg d'équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg AAE/g dm).



Photo 12 : résultats du test FRAP

II.4.Evaluation de l'activité antimicrobienne :

C'est une méthode *in vitro* permettant d'évaluer le pouvoir antibactérien et antifongique de certains composés. Nous avons utilisé la méthode des puits, qui constitue une technique de base pour examiner l'activité antimicrobienne d'une substance. (Balouiri et al., 2016).

II.4.1.Les souches bactériennes

Tableau 2: les différents souches utilisés .

Les bactéries	Références	Gram
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA ATCC 33591	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Candida albican</i>	ATCC 10231	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	-

II.4.2.Repiquage des souches microbienne

Des colonies bien isolées des cultures pures ont été repiquées dans le bouillon nutritif puis incubées à 37 °C pendant 72h.

II.4.3.Préparation de l'inoculum :

Chaque souche est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées

sont mis en suspension dans un bouillon nutritif (ou en eau physiologique à 0,9 % NaCl). Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Ferland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ ml (CA-SFM, 2010).

II.4.4. Méthode des puits

L'activité antimicrobienne est évaluée selon les standards de EUCAST (EUCAST, 2018) et par la méthode conventionnelle de diffusion des puits contre les germes-cibles. Les suspensions de ce dernier sont calibrées à l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Ferland.

Le milieu de culture utilisé est le milieu Mueller-Hinton, coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification à température ambiante, les boîtes préparées sont ensemencées par écouvillonnage avec les suspensions des germes cibles. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés aseptiquement sur le milieu préparé à l'aide d'un emporte-pièce, et chaque puits est ensuite rempli séparément avec les extraits. Les boîtes sont entreposées 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des substances actives et l'arrêt provisoire de la croissance des germes-cibles (Tortorano et al., 1979). La lecture des résultats est réalisée après incubation à 37°C pendant 18 heures à 24 heures pour les bactéries et à 28°C pendant 5 jours. Toute zone d'inhibition de croissance autour des puits est considérée comme résultat positif et sera mesurée en utilisant une règle graduée.

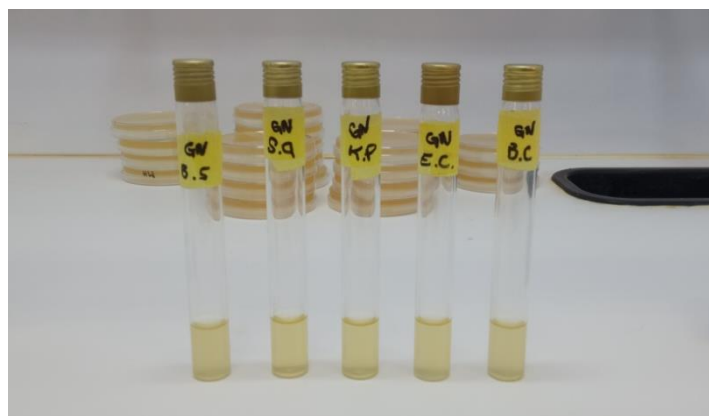


Photo 13 : les suspensions bactériennes

3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

Le test a été effectué dans des microplaques stériles à 96 puits. Dans chaque puits, 50 μ L de bouillon Mueller-Hinton stérile (MHB) ont été distribués. Ensuite, 50 μ L de l'extrait concentré (éthanolique, aqueux, infusion) ont été ajoutés uniquement dans le premier puits de chaque ligne. Une série de dilutions binaires (1/2) a ensuite été réalisée en transférant successivement 50 μ L du premier puits au suivant jusqu'au dernier, en mélangeant soigneusement à chaque étape, puis en éliminant 50 μ L du dernier puits afin d'assurer un volume final constant dans tous les puits. Après les dilutions, 50 μ L d'une suspension bactérienne standardisée (correspondant à une densité de 0,5 sur l'échelle de McFerland, ont été ajoutés à chaque puits, portant le volume final à 100 μ L.

Contrôles négative (milieu + souche bactérienne, sans extrait), contrôle positive (milieu + souche bactérienne + ATB), ont été inclus pour assurer la validité du test. La microplaque a ensuite été incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Après cette première incubation, 10 μ L de bleu de bromothymol, ont été ajoutés à chaque puits. Une seconde incubation de 2 heures à 37 °C

La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle aucune croissance bactérienne visible n'a été observée, traduite par l'absence de turbidité dans le milieu.

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée en repiquant, à l'aide de la technique d'ensemencement en râteau, 10 μ L des puits ne présentant aucune croissance visible lors du test de la CMI sur des boîtes de gélose Mueller-Hinton. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, la CMB a été définie comme la plus faible concentration de l'extrait ne permettant aucune croissance bactérienne sur la gélose.

Partie IV : résultats et discussion

IV. Les tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques pour tous les extraits sont résumés dans le tableau 1 :

Tableau 3: Résultats des tests phytochimiques sur les deux régions de *Punicagranatum*

Les composés phytochimiques	<i>Punicagranatum</i> de Région A	<i>Punicagranatum</i> de Région B
Les tannins	+++	+++
Les flavonoïdes	+++	+++
Les anthocyanins	++	++
Les coumarins	+	+
Les alcaloïdes	+	+
Les saponosides	+	+
Les composés réducteurs	+++	+++
Les stérols	+++	+++
Les terpénoids	+++	+++
Amidon	-	-

+++ forte présence ; ++ partiellement forte ; + faible présence ; - absence des composés phytochimiques

Notre analyse phytochimique des écorces de grenade *Punicagranatum* a révélé divers composés phytochimiques comme indiqué dans le tableau n°1, on remarque que les écorces des deux régions sont riches en : les tanins et les flavonoïdes et les stérols et les composés réducteurs, tandis que on note une moyenne quantité des anthocyanes et une faible quantité des coumarines, les alcaloïdes et des saponosides, Les tests ont confirmé l'absence de l'amidon dans les deux échantillons.

Les résultats des tests phyto-chimiques sur l'écorce de *Punicagranatum* L réalisés par (Farag et al., 2014) indiquent la présence des composés phénoliques suivants : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tannins galliques, les triterpènes et stéroïde, les sucres réducteurs, les phénols et les saponines, et ceci confirme nos résultats.

Généralement, le contenu poly phénolique varie selon les facteurs géographiques et climatiques (exposition solaire élevée, température chaude et salinité), les facteurs génétiques, la période de récolte et le stade de développement de la plante (Hesni & Moumine, 2020).

Activités biologiques in vitro des extraits de *Punicagranatum* :**Activité antimicrobienne de *Punicagranatum***

Un criblage de l'activité antimicrobienne a été réalisé sur 9 germes pathogènes, comprenant 5 souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) ainsi que 4 souches fongiques (*Candida albican*, *fusarium* et *Phytophthora*).

Évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de trois extraits (éthanolique, aqueux, infusion) de *Punicagranatum* L. a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion des puits sur un milieu gélosé solide de Muller-Hinton. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (en millimètres) autour des puits imprégnés des extraits contre cinq souches bactériennes pathogènes : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*. L'incubation a duré de 18 à 24 heures à 37°C. Les résultats ont été notés sur la base du diamètre des zones d'inhibition.

Tableau 4:Activité antibactérienne d'extrait éthanolique de *Punicagranatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Staphylococcus</i>	<i>E .coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
Extrait éthanolique	SM	15	6	6	13	7
	1/2	16	25	6	8	12
	1/4	13	20	6	6	6
	1/8	13	20	6	6	6
	1/16	6	6	6	6	6
	1/32	6	19	6	6	6

Tableau 5:Activité antibactérienne d'extrait infusion de *Punicagranatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>staphylococcus</i>	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus S</i>	<i>Bacillus C</i>
Extrait Infusion	SM	23	6	6	6	8
	1/2	22	6	6	6	6
	1/4	20	6	6	6	6
	1/8	15	6	6	6	6

	1/16	10	6	6	6	6
	1/32	6	6	6	6	6

Tableau 6 :Activité antibactérienne d'extrait aqueux de *Punica granatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>staphylococcus</i>	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus S</i>	<i>Bacillus C</i>
Extrait Aqueux	SM	20	10	6	6	9
	1/2	18	6	6	6	6
	1/4	18	6	6	6	6
	1/8	18	6	6	6	6
	1/16	17	6	6	6	6
	1/32	14	6	6	6	6

Dans le test de l'activité antibactérienne des extraits éthanolique, aqueux, infusion de *Punicagranatum* de région (A), les résultats obtenus par la méthode des puits nous révèlent une large variation des diamètres des zones d'inhibition

Concernant l'extrait éthanolique Les résultats ont révélé que la sensibilité des souches bactériennes à l'extrait éthanolique variait en fonction des concentrations. *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité claire avec zone de 20 à concentration 16,4 mg/ml jusqu'à une concentration de 2,05 mg/ml de zone 13mm, puis a perdu son effet à 1,02mg/ml. *Escherichia coli* a été la plus sensible, avec une activité soutenue 25mm dans concentration 8,2mg/ml jusqu'à une concentration de 0,51mg/ml de zone 19mm. *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* n'ont réagi qu'à des concentrations élevées (brutes et 1/2). *Klebsiella pneumoniae* était complètement résistante, sans effet à toutes les concentrations.

Et pour l'extrait aqueux et l'infusion montre une forte activité contre *Staphylococcus aureus*, avec une efficacité qui diminue progressivement selon la dilution, concernant l'extrait aqueux a concentration 15,8 jusqu'à 0,49mg/ml avec des zones d'inhibition de 20 à 14 mm, et pour l'infusion a concentration 20,14mg/ml avec zone de 23mm et a concentration 1,25mg/ml de zone 10mm, Cela indique une dépendance à la concentration et une sensibilité élevée de cette bactérie. Une activité limitée a été observée contre *Bacillus cereus* uniquement à la concentration maximale, tandis qu'aucune activité n'a été détectée contre *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella*. Globalement, l'extrait présente une activité

sélective dirigée vers les bactéries Gram-positives, et reste inefficace contre les bactéries Gram-négatives.

Tableau 7 : Activité antibactérienne d'extrait aqueux de *Punicagranatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>staphylococcus</i>	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus S</i>	<i>Bacillus C</i>
Extrait AQUEUX	SM	12	16	17	13	8
	1/2	11	10	12	9	11
	1/4	10	6	9	10	6
	1/8	6	6	8	8	6
	1/16	6	6	6	7	6
	1/32	6	6	7	6	6

Tableau 8: Activité antibactérienne d'extrait infusion de *Punicagranatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>staphylococcus</i>	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus S</i>	<i>Bacillus C</i>
Extrait infusion	SM	20	20	6	13	6
	1/2	18	6	6	8	6
	1/4	14	6	6	6	6
	1/8	8	6	6	6	6
	1/16	6	6	6	6	6
	1/32	6	6	6	6	6

Tableau 9:Activité antibactérienne d'extrait éthanolique de *Punica granatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Staphylococcus</i>	<i>E coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus S</i>	<i>Bacillus C</i>
--------------	----------	-----------------------	---------------	-------------------	-------------------	-------------------

Extrait éthanolique	SM	16	16	6	6	6
	1/2	15	11	6	6	6
	1/4	14	6	6	6	6
	1/8	13	6	6	6	6
	1/16	6	6	6	6	6
	1/32	6	6	6	6	6

D'après les résultats obtenus à différent extrait éthanolique, aqueux, infusion de *punicagranatum* de région (B), Il apparait que L'extrait aqueux a montré une activité modérée contre *Staphylococcus aureus* limitée de zone 12mm aux fortes concentrations 7,37mg/ml. Une activité remarquable a été observée contre *Klebsiella* avec zone de 17mm a concentration 7,37mg/ml (bactéries à Gram négatif), ce qui est inhabituel pour un extrait aqueux. *Bacillus subtilis* a répondu positivement à plusieurs concentration (7,37, 3,68, 1,84 , 0,92, 0,46 mg/ml) avec des zones à 13 jusqu'à 7mm indiquant une bonne sensibilité. L'activité contre *Bacillus cereus* et *E. coli* était faible et irrégulière avec des zones d'inhibition allant de 16 à 8mm. Globalement, l'extrait présente une activité antimicrobienne dépendante de la concentration, avec un spectre plus large que prévu, incluant certaines bactéries Gram négatives.

L'extrait éthanolique et infusion a un effet antibactérien limitée, n'étant efficace que contre *Staphylococcus aureus* et diminuant avec la dilution pour l'extrait éthanolique dans les concentrations (148.5 et 74.25 et 37.12, 18.56) avec des zones (16 -13mm) et pour l'infusion a des concentration 50.9, 25.45 , 12.72 et 6.36 mg/ml avec des zones allant que 20 jusqu'à 8mm, tout en ne montrant aucun effet contre d'autres souches telles que *E. coli* et *Klebsiella*. Cela suggère que l'efficacité de l'extrait dépend de la concentration et qu'il cible principalement les bactéries Gram-positives. Des études supplémentaires utilisant différentes méthodes d'extraction sont recommandées pour optimiser l'efficacité et élargir le spectre antibactérien.

L'étude a montré que l'efficacité des extraits de plante *Punicagranatum* contre les souches bactériennes étudiées dépend fortement du type et de la concentration de l'extrait. L'extrait éthanolique et l'extrait infusion ont montré une activité remarquable contre certaines souches, en particulier *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, ce qui peut expliquer par la structure de sa paroi cellulaire absence de membrane externe qui facilite l'accès aux

composés actifs l'activité diminuant progressivement avec la dilution, ce qui indique une dépendance claire à la concentration, Nos résultats corroborent ceux de (**Sahnouni et al., 2022**) qui ont montré que l'extrait éthanolique d'écorce de grenade était actif contre *staphylococcus* montrant des zones d'inhibition de 11 à 29 mm par diffusion sur agar , l'éthanol permet d'extraire davantage de composés phénoliques et flavonoïdes

D'autre part, l'extrait aqueux s'est révélé étonnamment efficace contre certaines souches Gram-négatives telles que *E. coli* et *Klebsiella*, selon les chercheurs (**Dina M. Baraka et son équipe 2023**) ont utilisé l'extrait aqueux d'écorces de grenade montré une forte activité antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* et *E coli* 1, étude a confirmé que même l'extrait aqueux a une grande efficacité

Ces résultats montrent que la méthode d'extraction et le type de solvant utilisé jouent un rôle crucial dans la détermination du spectre et de la puissance antibactérienne. Ils suggèrent également que les extraits de plantes peuvent posséder des propriétés prometteuses en tant qu'antibiotiques naturels.

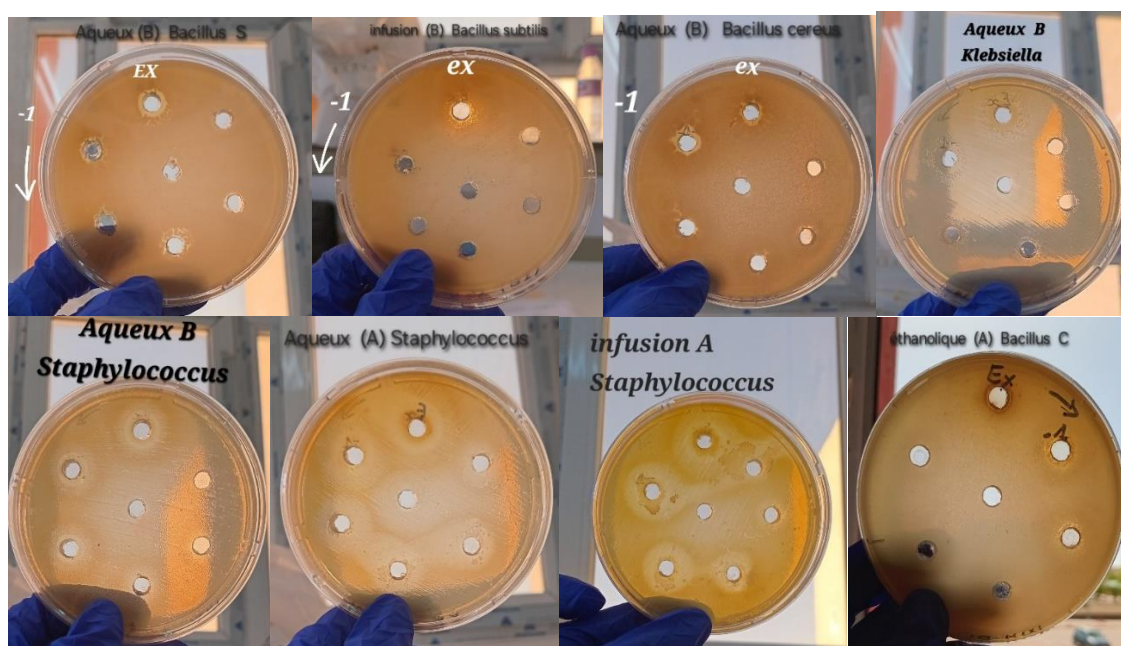




Photo 13 :les résultats antibactériens de deux régions

Evaluation de l'activité antifongique

Dans cette étude, on a tenté de comparer l'influence de 3 extraits (éthanolique, aqueux, infusion), sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes *fusarium oxysporum*, *phytophthora sp* et *candida albican* L'expérience a été réalisée par la

méthode de diffusion à partir des puits sur un milieu gélosé solide (PDA), dans le but d'estimer l'évolution de l'activité antifongique, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm), après 48 heures pour *Candida albican* et 5 jour pour les autres d'incubation à une température adéquate de 28°C. Les valeurs indiquées sont les moyennes des trois mesures des diamètres du même essaie. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus sont représentés dans les tableaux suivants:

Tableau 10 :Activité fongique d'extrait éthanolique de *Punicagranatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait éthanolique	SM	6	11	15
	1/2	6	8	15
	1/4	12	7	10
	1/8	8	10	6
	1/16	6	6	6
	1/32	8	6	6

Tableau 11:Activité fongique d'extrait aqueux de *Punicagranatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait aqueux	SM	15	15	17
	1/2	8	10	13
	1/4	6	7	15
	1/8	6	7	25
	1/16	6	6	14
	1/32	6	6	6

Tableau 12:Activité fongique d'extrait infusion de *Punicagranatum* de Région(A) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait	SM	6	11	20
	1/2	6	9	15
	1/4	6	8	15

infusion	1/8	11	7	10
	1/16	12	6	6
	1/32	8	6	6

L'effet antifongiques des extraits de *Punicagranatum* étudiées augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait testé, en basant sur les valeurs des diamètres des zones d'inhibition

Extrait éthanolique Très efficace contre *candida albican* (jusqu'à 23 mm) et *fusarium* (12mm). Activité modérée contre *Phytophthora*

. Extrait aqueux Activité fort contre *Candida albican* (jusqu'à 25 mm). Léger effet contre *Fusarium* et *phytophthora* (jusqu'à 15 mm)

3. Extrait par infusion Activité très faible contre *phytophthora* (jusqu'à 11) et modérée contre *fusarium* (jusqu'à 12) sauf pour *Candida albican*, très sensible à l'état pur (20 mm)

Tableau 13:Activité fongique d'extrait éthanolique de *Punicagranatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraits	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait éthanolique	SM	6	12	6
	1/2	6	9	18
	1/4	6	6	6
	1/8	23	9	6
	1/16	20	8	10
	1/32	6	6	6

Tableau 14:Activité fongique d'extrait aqueux de *Punicagranatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraites	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait aqueux	SM	7	6	6
	1/2	8	6	6
	1/4	11	6	6
	1/8	15	6	6
	1/16	13	6	6
	1/32	12	6	6

--	--	--	--	--

Tableau 15: Activité fongique d'extrait infusion de *Punicagranatum* de Région(B) représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm

Les extraites	Dilution	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Candida Albican</i>
Extrait infusion	SM	6	10	20
	1/2	6	8	10
	1/4	6	10	6
	1/8	6	10	6
	1/16	6	8	6
	1/32	6	6	6

Concernant la deuxième région on a observé que :

1. Extrait éthanolique Très efficace contre *Fusarium* (jusqu'à 23 mm) et *Candida albican* (18 mm). Activité modérée contre *Phytophthora*.

2. Extrait aqueux Activité faible, constante (6 mm) contre *Phytophthora* et *Candida albican*. Léger effet contre *Fusarium* (jusqu'à 15 mm).

3. Extrait par infusion Activité très faible et constante (6 mm) sauf pour *Candida albican*, très sensible à l'état pur (20 mm). ---

Cela montre qu'extrait éthanolique = le plus efficace. Cible la plus sensible : *Candida albican*. Recommandation : utiliser l'extrait éthanolique, surtout à 1/2 ou 1/8 de dilution.

L'étude de l'activité antifongique des extraits de *Punicagranatum* issus de deux régions a montré que l'efficacité dépend à la fois du type d'extrait utilisé et de la souche fongique ciblée. L'extrait éthanolique est le plus efficace, en particulier contre *Candida albican* et *Fusarium*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 23 mm. L'extrait aqueux montre une activité modérée à forte selon les cas, tandis que l'extrait par infusion présente une efficacité généralement faible. *Candida albican* est la souche la plus sensible, suivie de *Fusarium*, tandis que *Phytophthora* est la moins affectée. Des différences entre les deux régions ont été observées, probablement liées aux conditions environnementales influençant la composition chimique des plantes. En conclusion, l'extrait éthanolique de *Punicagranatum* est recommandé pour ses fortes propriétés antifongiques, surtout à des concentrations élevées (1/2 ou 1/8 de dilution). Les résultats de (Mithun B H Pai et al., 2010) l'extrait éthanolique et aqueux a montré des zones d'inhibition contre *candida*

albican surtout extrait éthanolique qui fait la plus grande zone d'inhibition (22 mm) en utilisant la méthode de diffusion sur disque d'agar.

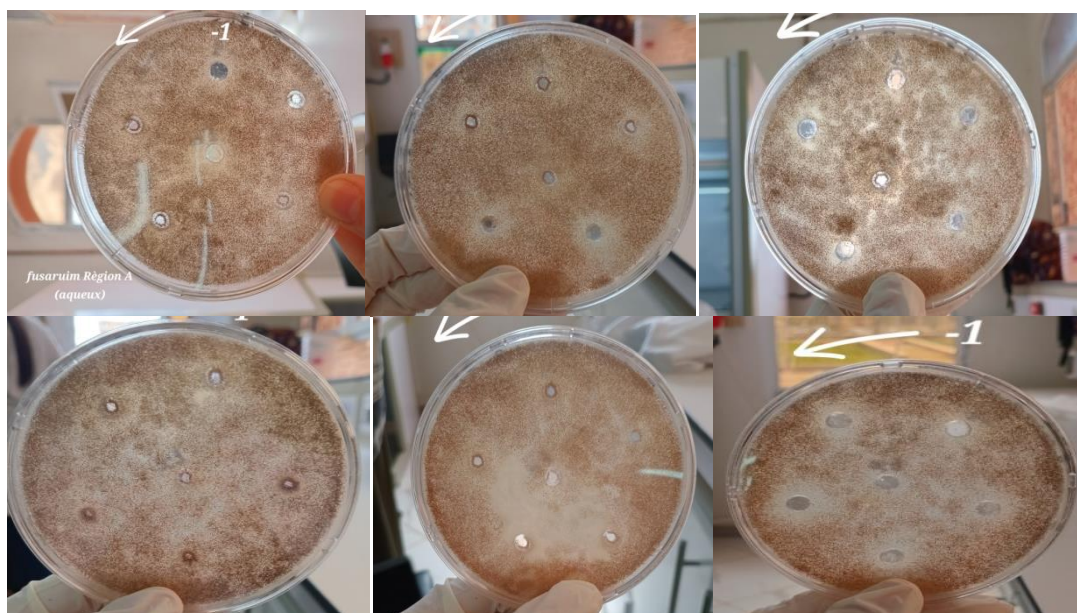


Photo 14 : résultats antifongique (fusarium)



Photo 15 : résultat antifongique de candida des extrait de réégion A



Photo 16 : résultat antifongique de candida des extrait de réégion B

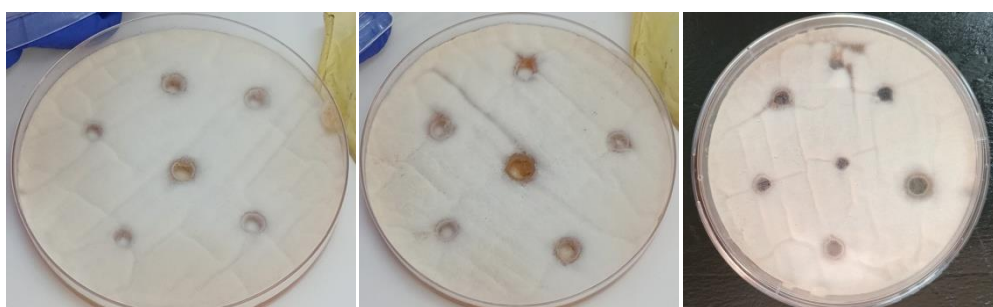


Photo 17 : résultat antifongique phytophtora**Détermination de la (CMI)et (CMB)**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits (éthanolique, aqueux, infusion) de plante *Punicagranatum* de deux région (A) et (B) étudiés vis-à-vis d'*Escherichia coli* *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Pneumonie*, *Bacillus cereus*. Et *Fusarium*, *phytophtora infestans* et *candida albican* sont mentionnées dans les tableaux suivant

Témoin négative : suspension bactérienne + milieu du culture (MH liquide)

Témoin positive : antibiotique ayataxim + suspension bactérienne + milieude la culture

Tableau 16 : les différentes concentrations minimales inhibitrice des différents extraits enmg/ml.

Les extraits	ConcentrationMinimaleInhibitriceen mg/ml				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella Pneumonie</i>
Ex éthanolique (B)	3,89	1,94	1,94	0,97	7,78
Ex aqueux (B)	2,12	2,12	4,25	4,25	8,5
Ex infusion (B)	5	2,5	2,5	2,5	10
Ex aqueux (A)	3,34	3,34	3,34	3,4	6,68

D'après les résultats décrits sur le Tableau, nous remarquons que les valeurs de CMI et Obtenues varient en fonction des extraits utilisées et des Souches bactérienne testées. Activité la plus puissante : L'extrait éthanolique (B) montre la meilleure activité antimicrobienne globale, notamment contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,97 mg/ml). Il est également le plus efficace contre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* (1,94 mg/ml). Faible efficacité contre *Klebsiella pneumoniae* : Tous les extraits montrent une activité relativement faible contre *Klebsiella pneumoniae*. L'extrait aqueux (A) est le plus actif avec une CMI de 6,68 mg/ml. Comparaison entre extraits aqueux (A) et (B) : L'extrait aqueux (B) est plus actif que celui de (A), en particulier contre *E. coli* et *B.*

cereus. L'infusion (B) a une activité modérée mais reste moins efficace que l'extrait éthanolique.

Les extraits de *Punicagranatum* présentent une activité antibactérienne variable selon le type d'extrait et la souche bactérienne ciblée. L'extrait éthanolique (B) est le plus efficace, en particulier contre les bactéries Gram-positives (*B. subtilis*, *S. aureus*, *B. cereus*). Cela suggère que les composés actifs sont mieux extraits par l'éthanol que par l'eau. Cependant, les bactéries Gram-négatives comme *K. pneumoniae* et *E. coli* sont plus résistantes, nécessitant des concentrations plus élevées.

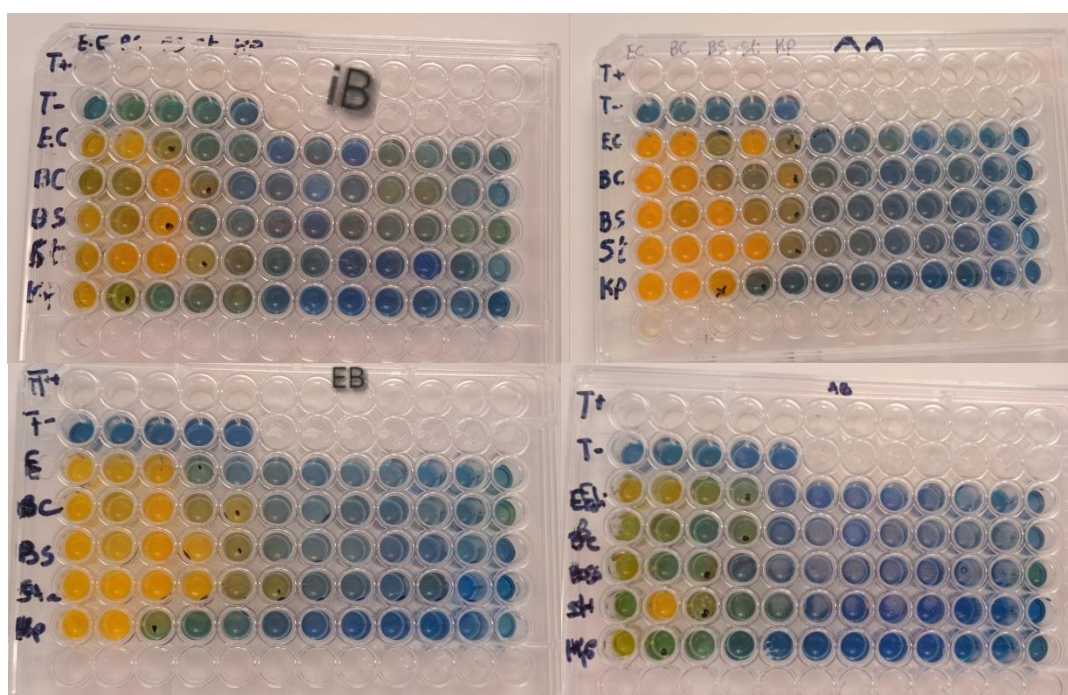


Photo 18 : Les résultats de CMI contre les bactérie



Photo 19: CMI Le témoin positive (l'antibiotique)



Photo20: L'antibiotique Ayataxim

Tableau 17 : les différentes concentrations minimales inhibitrice des différents extraits en mg/ml

Les extraits	Concentration Minimale Inhibitrice en mg/ml		
	<i>Candida</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>
Ex éthanolique (B)	3,89	3,89	7,78
Ex aqueux (B)	8,5	2,12	4,25
Ex infusion (B)	1,25	5	2,5
Ex aqueux (A)	1,67	13,37	6,68
Ex éthanolique (A)	0,46	3,75	1,87
Ex infusion (A)	7,5	15	30

L'extrait éthanolique de la région A a montré la meilleure activité antifongique avec des CMI faibles :

Candida : 0,46 mg/ml

Phytophthora : 1,87 mg/ml

L'extrait infusion (B) a été efficace contre *Candida* (1,25 mg/ml), mais moins contre *Fusarium*.

L'extrait aqueux (A) montre une bonne efficacité contre *Candida* (1,67 mg/ml) mais est très peu actif sur *Fusarium* (13,37 mg/ml)

L'extrait infusion (A) a présenté les plus faibles performances (CMI > 7,5 mg/ml).

L'extrait éthanolique de la région A est le plus prometteur en tant qu'agent antifongique naturel, en particulier contre *Candida albican* et *Phytophthora*. Il pourrait être valorisé dans le développement de traitements antifongiques à base de plantes.

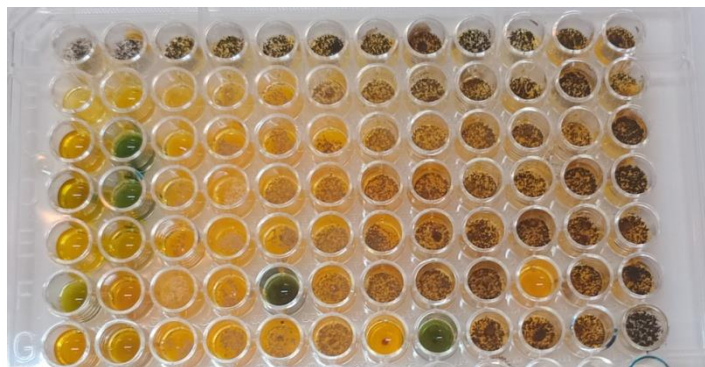


Photo 21 : Résultat de CMI contre *fusarium*

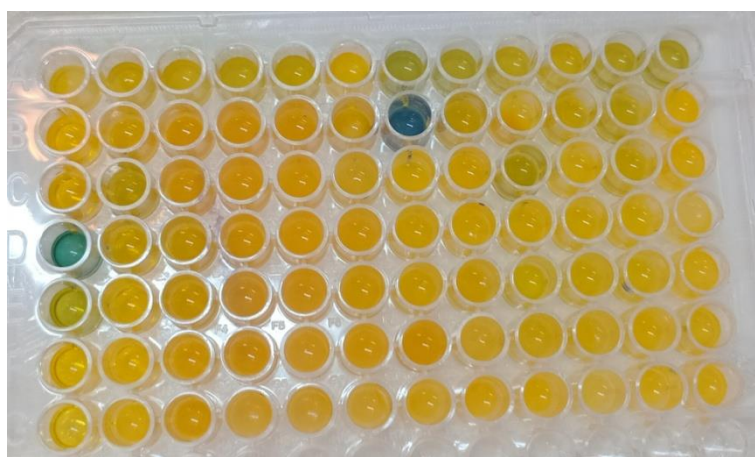


Photo 22 : résultat de CMI contre *phytophthora*

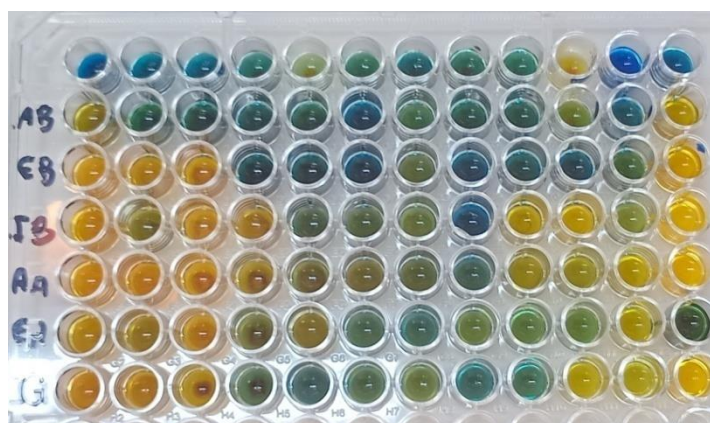


Photo 23 : Résultat de CMI contre *candida*

Concentration minimale bactéricide (CMB)

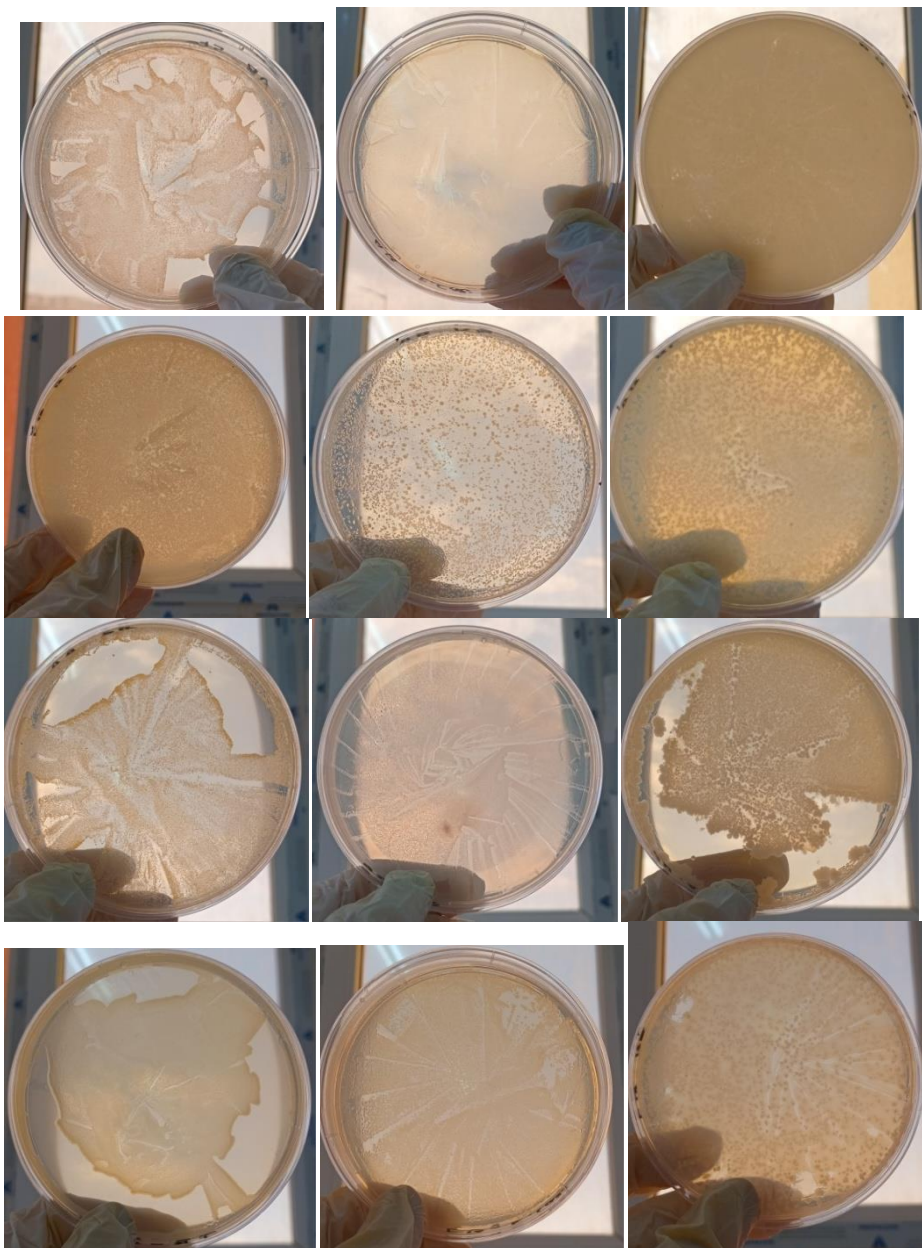


Photo 24 : les résultat de CMB

(AB) : aqueux région B, (AA) : aqueux région A, (EB) :éthanolique région B

(IB) : infusion région B

Les résultats ont montré un effet bactériostatique dans l'ensemble, a l'exception de l'extrait aqueux de la région A qui a présenté une activité bactéricide contre *Klebsiella*

Activité antioxydants

Test de piégeage du radical libre DPPH

Différentes méthodes sont disponibles pour examiner la capacité antioxydante d'une matrice, les propriétés antioxydantes des extraits de notre plantes ont été étudiées en appliquant le test DPPH *in vitro*. Cette capacité de la réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires. La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 540 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition. Ces derniers nous ont permis de tracer les courbes qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition des HE des deux plantes ainsi que l'acide ascorbique choisie comme control positif en fonction des différentes concentrations. Les résultats illustrés dans les figures.

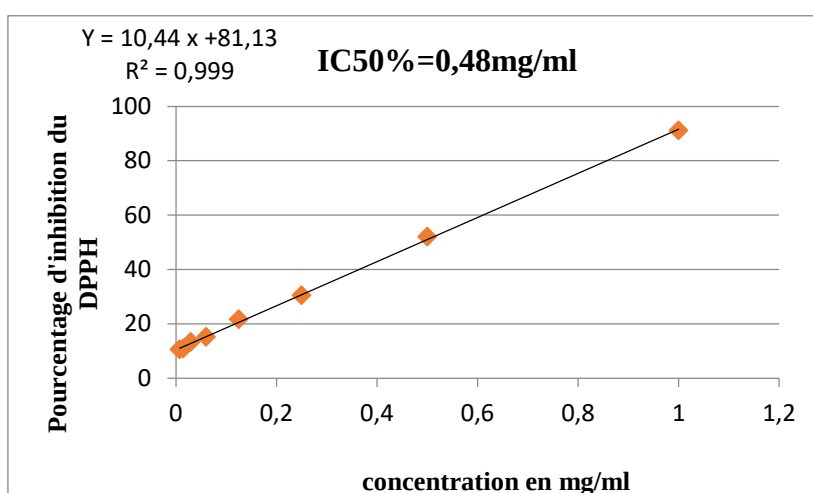


Figure 17: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait éthanolique A

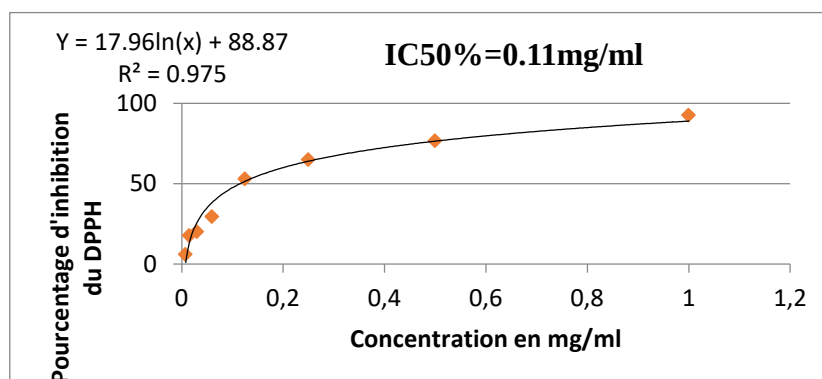


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait Aqueux B

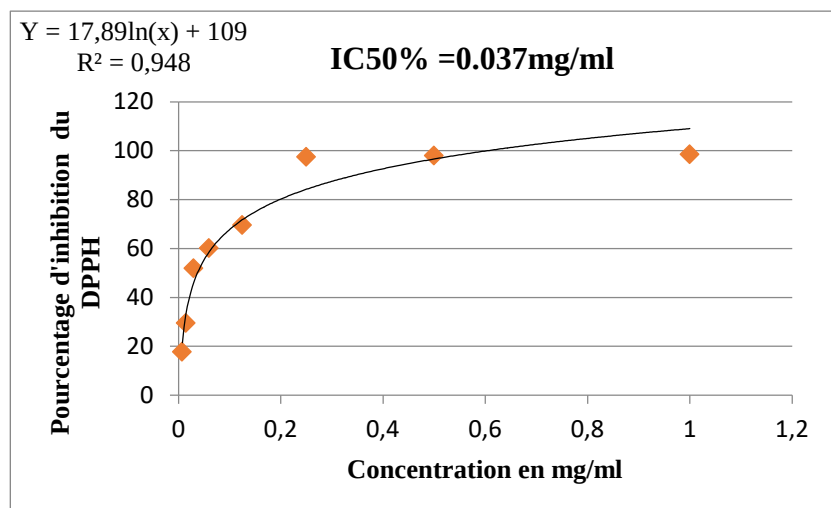


Figure19:Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait aqueux A

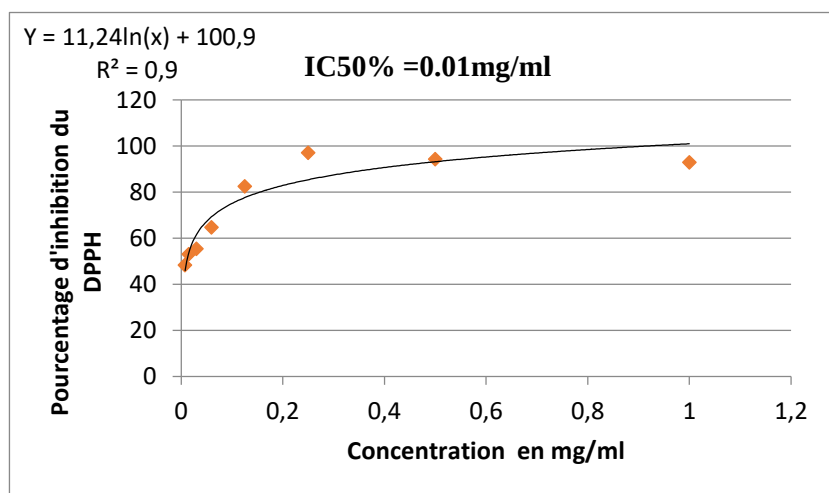


Figure 20:Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'Infusion A.

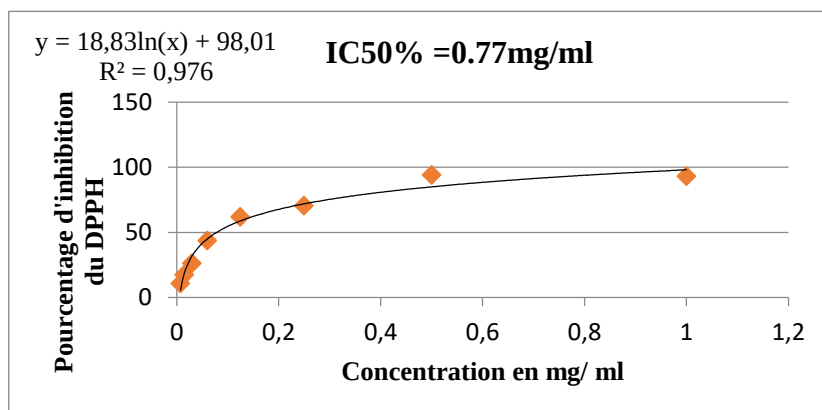


Figure 21: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait éthanolique B .

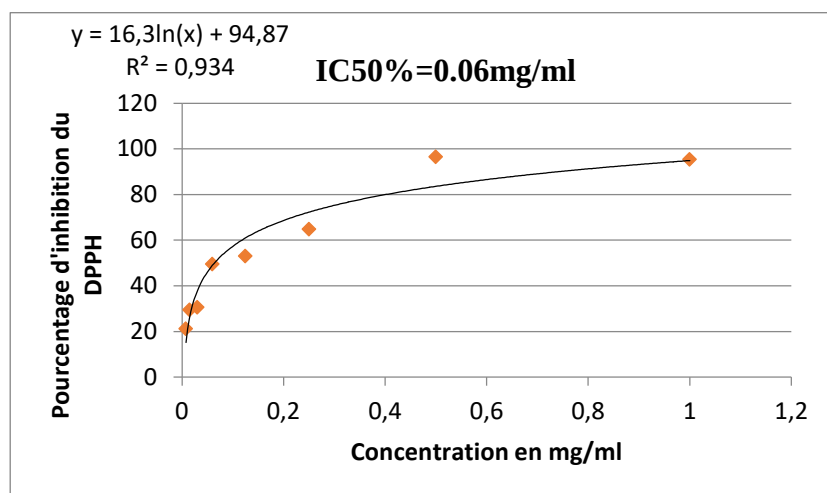


Figure 22:pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour l'extrait Infusion B

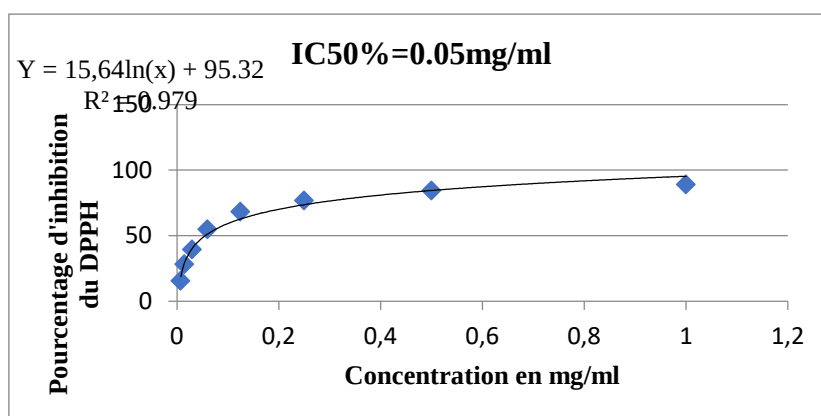


Figure 23:Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH pour acide ascorbique

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits par le test de piégeage du radical DPPH a permis de déterminer les valeurs d' IC_{50} , c'est-à-dire les concentrations nécessaires pour inhiber 50 % des radicaux libres DPPH. Une valeur d' IC_{50} faible reflète une activité antioxydante élevée.

Dans cette étude, l'infusion A (IA) a présenté la plus forte activité antioxydante avec une IC_{50} de 0,01 mg/ml, surpassant même celle de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,05$ mg/ml), utilisé comme standard de référence. Cette valeur d' IC_{50} est en accord avec les résultats rapportés par (Gülçin ,2020), qui mentionne une plage de 0,04 à 0,06 mg/ml pour l'acide ascorbique selon les conditions expérimentales du test DPPH. Elle est suivie par l'extrait

aqueux A (AA) avec une IC_{50} de 0,03 mg/ml, ce qui confirme le rôle des composés hydrosolubles, notamment les polyphénols et flavonoïdes, dans l'activité antioxydante.

Les autres extraits ont présenté des activités antioxydantes modérées à faibles selon le classement suivant :

Infusion B (IB) (0,06 mg/ml) $\approx$ Acide ascorbique (0,05 mg/ml) > Extrait aqueux B (AB) (0,11 mg/ml) > Extrait éthanolique A (EA) (0,48 mg/ml) > Extrait éthanolique B (EB) (0,77 mg/ml).

Ces résultats suggèrent que les extraits préparés par infusion ou extraction aqueuse sont plus efficaces que ceux obtenus avec l'éthanol, probablement en raison d'une meilleure extraction des composés phénoliques hydrophiles. De plus, la variation entre les extraits A et B pourrait être liée à des différences de provenance des échantillons, de maturité du matériel végétal, ou à des facteurs environnementaux affectant leur composition phytochimique.

Globalement, l'activité antioxydante de plusieurs extraits, notamment IA et AA, se révèle comparable, voire supérieure, à celle de l'acide ascorbique, indiquant un potentiel intéressant pour des applications nutraceutiques ou pharmacologiques.

Le test de la réduction de fer FRAP

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est une technique colorimétrique simple et rapide reposant sur un mécanisme d'oxydoréduction. Elle permet d'évaluer la capacité réductrice des antioxydants, en particulier des composés phénoliques. Ces derniers sont capables de réduire le complexe ferrique Fe^{3+} /ferricyanure, initialement de couleur jaune, en un complexe ferreux Fe^{2+} /ferricyanure de couleur bleu-vert. L'intensité de cette coloration, proportionnelle à l'activité antioxydante, est mesurée à une longueur d'onde de 700 nm (Didi et al., 2020). Nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits des écorces de grenadier par la méthode de FRAP. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes et comparé à l'acide ascorbique .

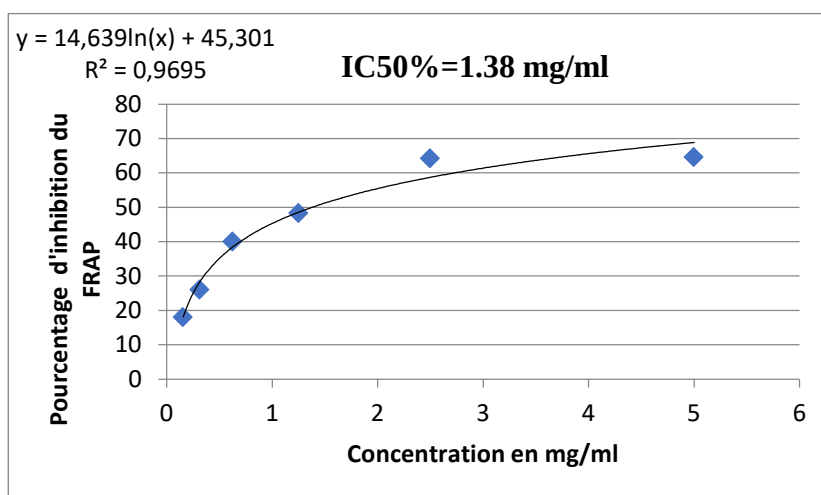


Figure 24: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait Infusion A .

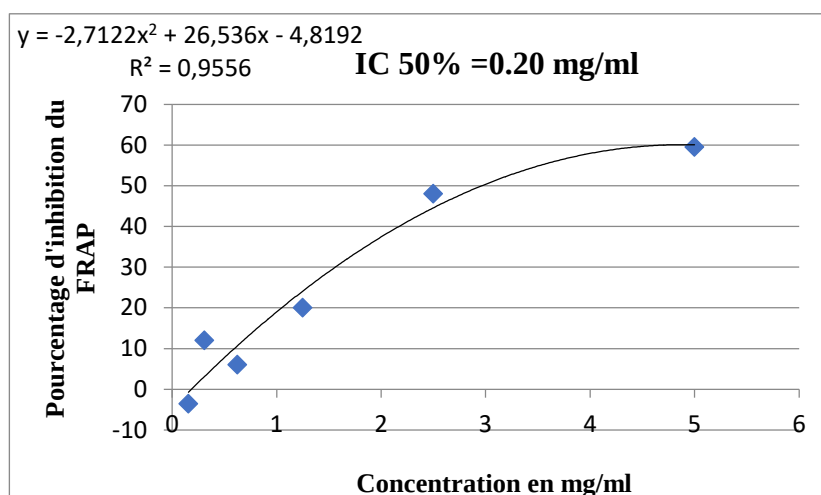


Figure 25: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait Aqueux B .

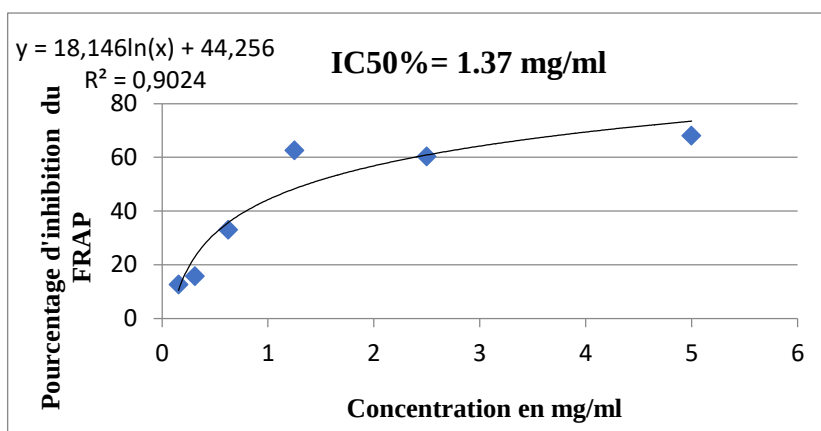


Figure 26: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'extrait Aqueux A

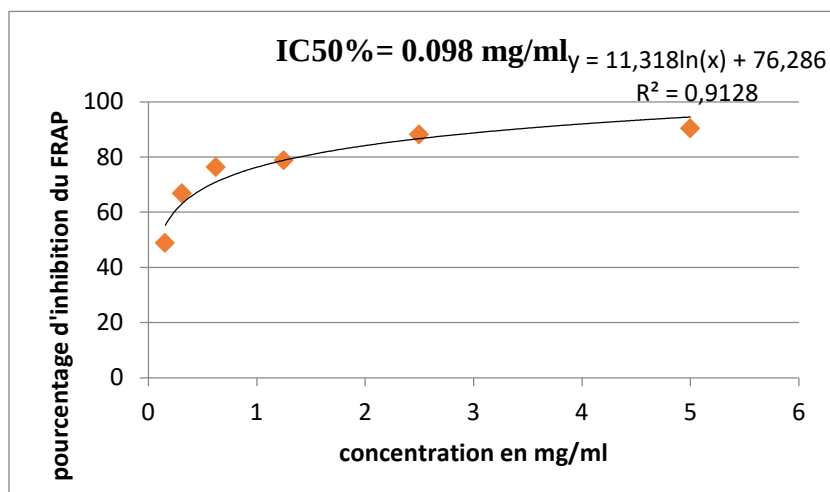


Figure 27: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour l'acide ascorbique

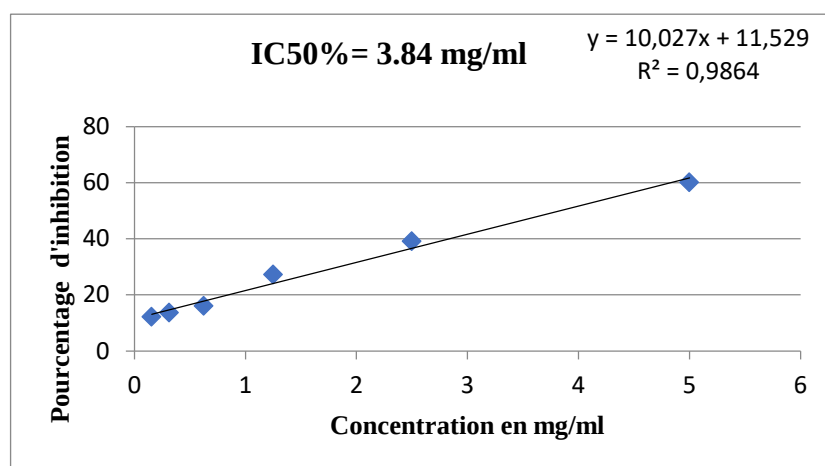


Figure 28: Pourcentage d'inhibition du FRAP pour Infusion B .

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Punicagranatum* par le test FRAP (FerricReducingAntioxidant Power) a permis de déterminer leur capacité à réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette activité est exprimée par les valeurs d' IC_{50} , qui représentent la concentration requise pour atteindre 50 % de l'activité réductrice maximale.

Parmi les extraits testés, l'extrait aqueux B (AB) a montré la meilleure activité antioxydante, avec une IC_{50} de 0,20 mg/ml, suivie de l'extrait aqueux A (AA) avec 1,37 mg/ml, et de l'infusion A (IA) avec une valeur très proche (1,38 mg/ml). Ces extraits montrent une activité modérée par rapport à l'acide

ascorbique utilisé comme témoin positif, dont l' IC_{50} est nettement plus faible (0,098 mg/ml), témoignant d'une capacité réductrice plus élevée.

En revanche, l'infusion B (IB) a présenté une IC_{50} relativement élevée (3,84 mg/ml), indiquant une faible activité antioxydante. Quant aux extraits éthanoliques EA et EB, leurs courbes n'ont pas pu être exploitées pour le calcul de l' IC_{50} , car leur pourcentage de réduction du fer n'a pas dépassé respectivement 30 % pour EA et 27,3 % pour EB, ce qui reflète une faible activité réductrice dans les conditions expérimentales.

Ces résultats suggèrent que la nature du solvant influence fortement la capacité antioxydante des extraits. Les extraits aqueux se sont révélés plus efficaces, probablement en raison d'une plus grande solubilité des composés phénoliques hydrophiles, tels que les tanins, l'acide ellagique ou l'acide gallique. Les extraits éthanoliques, en revanche, semblent moins concentrés en composés réducteurs actifs dans ce test.

Partie V : Conclusion et perspectives

Conclusion

L'étude des composés bioactifs d'origine végétale suscite toujours un grand intérêt en raison de leur potentiel thérapeutique. Parmi ces plantes figure le grenadier (*Punica granatum*) qui, malgré ses propriétés médicinales reconnues et sa large disponibilité, reste peu valorisé en Algérie. Dans ce contexte, notre travail nous avons évalué les activités biologiques des extraits (infusion, aqueux et éthanolique) de l'écorce de *Punica granatum* (grenadier), récoltée dans deux régions distinctes de la wilaya de Saïda : Hammam Rabi (région A) et Ain Sultane (région B). Les tests phytochimiques ont confirmé la richesse de ces extraits en métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes, tanins, stérols triterpéniques et composés réducteurs, avec absence d'amidon, ce qui témoigne d'un potentiel bioactif intéressant. L'activité antioxydante, évaluée par le test DPPH, a révélé une forte capacité de piégeage des radicaux libres, particulièrement marquée pour l'infusion aqueuse de la région A ($IC_{50} = 0,01$ mg/ml), suivie par l'extrait aqueux (0,03 mg/ml) et l'extrait éthanolique (0,48 mg/ml). Les extraits de la région B ont également montré une bonne activité antioxydante, quoique légèrement inférieure. Sur le plan antimicrobien, les extraits, en particulier ceux de la région A, ont montré une activité significative contre plusieurs souches bactériennes et fongiques. Notamment, l'extrait éthanolique s'est révélé très actif contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, tandis que l'extrait aqueux et l'infusion ont inhibé efficacement *Staphylococcus aureus*. La souche *Klebsiella pneumoniae* a présenté une sensibilité marquée à l'extrait aqueux de la région B. Concernant les champignons, *Candida albicans* s'est montré particulièrement sensible aux trois extraits de la région A, avec des diamètres de zones d'inhibition allant jusqu'à 25mm. De plus, les extraits éthanolique et aqueux ont exercé une inhibition notable contre *Fusarium oxysporum*. Enfin, les tests de concentration minimale bactéricide (CMB) ont démontré que l'ensemble des extraits étudiés exercent principalement un effet bactériostatique sur les souches testées. Ces résultats mettent en évidence que l'écorce de *Punica granatum* constitue une source naturelle prometteuse de composés bioactifs aux propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques, pouvant être valorisée dans le domaine pharmaceutique ou comme alternative aux traitements antimicrobiens conventionnels.

Partie VI : références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Al-Obaidi, D.M., Muhsin, S.A., Ibrahim, A.A.** In vivo antimicrobial inhibition of Punica granatum extracts as mouthwash. Russian Open Medical Journal, 2017; 6(4): e0403. DOI: 10.15275/rusomj.2017.0403.
2. **Ali, T., Khan, A., Ullah, R., Rehman, S. U., & Kim, M. O.** (2023). Phytochemical profiling and antioxidant potential of medicinal plants: A review of recent advances. Plants, 12(4), 985.
3. **Anticle medicinal plants and Traditional uses and modern Applications.** Journal of Neontal Surgery, Mar 2025. DOI: 10.52783/jms.V14.2210.
4. **Benarba, B.** (2015). Use of medicinal plants by breast cancer patients in Algeria. EXCLI Journal, 14, 1164–1166.
5. **Betina Soumeiya.** (2014). Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales: Cyclamen africanum, Zygophyllum cornutum et évaluation de leur activité anti-inflammatoire. Thèse doctorale, Octobre.
6. **Charalampia Dimou, Antonios E. Koutelidakis.** (2017). From Pomegranate Processing By-Products to Innovative Value-Added Functional Ingredients and Bio-Based Products with Several Applications in Food Sector. Jan.
7. **Clarke, G., Ting, K.N., Wiart, C., Fry, J.** (2013). High correlation of DPPH radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. Antioxidants (Basel), 2(1), 1–10.
8. **Debjit Bhowmik, Harish Gopinath, B. Pragati Kumar, K.P. Sampath Kumar.** (2013). Medicinal Uses of Punica Granatum and Its Health Benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. License: CC BY 4.0.
9. **Dhumal, Sangram.** (2014). Recent Advances and the Developments in the Pomegranate Processing and Utilization: A Review. Sep.
11. **Dimou, Charalampia & Koutelidakis, Antonios E.** (2017). From Pomegranate Processing By-Products to Innovative Value-Added Functional Ingredients and Bio-Based Products with Several Applications in Food Sector. Jan.
12. **Favier, A.** (2003). The oxidative stress: Concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. [Doctoral dissertation, Université].
13. **Hussain, Syed Zameer, Bazila Naseer, Tahiya Qadri, Tashooq Ahmad Bhat.** (2021). Pomegranate (Punica granatum) - Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. Chapter, Jun. DOI: 10.1007/978-3-030-75502-7_10.
14. **Jancy Rani, D.** (2024). Therapeutic Efficacy of Ficus religiosa Leaves and Punica granatum Fruit. Apr.
15. **Johann, S., & Ramires, R. P.** (2022). Biological properties and phytochemical composition of Punica granatum peel extracts: A review. Journal of Ethnopharmacology, 284, 114799.

16. **Joglekar, Madhura, Neha Pandey, Suruchi Jamkhedkar.**(2024).PUNICA GRANATUM L. WINE - HEALTH BENEFITS. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, May. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.15(5).1453-59.
17. **Kaci Meziane, Zoubida, Driss Elothmani, Lynda Boutekrabt Benhadja.** (2016).Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria. Fruits, Jan. DOI: 10.1051/fruits/2015044.
18. **Kedare, S. B., & Singh, R. P.** (2011).Genesis and development of the DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology, 48(4), 412–422.
19. **Kelleci, Kubra.** (2025).Potential of Green Gold Nanoparticles Synthesized from *Punica granatum* Extract on Leishmaniasis and Breast Cancer Treatment. Jan. DOI: 10.1002/slct.202404327.
20. **Khade, Omkar, Pravin Savata Gade, Rutuja Sonkar, Sruthi K.** (2023).Plant secondary metabolites: Extraction, screening, analysis and their bioactivity. International Journal of Herbal Medicine, Mar. DOI: 10.22271/flora.2023.v11.i2a.855.
21. **Makin, Hugh L. J., John Honour, Cedric H. L. Shackleton, William J. Griffiths.** (2010).General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. Chapter, Jun. DOI: 10.1023/b135931_3.
22. **Mishra, A., Kumar, S., & Pandey, A. K.** (2020).Scientific validation of the medicinal efficacy of polyphenols: Current trends and future directions. Phytotherapy Research, 34(8), 1996–2017.
23. **Mohan, Maureen, Mohanavarshaa C. A., Priya D., Anjana G. V.** (2024).Review of Pharmacological and Medicinal Uses of *Punica granatum*. Cureus, Oct. DOI: 10.7759/cureus.71510. License: CC BY 4.0.
24. **Mohamed el Khasmi, Mohamed Farh.**(2022).Impact des plantes médicinales sur le rein (The impact of medicinal plants on the kidney). Mar.
25. **Mphahlele, R. R., & Fawole, O. A.** (2020).Evaluation of antioxidant activity, total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts. Antioxidants, 9(11), 1028.
26. **Neelam, Arun D. P. Singh.** (2012).Punica granatum: A review on pharmacological and therapeutic properties. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, Jan.
27. **Özlem Güçlü Üstündağ, Giuseppe Mazza.**(2007).Saponins: Properties, Applications and Processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Feb. DOI: 10.1080/10408390600698197.
28. **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K.** (2005).Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290–4302.

-
29. **Ramesh Ravikumar, Mukil Sunil.** (2025).Antimicrobial, Anti-inflammatory, and Antioxidant Properties of Punica Granatum Peel: An In-Vitro Analysis. Jan. DOI: 10.48047/7vn9sh80.
 30. **Rahmani, Arshad Husain, Mohamed Ali Alsahli, Saleh Abdulrahman Almatroodi.** (2017).Active Constituents of Pomegranates (*Punica granatum*) as Potential Candidates in the Management of Health through Modulation of Biological Activities. Pharmacognosy Journal, Jul. DOI: 10.5530/pj.2017.5.109.
 31. **Shubham Andhale, Anjali Bhoite.** (2024).Thesis Chapter 1. Jun.
 32. **Shweta Singh, Apurba Pal.** (2024).Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis and Bioengineering. Chapter, Sep.
 33. **Showkat Ahmad Bhawani, Othman Sulaiman, Rokiah Hashim, Mohamad Nasir Mohamad Ibrahim.** (2010).Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Jul. DOI: 10.4314/tjpr.v9i3.56293.
 34. **Sies, H.** (2020).Oxidative stress: Eustress and distress in redox homeostasis. Nature Reviews Endocrinology, 16(7), 363-374.
 35. **Singh, R., Sharma, P., Kaur, P., & Gupta, A.** (2021).Role of endogenous antioxidant enzymes in protection against oxidative stress: A review. Free Radical Biology and Medicine, 171, 161–180.
 36. **Tortorano, A. M., Cabrini, E., & Viviani, M. A.** (1979).Sensibilité in vitro de levures à cinq antifongiques: comparaison de deux méthodes (CMI en gélose et diffusion en disque). Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale, 8(1), 69–73.
 37. **Yang, Yurong, Wang Chen, Zhinan Mei, Yuanlong Liu.** (2025).The multifaceted role of microRNA in medicinal plants. Mar. DOI: 10.48130/mpb-0025-0006. License: CC BY 4.0.
 38. **Zahin, M., Ahmad, I., & Aqil, F.** (2021).Punica granatum: A review on its potential role as an antimicrobial and wound healing agent. Journal of Ethnopharmacology, 278, 114288.
 39. **Zarfeshany, Aida, Sedigheh Asgary, Shaghayegh Haghjooy Javanmard.** (2014).Potent health effects of pomegranate. Advanced Biomedical Research, Mar. DOI: 10.4103/2277-9175.129371. License: CC BY-NC-SA 3.0.

Partie VII : Annexes

Annexe**Préparation d es réactives :**

réactif de Wagner: Dissoudre 2g de KI et 1,27g d'I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml d'eau.

Réactif de Mayer: Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60ml d'eau et également 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau.

Réactif d'amidon: Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.

Composition des milieux de culture :Eau physiologique :

Na Cl 9g

Eau distillée 1000 ml qsp

Bouillon Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf 2g

Hydrolysate acide de caséine 17.5g

Amidon 01.5g

Eau distillée 1000 ml qsp

pH : 7.4

Gélose Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf 4,0g

Hydrolysate acide de caséine 17.5g

Amidon 1.5g

Agar 15g

Eau distillée 1000 ml qsp

pH = 6,8

Bouillon sabouraud :

Dextrose (glucose) 4 g

Peptone 0,5 g

Tryptone 0,5g

Chloromphenicol 0,005g