

**République Algérienne Démocratique et
Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

**Université Abderrahmane MIRA de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie Département des Sciences
Alimentaires**

MEMOIRE DE FIN De CYCLE

**En Vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'état en Contrôle de Qualité et
Analyses.**

Thème

*Effet de l'extrait acétonique de l'écorce de deux
variétés de grenade (Quares et Lahlou) sur
Candida albicans*

Réalisé par :

M^{elle} Benmeziane Djida
M^{elle} Bedja Baya

Membres du Jury:

Présidente: M^{me} BOUALI N.
Examinatrice I: M^{me} LEHOUCHE R.
Examinatrice II: M^{elle} SAIDANI K.
Promotrice: M^{me} MERZOUK H.

Remerciements

*Louange à Allah, Seigneur de l'univers, le tout puissant le
miséricordieux qui nous a inspiré et comblé de bienfaits, on lui
rend grâce*

*Nous remercions énormément notre promotrice M^{me} Merzouk H.
pour son encadrement et ses conseils et surtout pour sa
gentillesse.*

*Nous tenons à remercier vivement M^{me} Bouali N. d'avoir présidé le
jury et M^{me} Lehouche R. et M^{elle} Saidani k. d'avoir accepté
d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à toute personne
ayant contribué à l'élaboration de ce travail.*

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé;

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chères ;

Au deux être les plus chers au monde qui ont donnés sens à mon existence, et qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours.

Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.

Mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, merci papa, Avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

A ma grand- mère: Wahchia

A mes très chers frères: Salem et Hocine

A ma très chère sœur: Nacira.

A mes cousins(es), oncles, tantes.

A mes amies : Farida, Nacira, Sonia, Souad, Sabiha, Aicha, Baya M, Sonia G3, Karima, Douda, Lamia et Dehbia.

A ma binôme Baya et sa famille.

A toute la promotion de CQA 2011 -2012.

Djida

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé;

Je le dédie aux personnes qui me sont plus chères au monde; à mon Dada et Maman, à mon Papa et Mama, qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours, avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé et à mes coté.

A ma très chère sœur: Siham.

A mon très chère frère Massi et sa femme Kahina et leur fils Aksil.

A mes très chère frères : Hmano, Fateh et Faiz.

A mes grands-parents.

A mes cousins, cousines, oncles et tantes.

A mes amies: Farida, Nacira, Sonia, Lynda, Lamia, Sabiha, Baya M, Aicha, Souad, Karima, Douada, SoniaG03 et Dehbia.

A ma binôme Djida et toute sa famille.

A toute la promotion CQA (2011/2012).

Baya

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Partie théorique

Chapitre I: généralités sur la grenade

I-1-Description et classification	03
I-2-Exigences écologiques du grenadier	04
I-3-Intérêt et utilisation de la grenade	05
I-3-1-Intérêt de la grenade	05
I-3-1-1- Intérêt nutritionnel	05
I-3-1-2-Intérêt thérapeutique	06
I-3-2-Utilisation de la grenade	08
I-3-2- 1- Utilisation agroalimentaire	08
I-4-2- 2- Utilisation industrielle	09

Chapitre II: le stress oxydant et les antioxydants

II-1-Les radicaux libres	10
II-2 -Le stress oxydant.....	11
II-2-1-Définition du stress oxydant	11
II-2- 2- Les conséquences du stress oxydant.....	12
II-3 -Les antioxydants	13
II-3-1 -Les systèmes de défenses contre les radicaux libres	14
II-3-1-1-Le système antioxydant endogène.....	14
II-3-1-2-Le système antioxydant exogène.....	14

Chapitre III: généralités sur les candidoses buccales

III-1-Généralités sur <i>Candida albicans</i>	19
III- 2-Biofilm de <i>Candida albicans</i>	21
III-2-1-Définition d'un biofilm	21
III-2-2-Les étapes de formation d'un biofilm	21
III-3-Les candidoses buccales	22
III-3-1- Les facteurs favorisant le développement d'une candidose buccale.....	23
III-3-2-Les moyens de prévention et de traitement des candidoses buccales	23
III-3-3-Le mode d'action et cible cellulaire des antifongiques.....	24

Partie pratique

Chapitre I: matériel et méthodes

I-1-Matériel végétal.....	25
I-1-1-Classification botanique de <i>Punica granatum</i> L.....	25
I-1-2-Traitements des échantillons.....	25
I-1-2-1-Séchage.....	25
I-1-2-2-Broyage et tamisage.....	25
I-2-Extraction des composés phénoliques.....	26
I-3-Dosage des composés phénoliques	27
I-3-1-Dosage des polyphénols totaux.....	27
I-3-2-Dosage des flavonoïdes	27
I 3-3- Dosage des tanins hydrolysables	28
I-3-4-Dosage des tanins condensés	29
I-4-Extraction et dosage des caroténoïdes	30
I-5-Evaluation de l'activité antioxydante	30
I-5-1-Pouvoir réducteur.....	30
I-5-2-l'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	31
I-6-Evaluation de l'activité antifongique	32
I-6-1-Matériel biologique.....	32
I-6-2-Standardisation de la suspension fongique	33

I-6-3-L'antibiogramme	33
I-6 -4-Détermination des concentrations minimales inhibitrices	34
I-6-5-Détermination des concentrations minimales fongicides	35
I-6-6-Test d'inhibition d'attachement de <i>Candida albicans</i>	36
I-7-Analyse statistique.....	36

Chapitre II: Résultats et discussions

II-1- Les polyphénols totaux	37
II-2-Les flavonoïdes	38
II- 3-Les tanins hydrolysables	39
II- 4-Les tanins condensés	40
II- 5-Les caroténoïdes.....	41
II-6-Evaluation de l'activité antioxydante.....	42
II-6-1-Le pouvoir réducteur	42
II-6-2- L'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	43
II-7- L'activité antifongique.....	44
II-7-1-l' antibiogramme	44
II-7-2 -Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides	48
II-7-3-Test de l'inhibition de l'attachement du biofilm	48
Conclusion.....	54
Références bibliographiques	
Annexes	
Glossaire	

Liste des abréviations

BHIB: Brain Heart infusion Broth
BSA: Bovin Serum Albumin
C. albicans: *Candida albicans*
CAM : *Candida albicans*
CMF: Concentration minimal fongicide
CMI: Concentration minimale inhibitrice
DPPH : 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG : Equivalent en acide gallique
EAT : Equivalent en acide tannique
EPS : Exopolysaccharides
EQ : Equivalent en quercétine
ERO : Espèces Réactives Oxygénées
ES: extrait sec
GPX: glutathion peroxydases
HA: hydroxyapatite
IC₅₀ : Concentration à 50% d'inhibition
rpm : rotation par minute
SDS: Dodecyl sulfate de sodium
TCA: Trichloracétique
TEA: Triéthanolamine
UFC: Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure N°1: photographie des feuilles, des fleurs et des fruits de grenadier	04
Figure N°2: origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie	11
Figure N°3: nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	12
Figure N°4: morphologie de <i>Candida albicans</i>	19
Figure N°5: représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm	22
Figure N°6: protocole d'extraction des composés phénoliques.....	26
Figure N°7: teneur en polyphénols totaux des extraits des deux variétés de grenade	37
Figure N°8: teneur en flavonoïdes des extraits des deux variétés de grenade.....	38
Figure N°9: teneur en tanins hydrolysables des extraits des deux variétés de grenade.....	39
Figure N°10: teneur en tanins condensés de l'écorce des deux variétés de grenade	40
Figure N°11: teneur en caroténoïdes de l'écorce des deux variétés de grenade.....	41
Figure N°12: pouvoir réducteur des extraits des deux variétés de grenade.....	42
Figure N°13: activité antioxydante par la méthode de H ₂ O ₂	43
Figure N°14: antibiogramme des deux extraits phénoliques vis-à-vis des 3 souches	45
Figure N°15: effet des deux extraits sur CAM1	46
Figure N°16: effet des deux extraits sur CAM2.....	46
Figure N°17: effet des deux extraits sur CAM3.....	46
Figure N°18: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM1	49
Figure N°19: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM2	50
Figure N°20: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM3	50
Figure N°21: photos des biofilms des deux souches sur les disques d'hydroxyapatite sous le microscope électronique à balayage à 30µm.....	51

Liste des figures des annexes

Annexe 2

Figure N°1: courbe d'étalonnage des flavonoides

Figure N°2: courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables

Figure N°3: courbe d'étalonnage des caroténoïdes

Figure N°4: courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur

Figure N°5: courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Liste des tableaux

Tableau I: composition et valeur nutritionnelle de la portion comestible de grenade	06
Tableau II: modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols	18
Tableau III: taxonomie de <i>Punica granatum</i> L	25
Tableau IV: concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits vis-à-vis des 3 souches de <i>Candida albicans</i>	48
Tableau V: pourcentage d'inhibition de l'attachement du biofilm des 3 souches de <i>Candida albicans</i> par les deux extraits.....	49

Liste des tableaux des annexes

Annexe1

Tableau I: composés phénoliques essentiels de l'écorce de grenade et leurs structures.

Annexe3

Tableau I: diamètres des zones d'inhibition.

Tableau II: inhibition de l'attachement du biofilm des trois souches par les deux extraits.

Introduction

Ces dernières années, la recherche sur les plantes médicinales a attiré une attention globale surtout sur les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle comme un complément ou un traitement des maladies humaines, parce que ces plantes sont riches en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les tanins, les flavonoïdes..., qui ont plusieurs propriétés : antioxydante, antimicrobienne ... (Cowan, 1999 ; Dahanukar et al., 2000).

Les microbiologistes s'intéressent beaucoup à l'usage d'extraits de plantes médicinales comme agents antimicrobiens, du fait de l'apparition de la résistance multiple des microorganismes pathogènes humains aux antibiotiques. Ceci a lancé la recherche de nouvelles substances et sources d'antimicrobiens, le public se rend compte de plus en plus des problèmes des prescriptions médicales et l'abus infini des antibiotiques; en outre beaucoup de gens préfèrent avoir plus d'autonomie sur leur soins médicaux (Jayaprakasha et al., 2006).

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est un arbuste qui est depuis longtemps convoité en médecine ayurvédique, toutes ses parties, fruits, racines, écorce, pépins sont utilisés pour traiter des maladies, infections, blessures et inflammations (Ahmed et al., 2005).

Plusieurs chercheurs ont montré que le fruit de cet arbuste a un effet anticancéreux, antidépresseur et antimicrobien (Laifer , 2005 ; Lansky et al., 2007). Effectivement, l'écorce de la grenade est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites (Jung et Curtay, 2010). Ces propriétés sont dues à la capacité antioxydante de la grenade, qui est proche de celle du thé vert (Gil et al., 2000). Celle-ci est due à son abondance en composés phénoliques, tanins, flavonoïdes..., qui sont connus par leur effet bénéfique sur divers systèmes biologiques (Negi et al., 2003 ; Li et al., 2006).

La majorité des études sur les propriétés antimicrobiennes des extraits bruts de grenade se focalisent sur certains germes d'infections comme *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus*...alors qu'il y'a très peu de publications sur l'inhibition de *Candida albicans* et notamment son attachement aux surfaces de contact. De nature opportuniste, ce germe peut infecter n'importe quelle partie du corps humain (gencive, langue, orteils...) avec invasion des tissus induisant ainsi une candidose. En plus de sa

capacité d'invasion tissulaire, son adhésion aux matériaux artificiels comme les prothèses et autres polymères peut causer d'importantes infections.

Par ailleurs, il existe peu de données et d'études évaluant le potentiel antioxydant et antimicrobien du grenadier en Algérie. L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence *in vitro* les propriétés antioxydantes et antifongiques des extraits acétoniques de l'écorce de deux variétés de grenade *Lahlou* et *Quares* de la région de Bejaia.

Ce travail est scindé en deux parties: la première partie est une synthèse bibliographique donnant des généralités sur la grenade, un aperçu sur le stress oxydant et les antioxydants, ainsi que des généralités sur les candidoses buccales. La deuxième partie regroupe les différents aspects pratiques de notre étude, les résultats obtenus et leur discussion.

Partie théorique

Chapitre I :

Généralités sur la grenade

I-1-Description du grenadier

Le terme grenade vient du latin « *malum granatum* » qui signifie: « fruit à petits grains » (**Gagnon, 2008**).

Le nom latin *punica* vient de ce que les Romains appellent « *punicum malum* », littéralement « pomme punique », par allusion à l'ancienne Phénicie, où l'on entretenait de grands vergers de grenadiers (**Vanier et Cyr, 2007**).

Punica granatum L, le grenadier en français ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique latine, régions dont cet arbuste est originaire (**Gagnon, 2008**).

Il est disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du II^{ème} siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois (**Elodie, 2009**).

Selon **Fabre et Ermosilla (2008)**, le grenadier (*Punica granatum* L.) est un arbuste de 2 à 5m de hauteur qui appartient à la famille botanique des « *punicaceae* ». Le tronc recouvert d'une mince écorce grise; se ramifie irrégulièrement en branches plus ou moins épineuses portant des feuilles opposées à court pétiole, ovales, entières, vertes luisantes, sans stipules.

Les fleurs rouges, pourpres ou grenats sont solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de 2 ou 3.

Les feuilles sont persistantes sous les climats subtropicaux ou caduques, elles sont opposées ou verticilles, glacées, oblongues, de 3 à 7cm de long et de 2cm de large. Elles sont d'un vert intense et brillant (**Mortan, 1987**).

La grenade est un fruit sphérique quelque fois aplati, de 5 à 12cm de diamètre, à écorce dure et coriace de couleur jaune-rouge violacée avec des nuances brunâtres, elle renferme dans des « loges » délimitées par des cloisons épaisses, de nombreuses graines, translucides. La saveur de la grenade, douce et légèrement acidulée, est la résultante d'un

équilibre harmonieux entre deux de ses constituants: **les glucides**, d'une part et **les acides organiques**, d'autre part (Sheets *et al.*, 1994).

Selon **Mortan (1987)**, la cueillette de la grenade se fait de 5 à 7 mois après la floraison. Elle ne munit plus après la cueillette il est donc important qu'elle soit cueillie à maturité.



Figure N° 1: photographie des feuilles, des fleurs et des fruits de grenadier (Anonyme1).

I-2-Exigences écologiques du grenadier

Selon **Everinof, (1949); walali, (2003) et Oukabli, (2004)**, les exigences de culture du grenadier sont l'eau et la température comme le disent les agriculteurs.

Punica ganatum peut tolérer des températures de -12°C en hiver, de 42°C en été, et une tolérance au calcaire et à la salinité. Sachant que les meilleurs résultats d'installation de plantations sont obtenus en sol d'alluvions profondes avec des disponibilités satisfaisantes en eau.

I-3-Intérêt et utilisation de la grenade

I-3-1-Intérêt de la grenade

I-3-1-1-Intérêt nutritionnel

La grenade est un fruit de valeur nutritionnelle élevée, elle est très proche de la figue fraîche et de la mangue par sa valeur énergétique et sa teneur en glucides. Elle est très juteuse et très sucrée, mais la présence d'acide citrique la rend également acidulée(**Anonyme2**).

La grenade est aussi une source non négligeable de vitamine C. Cette vitamine antioxydante et antifatique, contribue à la santé des os, des cartilages, des dents et des gencives. De plus, elle protège contre les infections, favorise l'absorption du fer contenu dans les végétaux et accélère la cicatrisation (**Anonyme3**).

Ce fruit fournit aussi de nombreuses vitamines du groupe B, et plus particulièrement de la vitamine B6, également connue sous le nom de pyridoxine. Cette dernière fait partie des coenzymes qui participent au métabolisme des protéines et des acides gras, ainsi qu'à la fabrication de neurotransmetteurs. De plus, elle collabore à la fabrication de globules rouges. Elle est aussi nécessaire à la transformation du glycogène en glucose et contribue au bon fonctionnement du système immunitaire. Enfin, cette vitamine joue un rôle dans la formation des cellules nerveuses (**Anonyme3**).

La grenade renferme également de nombreux oligo-éléments et minéraux, tels que le potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre (**Anonyme3**).

La grenade, à condition d'en consommer les graines, est très riche en fibres insolubles contenues dans le tégument de ces graines (**Anonyme2**).

Le tableau I illustre la composition et la valeur nutritionnelle pour 100g de portion comestible de grenade.

Tableau I: composition chimique et valeur nutritionnelle de la portion comestible de grenade (Storey, 2007).

Constituants	Quantité par 100g
Eau (g)	80 à 84,4
Protéines (g)	0,5 à 0,95
lipides (g)	0,3 à 0,9
Glucides (g)	16,4
Fibres (g)	0,2 à 0,6
Cendres (g)	0,36 à 0,73
Calcium (mg)	3 à 12
Phosphore (mg)	8
Fer (mg)	0,3 à 1,2
Sodium (mg)	3
Potassium (mg)	259
Carotènes (mg)	0
Thiamine(B ₁) (mg)	0,03
Riboflavine(B ₂) (mg)	0,03
Acide ascorbique (mg)	4 à 6
Acide citrique (mg)	0,46 à 3,6
Acide borique (mg)	0,005

I-3-1-2 Intérêt thérapeutique

Que ce soit comme aliment de qualité ou comme véritable produit de santé, la grenade dont l'utilisation médicale relève d'une tradition millénaire et dont les vertus sont confirmées aujourd'hui par la science, est de plus en plus appréciée. Plus de 250 études scientifiques ont démontré que les substances protectrices de la grenade, ses polyphénols, peuvent protéger contre le stress oxydatif, les maladies cardio-vasculaires, la démence, les réactions inflammatoires virulentes et même le cancer (Ahmed et al., 2005).

Partout où elle était cultivée, la grenade fut un des outils de la médecine traditionnelle. Dans la médecine populaire, toutes ses parties, fruits, racines, écorce, pépins sont utilisées pour traiter maladies, infections, blessures et inflammations. Dans la tradition de la médecine ayurvédique, elle est appréciée pour son effet anti-inflammatoire. Son jus est considéré comme boisson rafraîchissante et comme tonique pour le système circulatoire, il a un effet astringent rafraîchissant et favorise l'irrigation sanguine (Ahmed et al., 2005).

Des études précliniques actuelles montrent que les polyphénols de grenade peuvent combattre la dégénérescence inflammatoire du tissu cartilagineux en particulier en cas d'arthrite rhumatoïde (**Ahmed et al., 2005**).

L'écorce du fruit est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites. L'écorce et les racines de l'arbre et en partie aussi l'écorce du fruit, furent utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier contre le ténia et la dysenterie amibienne.

Les fleurs de grenade étaient utilisées en Perse pour le traitement du diabète gras (**Jung et Curtay, 2010**).

Les substances particulières très actives qui composent la grenade agissent comme régulateurs de la cellule, et activent ainsi les systèmes de protection antioxydants du corps (**Jung et Curtay, 2010**).

La protection antioxydante chez l'homme s'améliore de 9% après une cure d'une semaine de consommation journalière de 250 ml de jus de grenade (**Aviram et al., 2000**). Une autre étude a montré une augmentation du statut antioxydant total (SAT) dans le sang de 130% après une cure d'un an d'une consommation journalière d'un verre de jus de grenade (**Aviram et al., 2004**). Evidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade: ainsi, de forts effets protecteurs antioxydants ont été constatés sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique (**Ajaikumar et al., 2005**) ainsi que sur le foie (**Kaur et al., 2006**).

Une étude de **Hartmann (2006)** a démontré que le jus de grenade réduit de moitié le dépôt de la protéine bêta-amyloïde dans le cerveau. Celle-ci joue un rôle décisif dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer. En outre, les polyphénols de grenade inhibent la production de TNF-alpha dans les cellules inflammatoires au niveau du cerveau (**Jung et al., 2006**).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes sont étudiées par un grand nombre de chercheurs à travers le monde. Il a été observé que des extraits ou des composés purifiés, issus

de diverses parties du grenadier, possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antihelminthiques. Il semble que les principes actifs de *Punica granatum* sont ses tanins et ses alcaloïdes (**Elodie, 2009**).

Haidiri et al. (2009), ont montré que les composés phénoliques de grenade tuent également le virus de la grippe Influenza-A et inhibent sa multiplication.

Ils ont aussi une action contre les virus HIV (**Neurath et al., 2004 et 2005**), contre les plasmodies de la malaria, contre certaines bactéries (**Reddy et al., 2007**).

En effet, Les extraits de l'ensemble du fruit ont été très actifs contre *Micrococcus pyogens*, *S. aureus*, *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ils étaient également très efficace contre les bacilles pathogènes intestinaux tels que *Salmonella paradysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella monetevideo*, et *Shigella paradysentriae* et une activité contre *Micrococcus pyogens* (**Ram, 1998**).

Grâce à la présence de punicalagin, l'écorce de grenade se montre très efficace contre *Candida albicans*. (**Azzouz et al., 1982**).

I-3-2-Utilisation de la grenade

I-3-2-1-Utilisation agroalimentaire

L'industrie des boissons, s'intéresse de près à la grenade avant tout pour son côté exotique et son goût nouveau (**Edeas, 2010**).

L'écorce de grenade rejeté lors de la production du jus est renommé pour ses effets sur la santé, peut faire un supplément nutritif pour l'alimentation du bétail (**Zalman, 2008**).

En Inde, les graines de la grenade servent d'épice (**Leuenberger, 2009**) et sont utilisées pour garnir les salades et les desserts dans beaucoup de régions du monde (**Al-Said et al., 2009**).

L'écorce de grenade, un sous-produit peu coûteux de l'industrie de jus est une source abondante en ellagitanins a pu être employé comme agent conservateur pour l'industrie alimentaire ou comme supplément diététique (**Hollebeeck et al., 2005**)

I-3-2-2 Utilisation industrielle

- Les teintures naturelles

Selon **Cardon (2003)**, le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, de gris, bruns et noirs. Les parties utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce des grenades, recueillie et séchée à mesure de la consommation des fruits, mais aussi l'écorce de la racine, des tiges et du tronc.

L'écorce de la grenade, ou *malicorium*, contient environ 28% d'ellagitanins, tel que le flavogallole, de couleur jaune, la punicaline, la punicalagine, la puniacortéine, la punigluconine et les granatines A et B.

L'industrie européenne de l'impression des tissus, au XIX^{ème} siècle, a intégré l'écorce de grenade et la racine de grenadier dans la vaste gamme des teintures naturelles.

Les substances colorantes issues du grenadier sont utilisées de façon traditionnelle, dans plusieurs pays pour la teinture des tapis.

- Le tannage et la teinture des cuirs

L'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs. Ainsi, c'est l'écorce de ce fruit qui était employée, avec mordantage à l'alun, pour donner leur belle couleur jaune aux cuirs (**Anonyme 4**).

Dans les années 1950, le grenadier fournissait, grâce à l'écorce de ses fruits, une matière tannante, sans emploi dans les industries européennes, mais très utilisée dans le nord de l'Afrique pour la préparation des maroquins jaunes. (**Fournier, 1948**).

Chapitre II :

*Le stress oxydant et les
antioxydants*

II-1-Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons libres; le radical OH[•], l'anion superoxyde O₂^{-•}, l'oxyde nitrique NO (**Milane, 2004**).

Il existe d'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ¹O₂, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres sont produits naturellement par l'organisme (**Milane, 2004**):

- au niveau de la respiration mitochondriale, lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H₂O, il est estimé 2 à 5% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrie est transformé en radicaux superoxydes O₂[°] de manière continue et physiologique.
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes et des lysosomes;
- d'autres sources des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été identifiées dans la cellule tel que : la xanthine oxydase, la famille du cytochrome p450 et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (**Baraud, 2011**).

Frenkel et Chrzan (1987) ont démontré qu'ils existent des promoteurs de tumeurs qui peuvent induire la formation de peroxyde d'hydrogène par des leucocytes humains.

De plus la pollution, la cigarette et de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de radicaux libres.

Figure N°2 représente et explique les différentes origines des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie, illustré dans la figure N°2:

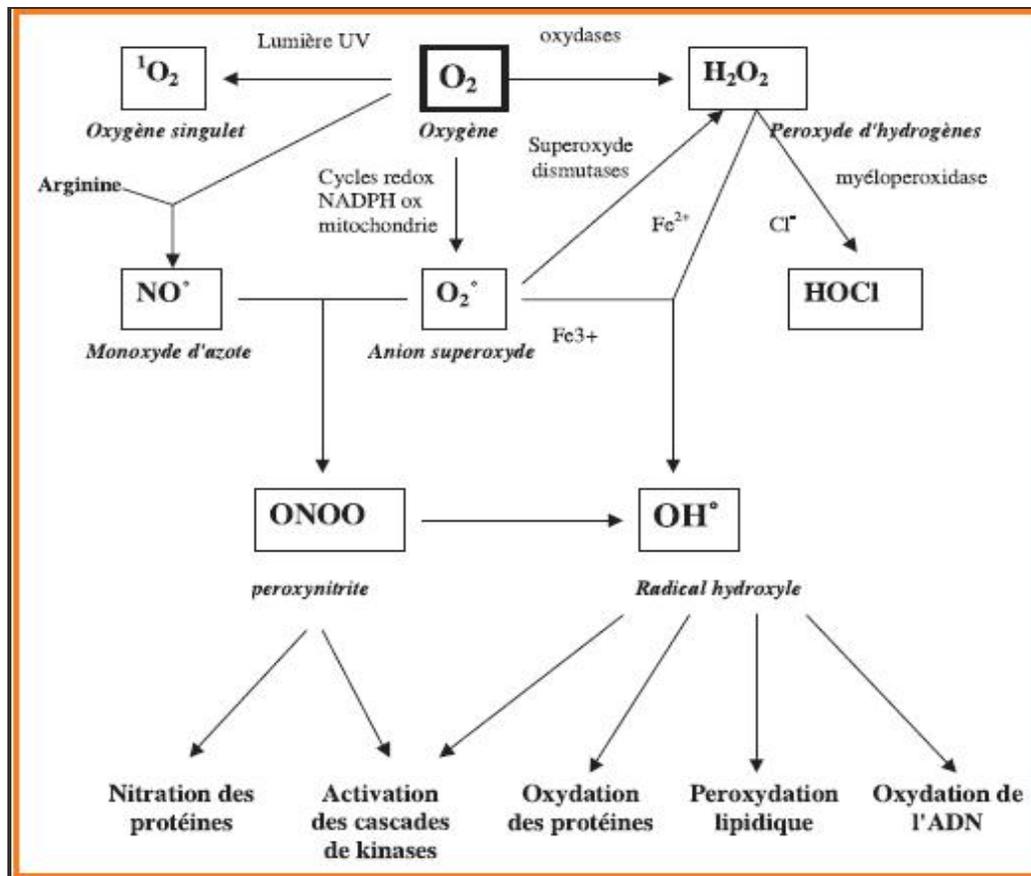


Figure N°2: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Adjadj, 2009).

II-2-Le stress oxydant

II-2-1-Définition du stress oxydant

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un déséquilibre prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. Les composés incriminés dans la production des radicaux libres sont les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO), qui oxydent des molécules biologiques menant ainsi à la formation de radicaux carbonés qui peuvent réagir avec O₂ en donnant des composés réactifs tels que: les radicaux alkoxydes et peroxydes (RO[•], ROO[•]) et les alkylperoxydes. C'est le cas des acides gras à longue chaîne insaturés lors de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

II-2-2-Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides :

- **Oxydation de l'ADN:** l'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène; les radicaux libres peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin, ils peuvent aussi attaquer l'ADN polymérase translesionnelle infidèle aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, cette modification de l'ADN induit des mutations par transversions GC(guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses (**Favier,2003; Pourut, 2008**).
- **Les protéines:** les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH), c'est le cas de la plus part des enzymes qui deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales (**Favier ,2003**). Certaines modifications des acides aminés sont illustrées dans la figure N°3 :

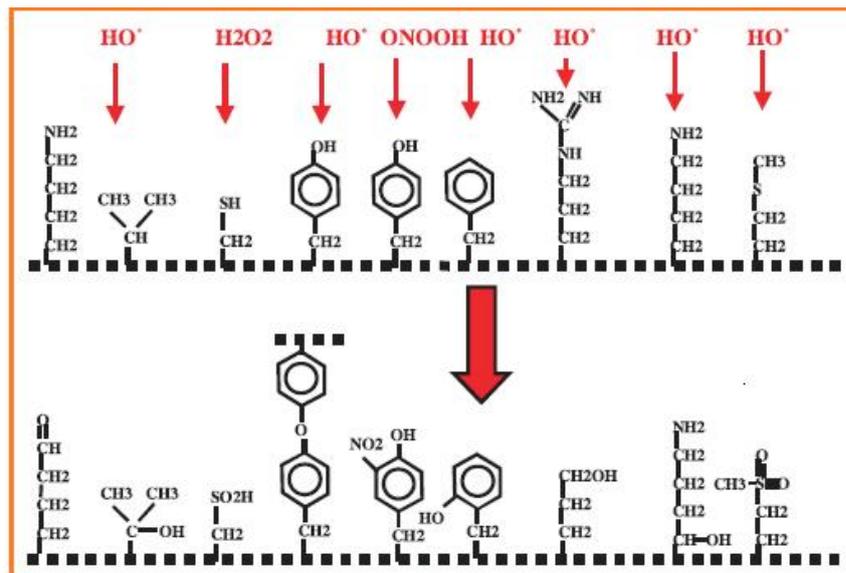


Figure N°03: nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (**Favier ,2003**).

- **Peroxydation lipidique** : Les acides gras polyinsaturés qui sont la cible privilégiée de l'attaque par des radicaux libres (COO°) arrachent un hydrogène sur le carbone situé entre deux double liaisons pour la formation d'un radical diène conjugué oxydé ou radical peroxyde, cette réaction appelée peroxydation lipidique.

Si cette attaque touche les lipoprotéines circulantes, elle aboutit à la formation de LDL qui, captées par les macrophages forment des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires.

L'attaque des phospholipides membranaires provoque la modification de la fluidité membranaire, dont le dysfonctionnement de nombreux récepteurs, transporteurs et la transduction des signaux (**Esterbauer et al., 1992**).

- **L'oxydation des polysaccharides**: le glucose par exemple peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\bullet , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (**Favier, 2003**).

II-3-Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent les protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique; les oligoéléments (Cu, Fe, et Zn...) et des petites molécules liposolubles (vitamine E, β -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique). Ils peuvent être définis comme une substance qui, présente à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, qui prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation (**Packer et al., 1979**).

II-3-1-Les systèmes de défenses contre les radicaux libres

Pour éviter les conséquences néfastes des radicaux libres ou les ERO, il existe deux systèmes de défense, l'un par le système antioxydant endogène et l'autre par les antioxydants apportés par l'alimentation:

II-3-1-1-Le système antioxydant endogène

Les cellules possèdent un système antioxydant pour assurer l'élimination des ERO et respecter l'état redox intracellulaire. Ce système fonctionne selon trois axes:

- Empêcher les espèces chimiques de réagir ensemble,
- Transformer les oxydants en espèces moins toxiques,
- Prévenir ou réparer les lésions oxydatives induites.

Il se compose d'enzymes; les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et les glutathion peroxydases (GPX) ayant une action directe ou indirecte sur les ERO (**Baraud, 2011**).

II-3-1-2-Le système antioxydant exogène

Selon **Rice et al. (1995)**, les antioxydants exogènes sont des antioxydants naturels apportés par l'alimentation, les plus connus sont les caroténoïdes, ainsi que les composés phénoliques.

A- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels lipophiles responsables des colorations variant du jaune orangé au rouge violet des fruits et légumes (**Richard, 2009**).

En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres. L'effet antioxydant du β -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur. Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes: le radical peroxyde se fixerait sur un carbone de la chaîne polyinsaturée et serait stabilisé par résonance (**Chaabi, 2008**).

B- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire (Stanley *et al.*, 2003).

Les composés phénoliques sont communément subdivisés en cinq groupes principaux: acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilbènes et lignanes (Ignat *et al.*., 2011).

➤ **Les acides phénoliques**

Un acide phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ce terme est réservé à l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Bruneton, 2008).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles responsables de la couleur des végétaux, ils constituent, la principale classe des polyphénols antioxydants et capteurs de radicaux libres.

Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes (les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines), dont les flavones et flavonols sont majoritaires dans le péricarpe de grenade et sont souvent glycosylés (Chira *et al.*, 2008; Hooper *et al.*, 2008; Chast, 2010; Wang *et al.*, 2010).

➤ **Les tanins**

Les tanins résultent de la polymérisation de molécules élémentaires à fonction phénol, ils ont la capacité de former des complexes par précipitation avec les polymères naturels comme les protéines nutritives, les enzymes digestives, les polysaccharides, les acides gras, les acides nucléiques et les acides aminés. De plus, ces derniers sont capables de faire précipiter les glucides et les ions métalliques, particulièrement le fer (Ribereau-Gayon, 1986).

Les tanins se répartissent en tanins hydrolysables (polyester de glucose et acide galique), et en tanins condensés (oligomères et polymères de flavan-3ols):

1. **Tanins hydrolysables:** ils contiennent des polyols de carbohydrate (couramment D-Glucose), ces groupements sont totalement ou partiellement estérifiés avec des groupements phénoliques tels que l'acide gallique dans les gallotanins, et l'acide éllagique dans les éllagitanins. Ces tanins sont hydrolysables par des acides et des bases faibles (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006; Bele et al., 2010**).
2. **Tanins condensés:** appelés aussi proanthocyanidines, sont des polymères de 2 à 50 (ou même plus) unités de flavonoïdes reliées par un pont de deux carbones, qui n'est pas susceptible d'être hydrolysé, la plus part des tanins condensés sont insolubles dans l'eau (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006; Bele et al., 2010**).

Les structures de quelques composés phénoliques de l'écorce de grenade sont illustrées dans le tableau I figurant dans l'Annexe 1.

C- Activité biologique des composés phénoliques

➤ Activité antioxydante

L'intérêt pour les antioxydants naturels fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Parmi ces antioxydants, de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant des composés phénoliques. Les groupements hydroxyles des composés phénoliques peuvent accepter un électron pour former des radicaux phénoxyles relativement stables, rompant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne dans les cellules (**Kehrer et Smith, 1994**).

Selon **Milane (2004)**, plusieurs études ont confirmé que les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés pour former des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus, ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer.

➤ **Activité antimicrobienne**

Selon **Packer (1979)**, les plantes possèdent un système de défense contre les herbivores, les insectes et les microorganismes. Ce système de défense est dû à la synthèse des substances aromatiques et composés phénoliques.

Les tanins sont doués d'activité antibactérienne et antifongique comme le montrent les travaux de plusieurs chercheurs; Selon **Kolodzie et al. (1999)**, les tanins présentent une forte activité antifongique sur *candida albicans* et *cryptococcus neoformans*.

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes ont une activité antifongique; à cause de la capacité d'inhibition de la germination des spores des espèces pathogènes des plantes, les flavonoïdes ont été proposés pour usage contre les infections fongiques de l'Homme. En effet, l'activité des composés 5, 7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butenyl])-(2S)-flavanone et le 7-hydroxy-3',4'- (méthylendioxy) flavan contre l'espèce pathogène opportuniste *Candida Albicans*, Ainsi que le 6, 7,4'-trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone et le 5,5'- dihydroxy-8,2',4'-triméthoxyflavone, en association avec le 5,7,4'- trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone contre *Aspergillus flavus* a été démontrée. En plus, le galangin (flavonole) montre une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarisii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*.

Une étude sur l'effet bactéricide de différents flavanones sur l'espèce *Staphylococcus aureus* a montré que c'est l'ADN gyrase qui a été inhibée (**Milane, 2004**).

❖ **Mécanisme d'action antimicrobien de certains polyphénols**

Les mécanismes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols sont illustrés dans le tableau II.

Tableau II: modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols (Packer, 1979).

Différents composés phénoliques	Exemples	Mécanisme
Phénols simples	Catéchol Epicatechine	La privation de Substrat. L'interruption de la fonction membranaire.
Acides Phénoliques Quinones	Acide Cinnamique Hypericin Chrysin	Destruction de la paroi cellulaire et désactivation des enzymes.
Flavonoïdes		
Flavones	Abyssinone	Inhibition de la transcriptase reverse du HIV.
Tannins	Ellagitannin	Liaison aux protéines. Inhibition des enzymes. Privation de substrat. Complexe avec la paroi cellulaire. Interruption de la fonction membranaire. Complexe avec les ions métalliques.
Coumarines	Warfarin	Interaction avec l'ADN des eucaryotes. (activité antivirale)

Chapitre III :

*Généralités sur Les
candidoses buccales*

III-1-Généralités sur *Candida albicans*

Candida albicans est un micro-organisme de le groupe des levures, à l'état normal, cette levure vit en harmonie sur les muqueuses des organes digestifs, dans la bouche, l'estomac et les intestins sans y causer le moindre trouble (**Lagane, 2007**).

Elle est non capsulée, non pigmentée, fermentation (+) ou (-), uréase (-) et inositol (-), elle est diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (**Chu et al., 1993**), se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastopore) (**Graser et al., 1996**), elle peut croître lorsque le pH est compris entre 3 et 8; son pH idéal est situé entre 5,1 et 6,9, ces colonies sont blanches crémeuses (**Odds, 1988**) sa forme de résistance est la présence des chlamydozoïtes (**Cole et al., 1991**). Elle est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (**Buffo et al., 1984**). Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés (figure N°4):

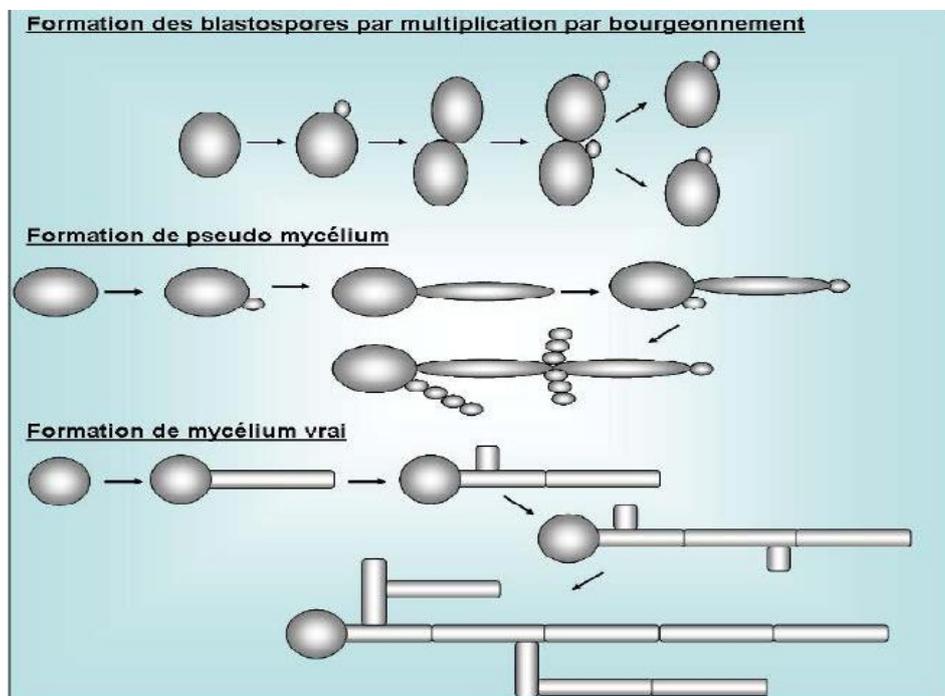


Figure N°4: morphologie de *Candida albicans* (**Lagane, 2007**).

-
- La forme blastopore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 μm avec un bourgeon de formation;
 - La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien;
 - La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (**Gow, 2002**).

Les *Candida* font partie des germes opportunistes susceptibles de devenir pathogènes et de se développer sous l'influence de divers facteurs (**Szpirglas et al., 1999 ; Agbo-Godeau et al., 2005**).

Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés:

- L'adhérence aux surfaces: elle peut se faire au niveau des muqueuses, mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand / récepteur avec les mannoprotéines de la paroi de la levure. On parle d'adhésines, telles que celles de la famille d'Als1 (**Hoyer et al., 1998**).
- La formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums : en général, le passage de la forme levure à la forme plus ou moins filamenteuse est associé à la virulence. Les tubes germinatifs, structures intermédiaires entre le blastospore et le mycélium augmentent l'adhérence aux cellules épithéliales et favorisent la colonisation (**Hoyer et al., 1998**) en induisant la propre endocytose du pathogène (**Rotrosen et al., 1985; Filler et al., 1995**). Par la suite, la production d'hyphes augmente l'invasion et la destruction tissulaire (**Filler et al., 1995**).
- L'interférence avec la phagocytose: *Candida albicans* est capable de produire des peptides acides pouvant inhiber la liaison aux phagocytes et le métabolisme oxydatif. De plus, la levure peut induire l'apoptose des macrophages et des neutrophiles échappant ainsi aux cellules du système immunitaire (**Rotstein et al., 2000; Ibat-Ombetta et al., 2003**).

-
- L'interférence avec le complément: les adhésines fongiques (mannoprotéines), apparentées au récepteur CR3 des lymphocytes, peuvent être affines pour certains composants matriciels plasmatiques tels que la fibronectine, mais aussi la fraction

C3bi du complément, perturbant ainsi la phagocytose de la levure.

- Les enzymes: la sécrétion d'enzymes hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires (**Schaller et al., 2005**). Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) (**Monod et al., 2002**), des phospholipases (**Ghannoum et al., 2000**) et des lipases, Il produit également des protéases qui dégradent les fibres collagènes dentinaires et les protéines salivaires humaines à pH acide (**Fu et al., 1997**).
- Dans la nature, la plupart des microorganismes se développent sur des surfaces inertes ou vivantes, et forment ce qui est appelé communément biofilm (**Lortholary, 2003**).

III-2-Biofilm du *Candida albicans*

III-2-1-Définition d'un biofilm

Un biofilm est constitué de micro-organismes adhérant à une surface ou une interface en milieu humide ou aqueux (**Costerton et al., 1994**), ce sont des communautés microbiennes sessiles. Sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires sécrétés par ces mêmes micro-organismes. Les EPS (exopolysaccharides) renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et acides nucléiques (**Flemming et al., 1999**).

III-2-2-Les étapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm microbien (Figure N°5) sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Characklis et Marshall, 1990; Lappin-Scott et Costerton, 1995**). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes:

- Attachement réversible des microorganismes;
- Adhésion irréversible et production d'EPS;
- Formation des micro-colonies;
- Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm;

- Détachement du biofilm

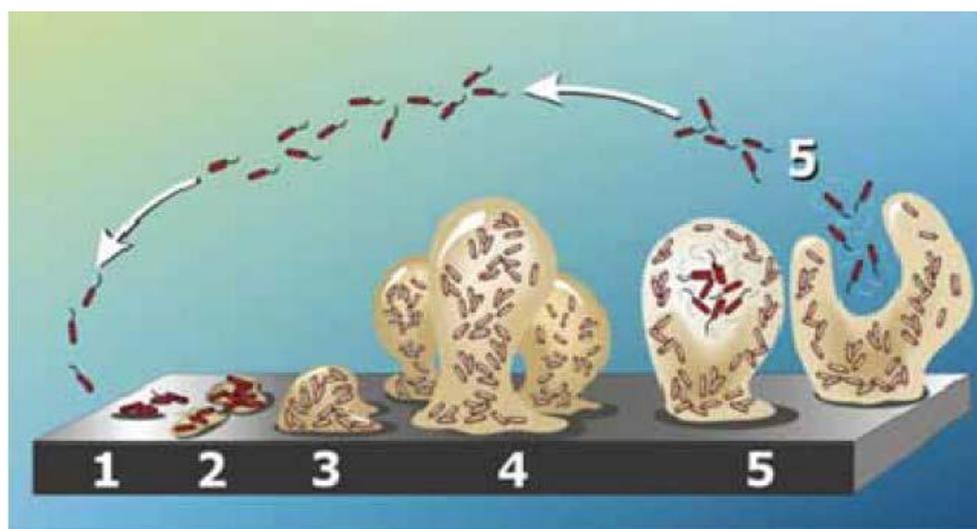


Figure N°5: représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Stoodley et al., 2002).

Des études montrent que les biofilms formés par *Candida albicans* forment une structure tridimensionnelle complexe présentant une certaine hétérogénéité spatiale avec des microcolonies séparées par des canaux aqueux (Lortholary, 2003).

Les biofilms sont caractérisés par une résistance accrue à des antibiotiques, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette résistance: selon Stewart et Costerton (2001) la première repose sur une notion de barrière physique qui expliquerait la pénétration lente et incomplète de certains antibiotiques. La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm, dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides et pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique. Enfin, la dernière hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms et dont les micro-organismes constituants pourraient présenter des formes plus résistantes.

III-3-Les candidoses buccales

Les candidoses sont des infections dues à des champignons levuriformes, du genre *Candida* dont l'espèce *albicans* est responsable de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme, dont les candidoses buccales qui sont des infections des muqueuses buccales, parmi elles: La perlèche, la glossite losangique médiane, stomatite et muguet (Agbo-Godeau et al., 2005; Szpirglas et al., 1999).

III-3-1-Facteurs favorisant le développement d'une candidose buccale

Facteurs locaux: pH acide, irritations chroniques (prothèses dentaires...), mauvaise hygiène buccale, tabagisme, radiothérapie locale, xérostomie.

Facteurs généraux

- Terrain: immunodépression: congénitale, acquise (thérapeutique, VIH), diabète, grossesse, âges extrêmes de la vie;
- Médicaments: antibiotiques généraux, oestroprogestatifs, corticoïdes (**Chevaux et al., 2002; Daouameur et al., 2009**)

III-3-2-Les moyens de prévention et de traitement des candidoses buccales

Pour prévenir les candidoses buccales:

- L'inhibition des facteurs favorisant leur développement;
- Le traitement de l'hyposialie: hydratation, stimulations salivaires, etc;
- Le traitement du terrain s'il y a lieu (stabilisation du diabète, etc.);
- La remise en état de la cavité buccale: détartrage, soins dentaires et prothétiques.

Les traitements les plus répandus dans le traitement des candidoses buccales sont les antifongiques qui appartiennent à quatre classes: les polyènes, les dérivés pyrimidiques, les dérivés azolés et les échinocandines.

Parmi les antifongiques utilisés: myconazole (Daktarin®), amphotéricine B (Fungizone®), mycostatine (Nystatine®), fluconazole (Triflucan®), sous différentes formes, plus ou moins associées entre elles (bains de bouche, voie entérale, etc.)

- Le traitement des douleurs: bains de bouche (aspirine, eau bicarbonatée), applications de gel de Xylocaïne® visqueuse, gel de polysilane, gel de sulcralfate; (**Fotos et al., 1992; Agbo-godeau et al., 2005; Revol et al., 2006**).

III-3-3-Le mode d'action et cible cellulaire des antifongiques

L'ergostérol membranaire: est un constituant essentiel nécessaire au maintien de la structure de la membrane plasmique de la levure, cette membrane joue le rôle de barrière entre le microorganisme et l'extérieur.

- L'activité fongique des dérivés azolés repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, empêchant la constitution d'une membrane plasmique fonctionnelle.
- Les polyènes, tels que l'Amphotericine B (AmB), quant à eux, interagissent directement avec ce constituant membranaire. Cette interaction forme des pores perméables dans la membrane de la levure.
- Les échinocandines inhibent la biosynthèse des glucanes de la paroi par l'inhibition de la β -1,3-glucane synthétase. Cela entraîne l'arrêt de la synthèse de la paroi cellulaire (effet fongistatique), suivi de sa destruction (effet fongicide).
- Certains antifongiques tels que les dérivés pyrimidiques peuvent inhiber la biosynthèse d'ADN ou encore interférer avec la traduction des ARNm en protéines fongiques (**Lagane, 2007**).

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériel et méthodes

I-1-Matériel végétal

L'étude porte sur l'écorce de deux variétés de grenades *Lahlou* et *Quares* provenant de la région de Gueldamene-Akbou, (Bejaia). Les grenades récoltées au mois de Novembre 2011 étaient saines et ne possèdent aucune lésion.

I-1-1-Classification botanique de *Punica granatum* L.

La taxonomie de *punica granatum* L. est illustrée dans le tableau III:

Tableau III: taxonomie de *Punica granatum* L. (Elodie, 2009)

Règne	Plantae-Plantes
Sous règne	Tracheobonta-Plantes vasculaires
Super division	Spermatophta-Plantes à graines
Division	Magnoliophyta-Plantes à fleurs
Classe	Magnoliopsida-Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i> L.

I-1-2-Traitements des échantillons

I-1-2-1-Séchage

Après avoir épluché les échantillons des deux variétés, les écorces sont séchées dans une étuve ventilée à 40°C/48 h.

I-1-2-2-Broyage et tamisage

Les écorces séchées sont broyées, d'abord manuellement, à l'aide d'un mortier et pilon, puis par un broyeur électrique. La poudre récupérée a subi un tamisage à l'aide d'une série de tamis de différentes porosités allant de 500µm à 200µm. La fraction inférieure à 200µm sera utilisée pour l'extraction des composés phénoliques.

La poudre ainsi obtenue est conservée dans des flacons en verre fumés, hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière.

I-2-Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques des écorces de grenade des deux variétés est réalisée selon le protocole préconisé par **Turkmen et al. (2006)** modifié, selon le schéma suivant:

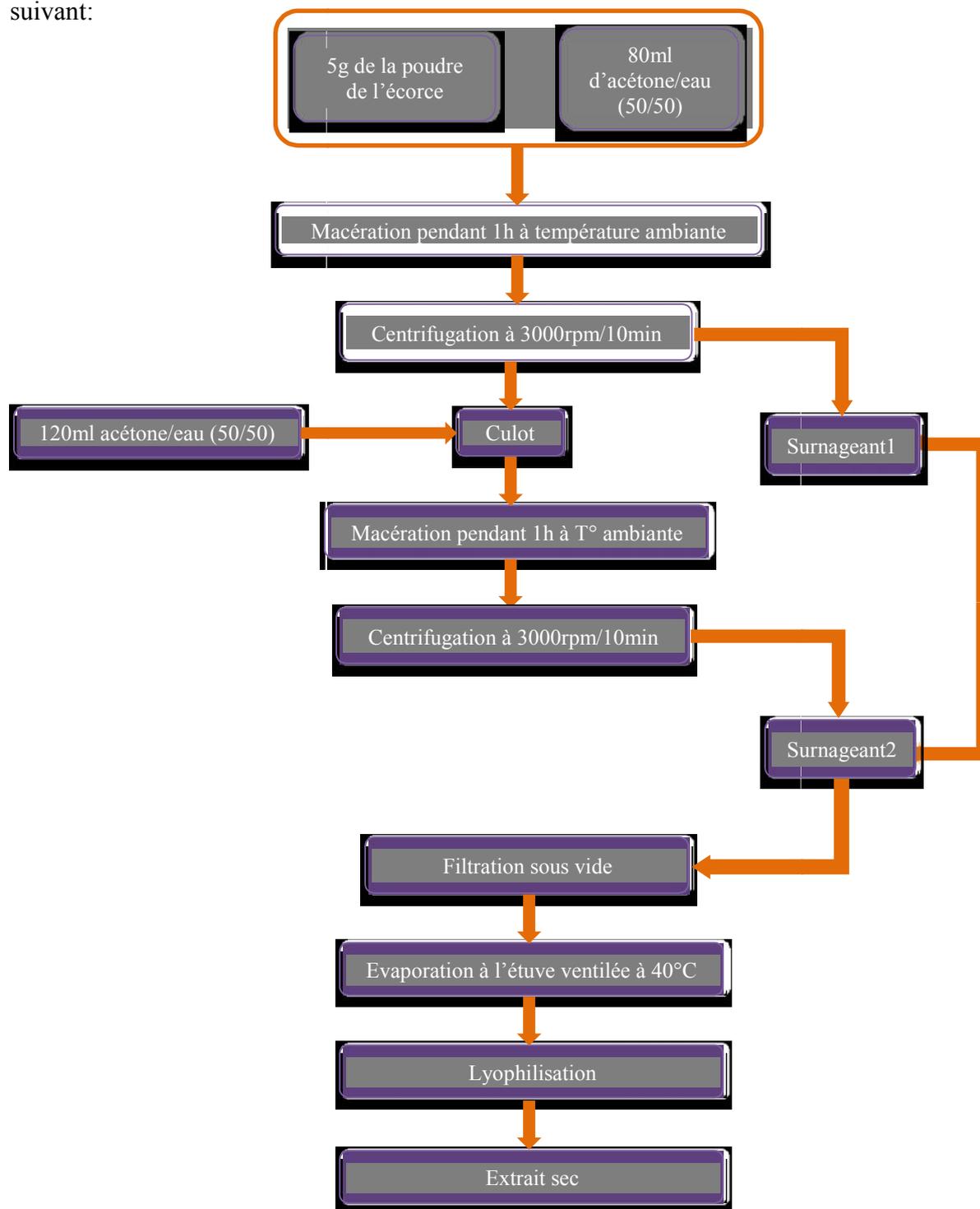


Figure N°6: protocole d'extraction des composés phénoliques (Turkmen et al., 2006).

I-3-Dosage des composés phénoliques

I-3-1-Dosages des polyphénols totaux

- **Principe**

L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$)) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de Molybdène (Mo_8O_{23}).

La coloration bleue produite possède une absorbance maximale aux environs de 765 nm, elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait (**Ribéreau-gayon et al., 1982**).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques dans les extraits est déterminée selon la méthode de **Al-Zorkey (2009)**, par spectrophotométrie comme suit:

0,2 ml d'extrait reconstitué avec de l'eau distillée sont mélangés avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10, et 0,8ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 7,5%. Le mélange est placé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 mn. L'absorbance est mesurée à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

La concentration en polyphénols totaux est exprimée en mg d'acide gallique par g d'extrait sec, en se référant à une courbe d'étalonnage (**Figure N°5, Annexe 2**).

I-3-2-Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes contenus dans les extraits acétoniques est réalisé par la méthode colorimétrique de **Bahorun et al. (1996)**.

Cette méthode est basée sur la formation du complexe flavonoïde-métaux tel que l'aluminium sous forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), qui modifie beaucoup moins le

spectre d'absorption. Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygènes présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Ribéreau –Gayon, 1968**).

- **Mode opératoire**

La concentration en flavonoïdes de l'écorce de la grenade est déterminée selon la méthode de **Bahorun et al. (1996)**.

1,5 ml de chaque extrait sont mélangés avec 1,5ml de chlorure d'aluminium (AlCl_3 à 2%), la mesure de l'absorbance est effectuée à 430nm après une incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min.

La teneur en flavonoïdes est estimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait sec, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine préparée dans l'eau (**figure N°1, Annexe2**).

I-3-3-Dosage des tanins hydrolysables

- **Principe**

La propriété principale des tanins est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA en milieu acide a pour but de séparer les tanins des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (FeCl_3) réagit avec les tanins (en milieu alcalin: SDS/TEA) pour former des chélates de couleur violette (Fe-phénolate) qui sont déterminés par spectrophotométrie (**Hagerman et Butler, 1978**).

- **Mode opératoire**

La détermination de la teneur des tanins est effectuée selon la méthode de **Hagerman et Butler, (1978)**. 1 ml d'extrait et 2 ml de la solution BSA, préparée dans le tampon acétate (pH 4,9), sont mélangés. Après 24h d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 3000rpm/20min, 4ml de la solution (SDS/TEA; 1%/5%) (v/v) sont additionnés au culot récupéré.

Une première lecture à 510 nm (A_1) est effectuée après une incubation de 15 min à l'obscurité et à température ambiante. 1 ml de la solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$) est ajouté à ce mélange, après 15 min d'incubation dans les mêmes conditions précédentes, une deuxième lecture est réalisée à 510 nm (A_2).

Les résultats sont exprimés en mg d'acide tannique par g d'extrait sec, en se référant à une courbe d'étalonnage (**figure N°2, Annexe 2**).

I-3-4-Dosage des tanins condensés

- **Principe**

Selon **Viuda-martus et al. (2011)**, le principe de dosage des tanins condensés est basé sur la dépolymérisation des proanthocyanidines en milieu chaud et acidifié par un acide fort (HCl) donnant des anthocyanines et d'autres molécules.

- **Mode opératoire**

La teneur en tanins condensés contenue dans les écorces de la grenade est déterminée selon le protocole décrit par **Maksimovic et al. (2005)**, modifié comme suit:

500µl de chaque extrait sont ajoutés à 3ml de butanol-HCl (95/5: v/v) et 100µl de réactif ferrique (2% de sulfate ferrique préparé dans HCl à 2 M). Les absorbances sont mesurées à 550 nm à spectrophotomètre UV-visible après une incubation au bain-marie à 100°C pendant 60 minutes.

- **Expression des résultats**

La quantité des tanins condensés est calculée par la formule suivante:

$$C \text{ (mg /g)} = \frac{AB \times PM \times DF \times 1000}{L \cdot \epsilon}$$

Où:

- **AB**: absorbance de l'extrait
- **PM**: le poids moléculaire du sulfate de fer d'ammonium (284.14g/mol).
- **L**: la longueur de la cuve (1cm).

- **DF**: facteur de dilution.
- ϵ : le facteur d'absorbance molaire de réactif ferrique ($35700\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

I-4-Extraction et dosage des caroténoïdes

- **Principe:**

Les caroténoïdes contiennent dans leurs structures plusieurs doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de l'absorption de la lumière par excitation des liaisons (Rodriguez-Amaya, 2001).

- **Mode opératoire**

Les caroténoïdes sont extraits par la méthode de Lee (2001). 1g de la poudre est ajouté à 10ml d'un mélange de solvants (hexane: acétone: éthanol (v/v/v; 2/1/1).

Après agitation pendant 10 min, la phase supérieure (phase hexanique) est récupérée puis utilisée pour le dosage des caroténoïdes totaux. La mesure des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 450 nm.

La teneur en caroténoïdes est estimée en mg équivalent de β - carotène par g de matière sèche, en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec le β -carotène (figure N°3, Annexe 2).

I-5-Evaluation de l'activité antioxydante

I-5-1-Pouvoir réducteur

- **Principe**

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux dans un milieu acidifié par le TCA. La forme réduite de ce complexe donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Odabasoglu et al ., 2004).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur des extraits des écorces de grenade est estimé par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. 1ml d'extrait est mélangé avec 2.5ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , 0,2M, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium (FeK 1%), après incubation à 50°C pendant 20min, 2,5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm/10 min puis 2,5ml du mélange sont transférés dans un tube à essai et additionnés de 2.5ml d'eau distillée et de 0,5ml de chlorure ferrique (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700nm.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec, dont les plus grandes teneurs en équivalent d'acide gallique correspondent à un pouvoir réducteur important (**figure N°2, Annexe 2**).

I-5-2-L'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

- **Principe**

L'effet *scavenger* de H_2O_2 par les composés phénoliques pourrait être lié à l'aptitude de ces derniers à donner des électrons au peroxyde d'hydrogène en le neutralisant en molécules d'eau (**Elmatasa et al., 2006**) selon la réaction suivante:



- **Mode opératoire**

Le pouvoir antioxydant par neutralisation du H_2O_2 des extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Atmani et al (2009)**.

1,5ml de chaque extrait dilué dix fois avec un tampon phosphate (0,1M et pH 7,4) sont additionnés d'un 1ml de H_2O_2 (40mM) préparé dans le tampon phosphate, après une incubation de 10 minutes à température ambiante; la mesure des absorbance est effectuée à 230nm.

- **Expression des résultats**

Le pouvoir antioxydant des extraits est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical H_2O_2 est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de } H_2O_2 = At \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Où:

At: Absorbance du témoin;

Ae: Absorbance de l'échantillon;

Ab: Absorbance du blanc.

I-6-Evaluation de l'activité antifongique

I-6-1-Matériel biologique

L'activité antifongique des extraits acétoniques de l'écorce des deux variétés sont évaluées en utilisant 3 souches de *Candida albicans* isolées par l'institut Pasteur, d'Alger.

- **Culture**

La culture de *Candida albicans* a été réalisée sur le milieu Sabouraud coulé dans des boîtes de Petri et incubé à 37°C pendant 24 h.

- **observation des souches**

Les caractères d'identification sont constitués de l'aspect des colonies crémeuses blanches de *candida albicans* sur Sabouraud suivi d'un examen microscopique.

- **Examen microscopique**

Les caractères microscopiques a considéré sont l'aspect des cellules. *Candida albicans* présentent un aspect de cellules levuriformes, rondes, ovalaires parfois bourgeonnantes.

- **Conservation des souches**

La conservation est effectuée sur le milieu Sabouraud coulé en boîte de Petri. Après incubation, les boîtes sont soigneusement fermées avec du parafilm et conservées à 4°C.

I-6-2-Standardisation de la suspension fongique

- **Préparation de la suspension**

Les suspensions fongiques sont préparées à partir des cultures de 24h dans du BHIB à 37°C.

La standardisation de l'inoculum est effectuée après mesure de la densité optique à 660nm; une absorbance de 0,5 correspond à 10^8 UFC/ ml.

Ce nombre est vérifié par le dénombrement sur Sabouraud et par dénombrement sur cellule de Malassez à l'objectif (x 40) (**Billerbeck et al., 2002**).

I-6-3-L'antibiogramme

- **Principe**

Le principe de l'antibiogramme repose sur la détermination de l'effet antimicrobien, en mesurant la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques imprégnés d'extrait à tester, plus que le diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible à l'extrait plus il est petit plus la souche est résistante (**Fauchère et avril, 2002**).

- **Mode opératoire**

L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée par la méthode de la diffusion sur gélose (**Celiktas, 2007**).

- La gélose de Mueller–Hinton est coulée dans des boîtes de Petri de 90mm. Après solidification de la gélose, 100µl de la suspension microbienne correspondant à 10^8 UFC/ml, sont étalées par un râtelier étaleur en verre stérile pour avoir un tapis homogène;

- Les boîtes sont ensuite séchées dans l'étuve à 37°C pendant 15 minutes;
- Des disques de 6mm de diamètre en papier wattman stérile sont déposés à l'aide d'une pince métallique;
- 20µl de l'extrait dilué dans du tampon phosphate à pH 7,4 à différentes concentrations (1, 0.5, 0.25, 0.125 g/ml) sont déposés sur les disques;
- Les boîtes de Petri sont mises à 4°C pendant 3 heures pour une pré-diffusion des extraits, puis incubées à 37°C/24h;
- Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm;
- Le tampon phosphate est utilisé comme témoin négatif et l'amphotéricine B est utilisé comme témoin positif.

I-6-4-Détermination des concentrations minimales inhibitrices

- **Principe**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme une concentration minimale qui inhibe toute croissance microbienne visible à l'œil nu à partir d'une gamme de concentrations de l'extrait dans le milieu de culture (**Billerbeck et al., 2002**).

- **Mode opératoire**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la méthode des spots sur gélose (**Suay et al., 2000**);

- Les boîtes de Petri sont d'abord coulées de gélose de Muller-Hinton, puis 100µl de la suspension de 10^8 UFC/ml sont étalés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile;
- Les boîtes de Petri sont séchées à l'étuve à 30°C/15mn, puis 10µl de l'extrait de chaque variété à différentes concentrations allant de 0,24-62,5mg/ml.
- Les boîtes de Petri sont introduites dans un réfrigérateur pour une pré-diffusion à 4°C/3h puis incubées à 37°C pendant 24h.
- Un témoin est réalisé avec la gélose Muller Hinton et les 3 souches.

I-6-5-Détermination des concentrations minimales fongicides

La CMF est définie comme la plus petite concentration qui permet une destruction notable des levures (0,01% de survivant) après 24 heures d'incubation (Meyer et al., 1994).

- **Mode opératoire**

- La détermination de CMF est obtenue à partir des essais réalisés pour la détermination de la CMI. Un cylindre d'agar est découpé dans chaque zone d'inhibition obtenue puis introduit dans un tube de BHIB.
- Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. La plus faible concentration pour laquelle aucun trouble n'est visible est considérée comme la concentration minimale fongicide.

I-6-6-Test d'inhibition de l'attachement de *Candida albicans*

Ce test est réalisé afin de vérifier la capacité des extraits acétoniques du péricarpe de grenade des deux variétés à inhiber l'attachement du biofilm formé par *Candida albicans* au fond des puits d'une plaque (1^{er} modèle) et sur des disques d'hydroxyapatite (2^{ème} modèle)

- ✓ **Le premier modèle (Hamada et al., 1978)**

Dans une plaque stérile de 24 puits, on introduit 750µl de BHIB, 500µl de la suspension de 10⁸ UFC/ml et 250µl des différentes concentrations de l'extrait 0,2, 0,4 et 0,9mg/ml.

Après incubation à 37°C avec un angle de 30° pendant 24h la lecture de la plaque est visuelle et elle est notée comme suit:

- 0 —————> absence de l'adhérence du biofilm;
- 1 —————> très légère apparence du biofilm;
- 2 —————> apparence modérée du biofilm;
- 3 —————> apparence importante du biofilm;
- 4 —————> apparence très importante de l'adhérence de biofilm.

✓ **Deuxième modèle sur les disques hydroxyapatite (Guggenheim, 2001).**

Ce test a été réalisé afin de confirmer la capacité des extraits acétoniques du péricarpe de grenade des deux variétés à inhiber l'attachement de *Candida albicans* et la formation de biofilm par ce dernier.

Des disques stériles d'hydroxyapatite de 11mm de diamètre sont introduits dans une plaque à 24 puits chaque disque a été placé dans le fond d'un puits et imprégnés de 0,2ml de l'extrait et 0,2ml de la suspension de *C. albicans* (10^8 UFC/ml) dans 0,8ml du BHIB et 0,8ml de la salive stérile. L'incubation à 37°C pendant 48h, les disques sont ensuite lavés trois fois avec du tampon phosphate stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les échantillons ont ensuite été visualisés sous microscopie électronique à balayage.

I-7-Analyse statistique

Une étude statistique est réalisée pour la comparaison des résultats et la mise en évidence des différences significatives entre les échantillons, et pour chaque paramètre en appliquant une analyse de la variance (ANOVA) suivie du test LSD (la plus petite différence significative) à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5. Le degré de signification des résultats est pris à la probabilité $p \leq 0,05$.

Chapitre II :

Résultats et discussion

II-1-Les polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des écorces des deux variétés de grenade (Figure N°7) sont estimés à l'aide de la méthode du Folin-Ciocalteu en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (Annexe1).

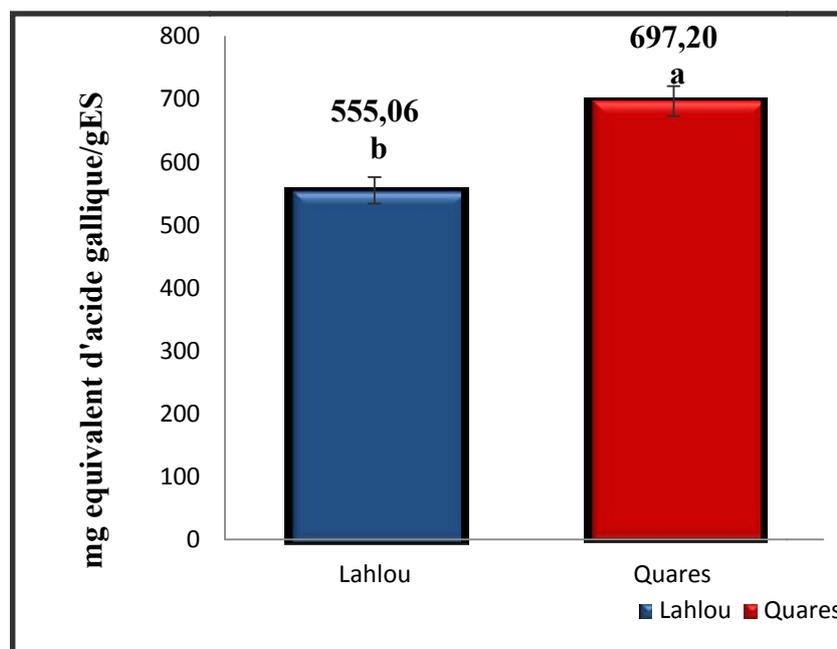


Figure N°7: teneur en polyphénols totaux des extraits des deux variétés de grenade.

Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),

Les barres verticales représentent les écarts types.

Dans cette présente étude, les teneurs en polyphénols totaux indiquent que la variété *Quares* est plus riche que la variété *Lahlou*, avec des teneurs de l'ordre $697,20 \pm 24,09$ mg EAG/g d'extrait sec et $555,06 \pm 20,76$ mg EAG/ g d'extrait sec respectivement. L'analyse statistique révèle une différence significative entre les deux variétés ($p < 0,05$).

Ces résultats concordent avec les travaux réalisés ultérieurement; ceux obtenus par **Boussalah (2010)** montrent des teneurs de $509,44$ mg EAG /MS pour la variété *Quares* et $400,07$ mg EAG /g MS pour la variété *Lahlou*. **Djafri et Faid (2011)** ont également obtenu des teneurs semblables de l'ordre de $686,53 \pm 3,42$ mg EAG/ MS pour la variété *Quares* et $598,48 \pm 13,62$ mg EAG/ g MS pour *Lahlou* en utilisant le même solvant d'extraction: eau/acétone (50/50).

Il ressort que les variétés acides sont les plus riches en composés phénoliques et l'activité antioxydante la plus importante. En effet, l'étude réalisée par **Ahmet et al. (2009)** sur 6 variétés de grenades turques le confirme.

Les teneurs en polyphénols totaux obtenues dans cette présente étude sont plus élevées que celles citées par **Ben Nasr et al. (1996)** avec de $216,9 \pm 7,3$ mg EAG / g ES, **Negi et al. (2003)** avec 400 mg EAG /g ES, **Li et al. (2006)** mentionnent une teneur de $249 \pm 17,2$ mg EAG/g ES) et **Lee et al. (2010)** avec 471.0 ± 32.0 mg EAG/g ES.

D'après la bibliographie, la teneur en composés phénoliques dépend de plusieurs paramètres, tels que: les conditions édaphoclimatiques; la variété considérée; les procédés d'extraction; les techniques culturales; les facteurs génétiques et les conditions de stockage (**Cemeroglu et al., 1988**).

II-2-Les flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est estimée à partir d'une courbe d'étalonnage à la quercétine (Annexe1). Les résultats obtenus relatifs aux teneurs des flavonoïdes sont résumés dans la figure N°08:

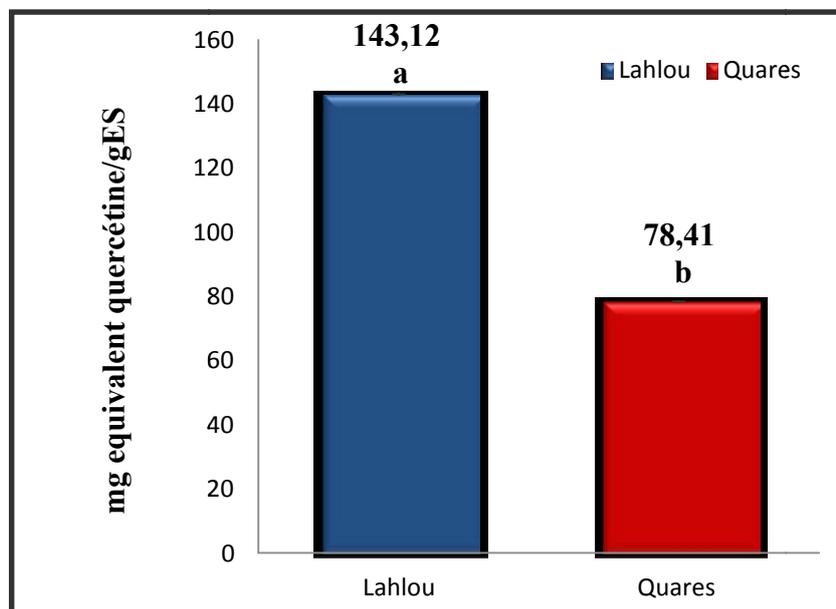


Figure N°8: teneur en flavonoïdes des extraits des deux variétés de grenade

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

Selon les résultats obtenus, il en ressort que c'est la variété *Lahlou* qui présente une teneur plus élevée en flavonoïdes ($143,12 \pm 0,273$ mg EQ/g d'ES) comparée à la variété *Quares* ($78,41 \pm 0,150$ mg EQ/g d'ES) avec une différence significative ($p < 0,05$).

Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Li et al. (2006)** avec une teneur de $59,1 \pm 4,8$ mg rutine/g ES. Ces différences peuvent s'expliquer par le facteur variétal ou par la méthode de dosage ou bien par la nature du solvant d'extraction utilisé.

Selon **Martin et al. (2002)**, l'écorce de la grenade est très riche en flavonoïdes glycosylés, la présence de cette fraction osidique rend les flavonoïdes très solubles dans l'eau, il est donc recommandé d'utiliser pour leur extraction un mélange de « solvants organiques/eau ».

II-3-Les tanins hydrolysables

La figure N°9 illustre les teneurs en tanins hydrolysables déterminées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (Annexe 1).

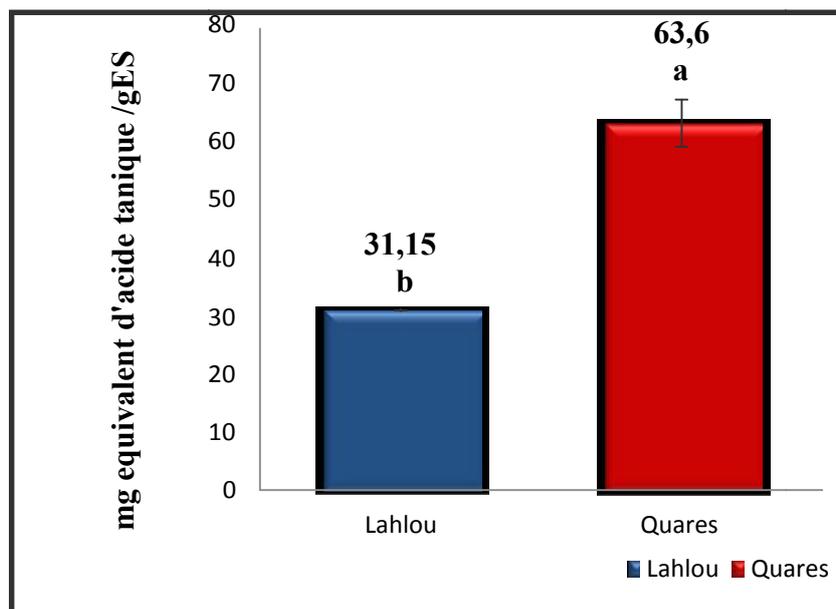


Figure N°9: teneur en tanins hydrolysables des extraits des deux variétés de grenade

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

Dans cette présente étude, les teneurs en tanins hydrolysables révèlent une quantité plus élevée dans la variété *Quares* que dans la variété *Lahlou*. Les teneurs sont de l'ordre de

63,6±4,10 mg EAT/g ES, 31,15±0,12 mg EAT/g ES respectivement. Cette différence entre les deux variétés de grenade est significative.

Selon **Fabre et Ermosilla (2008)**, les tanins hydrolysables constituent 25% des constituants de l'écorce de la grenade, dont les punicalins et les punicalagins sont les constituants majoritaires de l'écorce de la grenade (**Wang et al., 2006**).

Les résultats obtenus sont inférieurs à ceux cités par **Seeram et al. (2005)** avec une teneur de 58 à 60 mg/g MS, en utilisant la chromatographie haute performance.

Cam et Hisil (2010), dans leur étude sur l'extraction des tanins hydrolysables par l'eau, ont rapporté des teneurs assez importantes de l'ordre de 116,6 mg EAT/g d'extrait sec. Cela est dû au fait que les tanins soient hydrophiles.

II-4-Les tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés de l'écorce de la grenade des deux variétés sont estimées en mg/g ES, les résultats sont illustrés dans la figure N°10:

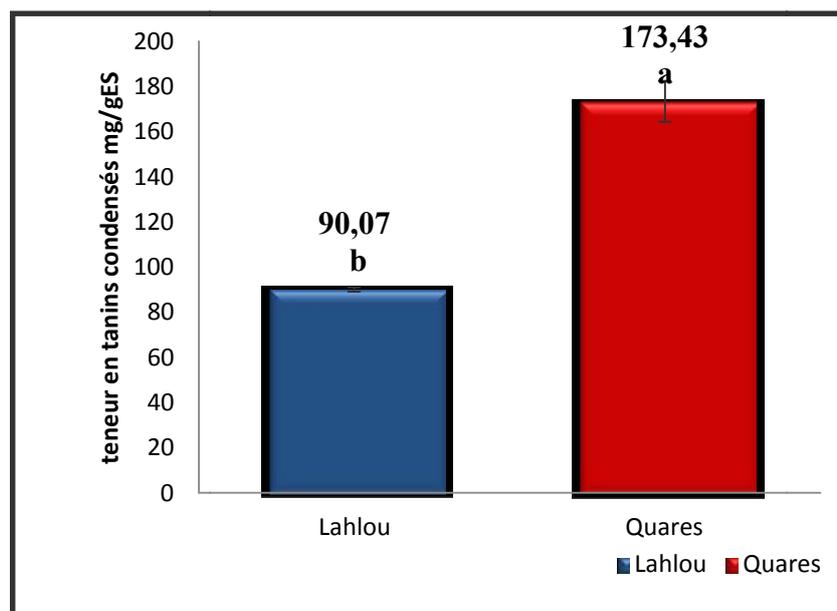


Figure N°10: teneur en tanins condensés de l'écorce des deux variétés de grenade

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

Les résultats obtenus du dosage des tanins condensés montrent une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux variétés, puisque la variété *Quares* contient 173,43±9,029 mg/g ES, et *Lahlou* seulement 90,07±0,919 mg/g ES.

La quantité des tanins condensés dans l'écorce de la grenade étudiée est inférieure à celle de **Lee et al (2010)** qui ont trouvé par la méthode de dosage à la vanilline, 257.0 ± 19.6 mg équivalent de catéchine/g ES en utilisant l'acétone 70% pour l'extraction. Par contre, elle est plus élevée par rapport aux quantités obtenues par **Li et al (2006)** qui citent $10,9 \pm 0,5$ mgEC/g ES avec l'éthanol comme solvant d'extraction.

II-5-Les caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes des écorces des deux variétés de grenade (*Lahlou* et *Quares*) est estimée en mg équivalent de β -carotène par g d'extrait sec, en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec du β -carotène (Annexe 1).

Les résultats sont présentés dans la figure N°11:

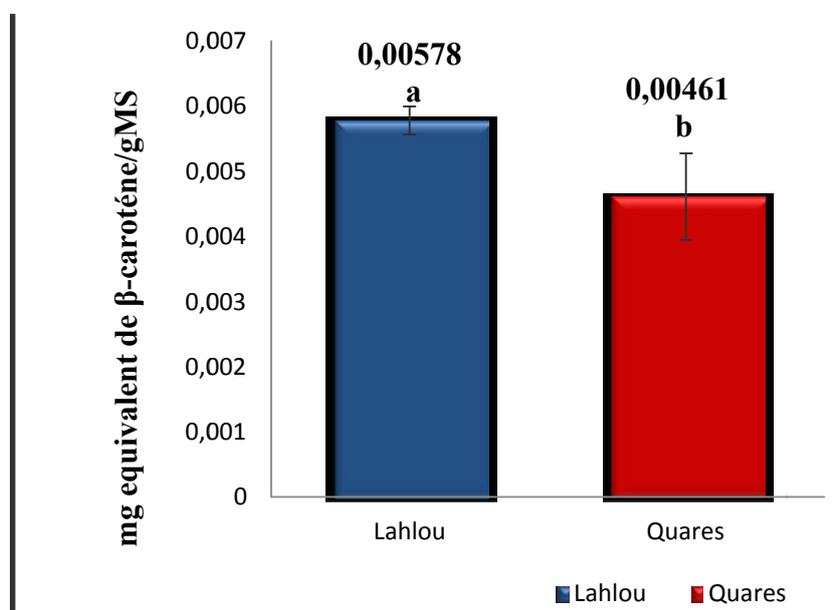


Figure N°11: teneur en caroténoïdes de l'écorce des deux variétés de grenade.

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

L'analyse statistique révèle une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux variétés, les résultats obtenus montrent une teneur de $0,0057 \pm 0,0002$ mg E β -carotène/g ES et une teneur de $0,0046 \pm 0,0006$ mgE β -carotène/g ES pour *Lahlou* et *Quares* respectivement.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Morton (1987)** qui a apprécié la teneur en caroténoïdes dans l'écorce de la grenade sous forme de traces.

Prommuak et al. (2008) rapportent que la teneur en caroténoïdes peut être influencée par plusieurs facteurs: le climat, le sol, la lumière, la variété, la maturité et le temps d'extraction.

II-6-Evaluation de l'activité antioxydante

II-6-1-Le pouvoir réducteur

La figure N°12 illustre le pouvoir réducteur de l'écorce de la grenade:

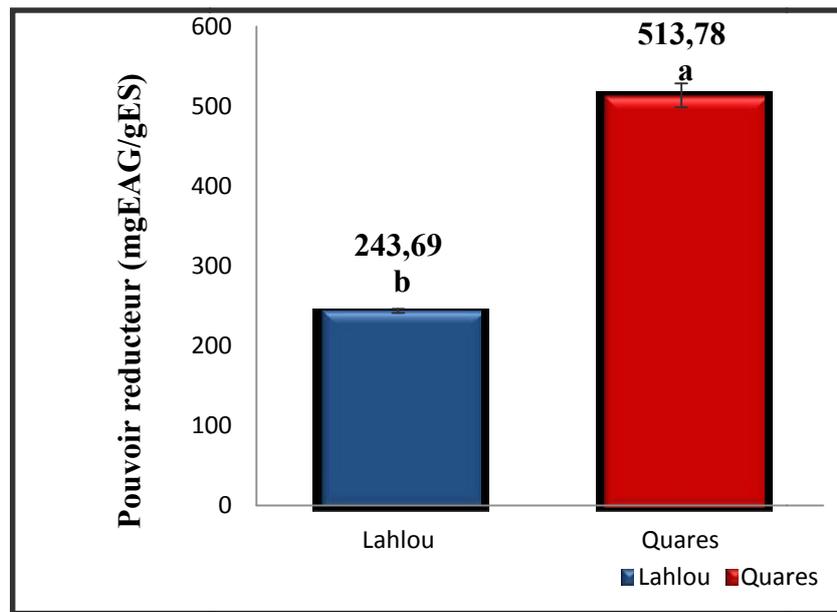


Figure N°12: pouvoir réducteur des extraits des deux variétés de grenade.

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

D'après la figure ci dessus, le pouvoir réducteur de la variété *Quares* est deux fois plus élevé que celui de la variété *Lahlou* avec $513,78 \pm 4,93$ mg EAG/g ES contre $243,69 \pm 2,48$ mg EAG/ g ES respectivement. Cette différence est significative ($p \leq 0,05$).

Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par **Boussalah (2010)** qui a trouvé que l'extrait de l'écorce de la variété *Quares* a un pouvoir réducteur 1,5 fois supérieur que celui de l'écorce de la variété *Lahlou*.

La différence entre les deux variétés est due à la richesse de l'extrait de la variété *Quares* en composés phénoliques. Selon **Bahorun et al. (2004)** les fruits les plus riches en composés phénoliques sont les plus antioxydants.

Huang et Prior et al. (2005) ont établi une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante de certains extraits. Cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydante qui s'explique par un transfert d'électrons.

Le pouvoir réducteur des écorces de la grenade est plus élevé par rapport à celui de la pulpe et les graines, qui est dû à la richesse de celle-ci en flavonoïdes, en protocyanidines et en polyphénols totaux (**Singh et al., 2002**).

II-6-2-L'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène(H_2O_2)

Les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont illustrés dans la figure N°13:

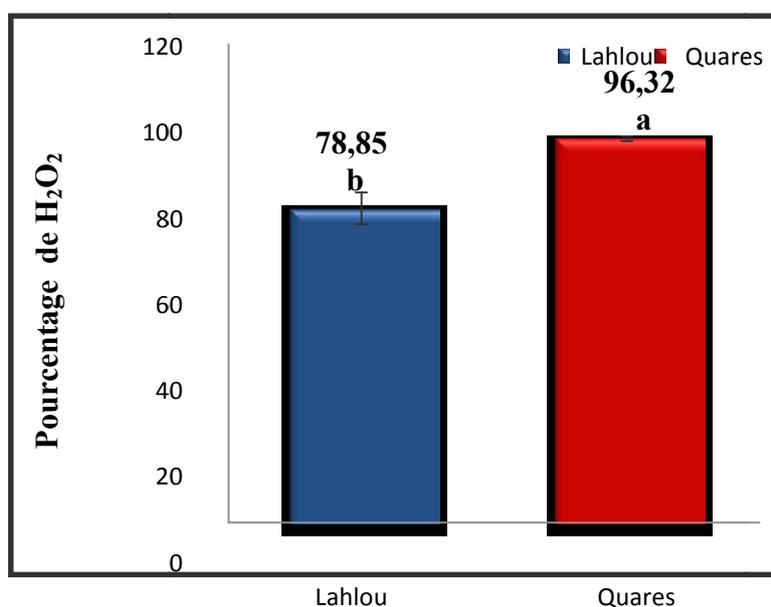


Figure N°13: activité antioxydante par la méthode de H_2O_2 .

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$),
- Les barres verticales représentent les écarts types.

L'activité scavenger de l'extrait phénolique de la variété *Quares* sur le peroxyde d'hydrogène est de $96,32 \pm 0,56$ % et elle est de $78,85 \pm 3,95$ % pour *Lahlou*. Ces résultats sont significativement différents ($p \leq 0,05$).

Des études réalisées sur l'extrait du péricarpe de grenade montrent une activité antiradicalaire contre l'anion superoxyde, radical hydroxyle...cette activité est due à la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tannins (**Singh et al., 2002**).

L'effet pharmacologique attribué aux composés phénoliques s'expliquent en partie par la capacité de capturer des radicaux libres (**Bahorun et al., 2004**). En effet, parmi les composés les plus importants responsables de l'activité biologique de la grenade, le punicalagin, par la présence dans sa structure de 16 groupes OH dissociables (**Reddy et al., 2007**).

II-7-L'activité antifongique

II-7-1- l'antibiogramme

Parmi les méthodes les plus couramment employées pour mesurer l'efficacité antimicrobienne des plantes médicinales, des épices, de leurs huiles essentielles et de leurs autres constituants est la méthode de diffusion des disques sur gélose, qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que; volume d'extrait placé sur le disque, l'épaisseur de la couche d'agar et le type du solvant utilisé...L'activité antifongique est également dépendante de la concentration des éléments fongiques, du temps de contact avec l'antifongique, du pH du milieu et de la température ambiante.

Une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne(des antibiotiques) a été mise par **Meena et Sethi (1994)**, répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 04 classes:

- Fortement inhibitrice: lorsque le diamètre de zone d'inhibition ≥ 28 mm;
- Modérément inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm;
- Légèrement inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm;
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est < 10 mm.

D'après les résultats illustrés dans le tableau I (Annexe 3) et les figures N°14 à 17, il en ressort:

- une sensibilité des trois souches de *Candida albicans* vis-à-vis des deux extraits hydroacétoniques. La souche CAM1 semble la plus sensible;
- une activité antifongique plus prononcée de l'extrait de la variété *Quares* vis-à-vis des trois isolats par rapport à l'extrait de *Lahlou*;

- Une diminution progressive des diamètres des zones d'inhibition est observée avec la diminution de la concentration des extraits phénoliques des deux variétés.

L'analyse statistique révèle également une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux variétés *Quares* et *Lahlou*, ainsi que leur effet sur les trois souches.



***Quares*(CAM1)**

***Lahlou*(CAM1)**

Témoin(CAM1)



***Quares*(CAM2)**

***Lahlou*(CAM2)**

Témoin(CAM2)



***Quares* (CAM3)**

***Lahlou* (CAM3)**

Témoin (CAM3)

Figure N°14: antibiogramme des deux extraits phénoliques vis-à-vis des 3 souches.

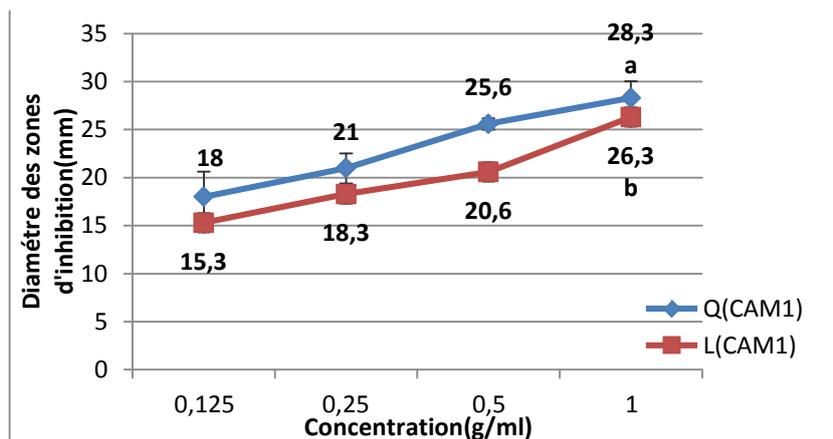


Figure N°15: effet des deux extraits sur CAM1.

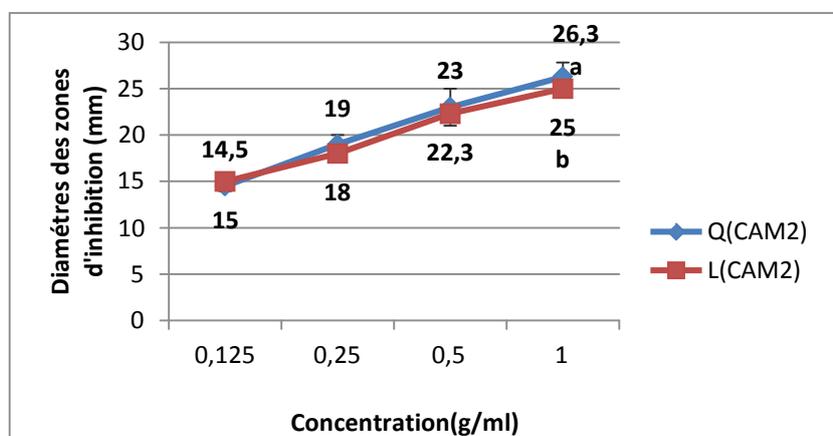


Figure N°16: effet des deux extraits sur CAM2.

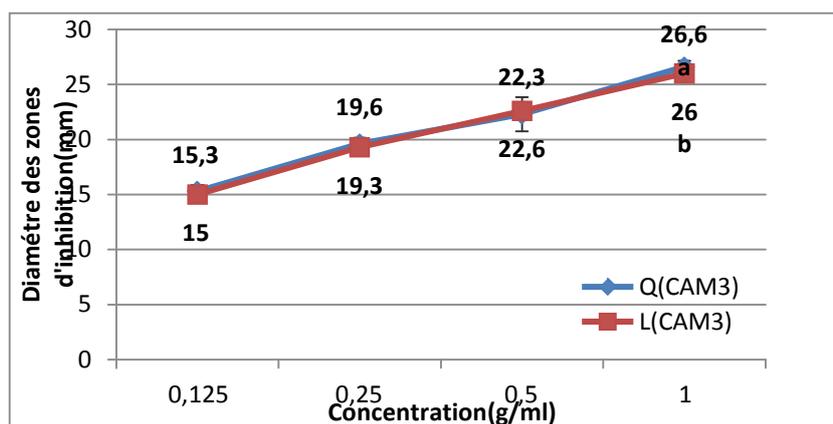


Figure N°17: effet des deux extraits sur CAM3.

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$);
- Les barres verticales représentent les écarts types;
- Q: Quares, L: Lahlou.

Les extraits des deux variétés ont un effet fortement inhibiteur. L'extrait de la variété *Quares* s'est révélé le plus actif vis-à-vis des trois souches en induisant des zones d'inhibition de $18 \pm 2,64$ - $28,3 \pm 1,52$ sur CAM1; $14,5 \pm 0,57$ - $26,3 \pm 1,52$ sur CAM2 et $15,3 \pm 0,57$ - $26,6 \pm 0,57$ sur CAM3, aux concentrations allant de 0,125 à 1g/ml.

Quant à l'extrait de la variété *Lahlou*, il inhibe la croissance de CAM1 avec des diamètres des zones d'inhibition de $15,3 \pm 0,57$ à $26,3 \pm 0,57$ mm, de $15 \pm 0,00$ - $25 \pm 0,00$ avec CAM2 et de $15 \pm 0,10$ - $26 \pm 0,10$ mm avec CAM3 à différentes concentrations (0,125 à 1 g/ml).

L'effet inhibiteur des deux extraits hydroacétoniques à 125 mg/ml été inférieur à celui obtenu avec l'amphotéricine B (témoin positif) à la concentration de 10 mg/ml ($24 \pm 0,00$, $20 \pm 0,00$, $22 \pm 0,00$ mm pour CAM1, CAM2 et CAM3 respectivement). On peut donc considérer que l'activité de ces extraits est 1/18 fois celle de l'amphotéricine B.

Par contre, le témoin négatif (tampon phosphate) ne présente aucune zone d'inhibition donc l'effet inhibiteur observé est due seulement à l'extrait phénolique.

Ainsi, on note un effet inhibiteur décroissant des deux extraits vis-à-vis des trois souches dans l'ordre suivant: CAM1>CAM3>CAM2.

L'activité antimicrobienne de *Punica granatum* L. est largement étudiée. Cette importante activité de l'écorce de la grenade est due à la richesse de son péricarpe en composés phénoliques; flavonoïdes; tannins.... (Haslam et al., 1996). La présence des éllagitannins, des gallotannins et des alcaloïdes dans la grenade pourrait être responsables de l'activité antimicrobienne (Seeram et al., 2005).

Les résultats de cette étude concordent avec ceux de Ahmet et al. (2009) qui ont rapporté des zones d'inhibition de 26 mm à une concentration 0,5g/ml de l'extrait acétonique vis-à-vis de *Candida albicans* (ATCC 1023), qui rapportent que la variété acide (*Eksi*) a une activité plus élevée que la variété sucrée (*Kan*) contre *Candida albicans* (ATCC1023). Cette différence dépend de la quantité en composés phénoliques,... (De el al., 1999). Ainsi

l'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, du matériel végétal duquel il a été extrait et de la souche testée...

II-7-2-Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides

Les résultats des CMI et des CMF obtenus dans cette présente étude sont illustrés dans le tableau IV:

Tableau IV: concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits vis-à-vis des 3 souches de *C.albicans*.

Souches	Valeur CMI mg/ml		Valeur CMF mg/ml	
	<i>Quares</i>	<i>Lahlou</i>	<i>Quares</i>	<i>Lahlou</i>
CAM1	≥0,97	≥1,95	≥15,62	≥15,62
CAM2	≥1,95	≥1,95	≥15,62	≥15,62
CAM3	≥1,95	≥1,95	≥15,62	≥15,62

Les mêmes CMI ont été obtenues pour les 3 isolats, sauf pour CAM1 pour laquelle on note une CMI de 0.97mg/ml avec l'extrait *Quares*. L'intervalle des CMI devrait être recherché plus étroitement c'est-à-dire tester les souches à des concentrations dans l'intervalle 0,97-1,95 mg/ml.

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMF) nous a permis non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par les extraits sur *Candida albicans*.

Ces tests préliminaires sont un criblage des activités antimycosiques des extraits du péricarpe de grenade qui permettra la sélection du plus active pour les inhibitions de la formation de biofilm.

II-7-3-Test d'inhibition de l'attachement du biofilm

L'objectif principal de cette étape consistait à évaluer *in vitro* l'effet de ces extraits sur un modèle de biofilm des trois souches de *Candida albicans*.

- Le premier modèle testé est proposé par **Hamada et al. (1978)** et adapté par **Badet et**

al. (2011), consiste à visualiser la formation de biofilm ainsi que son adhérence ou son absence en présence de l'extrait après incubation.

Après rinçage et séchage des plaques, les résultats observés sont présentés dans le tableau II (Annexe 3) et le tableau V:

Tableau V: pourcentage d'inhibition de l'attachement du biofilm des 3 souches de *Candida albicans* par les deux extraits.

	<i>Quares</i>			<i>Lahlou</i>		
	0,97mg/ml	0,48mg/ml	0,24mg/ml	0,97mg/ml	0,48mg/ml	0,24mg/ml
CAM1	96,5%	64,16%	41,66%	82,5%	57,5%	32,5%
CAM2	80,5%	56,46%	31%	77,5%	52,5%	27,5%
CAM3	83,33%	61%	34,66%	80%	55%	30%

100% : détachement fort, 0% : pas de détachement.

L'analyse statistique montre une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux variétés *Quares* et *Lahlou* pour l'inhibition de l'attachement de *C. albicans* vis-à-vis des trois souches à différentes concentrations. L'effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm des 3 souches est illustré dans les figures 18, 19 et 20:

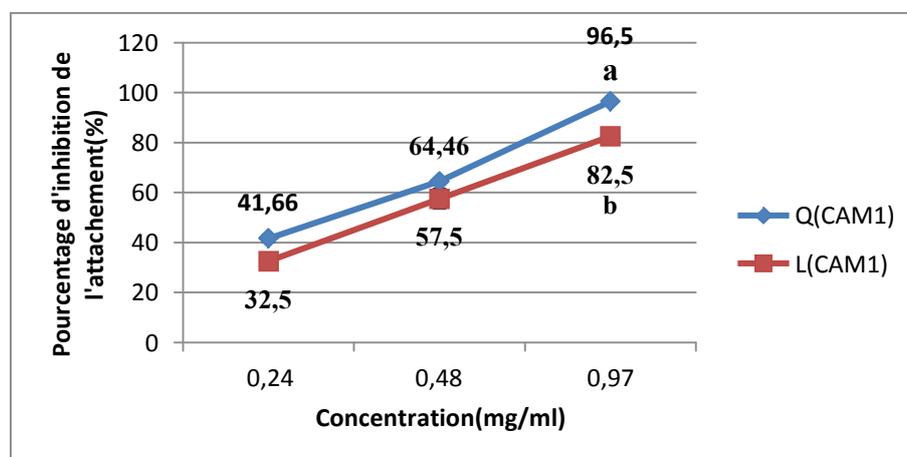


Figure N°18: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM1.

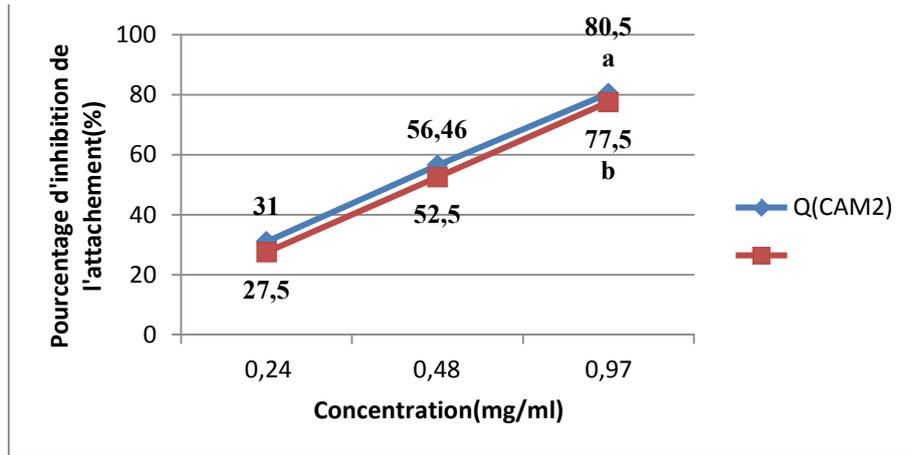


Figure N°19: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM2.

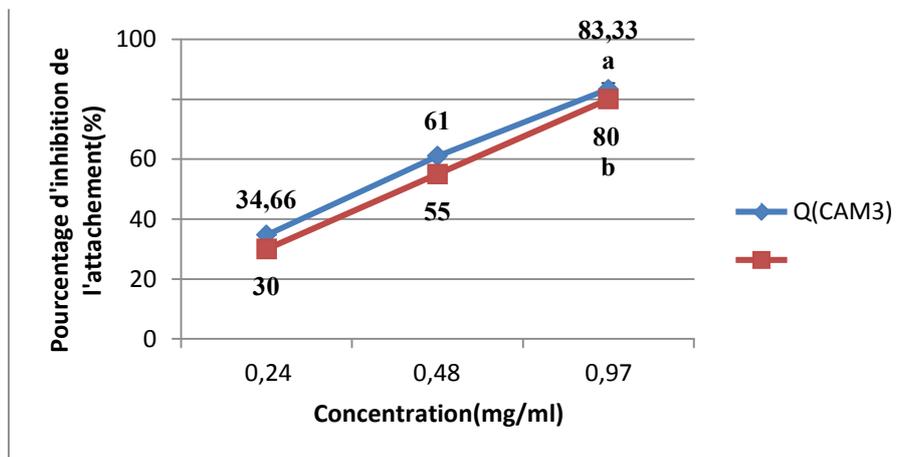


Figure N°20: effet des deux extraits sur l'inhibition de l'attachement du biofilm de CAM3.

- Les valeurs portant différentes lettres présentent une différence significative ($p \leq 0,05$);
- Les barres verticales représentent les écarts type;
- Q: Quares, L: Lahlou.

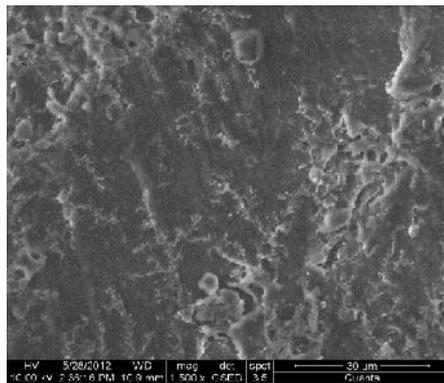
Les figures N°18, 19 et 20 révèlent que la variété *Quares* inhibe beaucoup plus l'attachement des biofilms formés par les trois souches que l'extrait de *Lahlou*.

Le pourcentage d'inhibition de l'attachement est de l'ordre suivant: CAM1 > CAM3 > CAM2 à différentes concentrations.

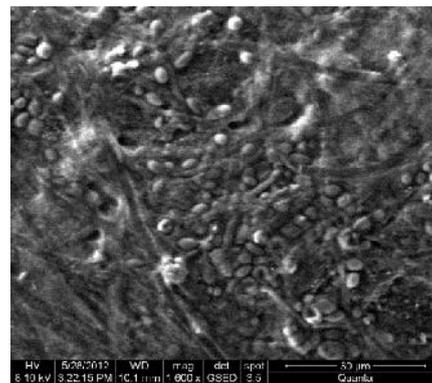
- Dans le deuxième modèle testé sur les disques d'hydroxyapatite (HA), le choix de la souche CAM1 et CAM2 est lié au test précédent, qui a révélé que CAM1 est la souche

la plus sensible et que CAM2 est la plus résistante. En ce qui concerne les extraits, celui de la variété *Quares* est le plus actif vis-à-vis des 3 souches contrairement à celui de *Lahlou*.

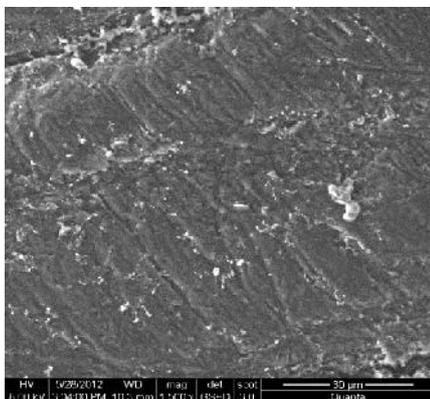
Après incubation des disques d'HA en présence des 2 isolats CAM1 et CAM2 et l'extrait de la variété *Quares* sous le microscope électronique, des photos des biofilms ont été obtenues (figure N°21).



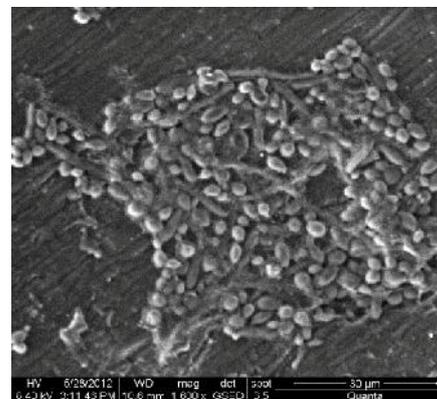
a-CAM1(Témoin)



b-CAM2(Témoin)



c-CAM1 (Essai)



d-CAM2(Essai)

Figure N°21: photos des biofilms des deux souches sur les disques hydroxyapatite sous le microscope électronique à balayage à 30µm.

En visualisant les disques sous microscope électronique à balayage, il apparaît une différence entre les quatre photos. Les biofilms témoins formés par les deux souches CAM1 et CAM2 sont très importants mais différents du point de vue architecture tridimensionnelle.

En présence de l'extrait, on observe une diminution de la charge microbienne sur les disques en plus de la réduction des zones d'attachement du biofilm de *C. albicans*.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment que l'extrait hydroacétonique de la variété *Quares* possède un effet inhibiteur sur l'attachement du biofilm formé par les souches de *Candida albicans*. Cet effet est plus important sur CAM1 que CAM2.

Les chercheurs suggèrent que l'activité des extraits de la grenade est due à la richesse du péricarpe en composés phénoliques; acide gallique et catéchine; quercétine, rutine et d'autres flavonols; flavones, flavonones, qui sont des agents antimicrobiens contre les micro-organismes oraux, particulièrement ceux qui contribuent à la formation de biofilm. Ces composés jouent un rôle important dans la prévention des caries dentaires et des maladies parodontales (**Zahin, 2010**).

Un grand nombre d'agents antimicrobiens et d'extraits de plantes médicinales sont additionnés au dentifrice et les solutions de rinçage de la bouche, dans le but de prévenir les caries dentaires et la formation de biofilm (**Pannuti et al., 2003**).

Plusieurs chercheurs ont démontré l'action antimicrobienne de *Punica granatum L.*, qui est un fruit riche en tannins et en autres polyphénols, sur les bactéries du biofilm dentaire. Les résultats d'une étude réalisée par **Vasconcelos et al. (2006)**, confirment la possibilité des extraits de la grenade à inhiber les bactéries et les champignons (*Candida albicans*) responsables d'infections orales telles que les caries dentaires, et les maladies parodontales par le gel de *Punica granatum L.*

D'autres études confirment l'effet inhibiteur de l'adhérence des microorganismes par *Punica granatum*, qui est due à la présence des polyphénols et des tannins (**Haslam, 1996**).

Les tannins sont largement utilisés comme étant des agents antimicrobiens, leur action contre les bactéries et les levures peuvent être établies par la relation entre leur structure

moléculaire et leur toxicité, propriétés astringentes ou d'autres mécanismes. Cette action est observée sur les membranes, du fait que les tanins précipitent avec les protéines et les polysaccharides de la membrane qui perturbent son fonctionnement. Un autre mécanisme de toxicité des composés phénoliques serait soit par la privation des ions métalliques (le fer) ou bien par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines) ou les enzymes (**Scalbert, 1991; Cowan, 1999**).

Kakiuchi et al. (1986) et **Pereira et al. (2006)** ont démontré l'action antimicrobienne de *Punica granatum* sur le biofilm des bactéries dentaires dont la perturbation de la synthèse des peptidoglycanes, ces perturbations agissent sur les mécanismes de l'adhérence des microorganismes sur la surface dentaire.

Sampaio et al. (2009) rapportent que les polyphénols du thé peuvent être adsorbés et affecter la pellicule salivaire acquise, cela conduit à dire que les polyphénols agissent sur le biofilm dentaire en perturbant sa formation.

Conclusion

Le principal objectif de cette étude visait à valoriser l'écorce de la grenade de deux variétés locales *Quares* et *Lahlou* par l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ses extraits phénoliques.

Le dosage des composés phénoliques de l'extrait acétonique des deux variétés a révélé des teneurs considérables en polyphénols totaux chez la variété *Quares* ($697,20 \pm 24,09$ mg EAG/g ES), des quantités importantes en tanins hydrolysables ($63,6 \pm 4,10$ mg EAT/g ES) et des quantités élevées en tanins condensés ($173,43 \pm 9,029$ mg/g ES). Par contre, les flavonoïdes sont plus importants dans la variété *Lahlou* ($143,12 \pm 0,27$ mg EQ/g ES).

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits par le pouvoir réducteur et l'inhibition du H_2O_2 a révélé que l'extrait acétonique de la variété *Quares* présente une meilleure activité antioxydante avec $513,78 \pm 14,93$ mg EAG/g ES et un pourcentage d'inhibition de H_2O_2 de $96,32 \pm 0,56$ %.

En ce qui concerne l'effet antifongique des deux extraits sur les trois isolats de *Candida albicans* (CAM1, CAM2, CAM3), c'est l'extrait de la variété *Quares* qui s'est avéré plus actif à l'égard des trois souches dans l'ordre suivant CAM1>CAM3>CAM2.

La détermination des CMI et des CMF pour les deux extraits a révélé une CMI de 0,97-1,95 mg/ml et une CMF de 15,62 mg/ml.

Le test d'inhibition de l'attachement du biofilm de *Candida albicans* sur microplaque a montré que l'extrait de la variété *Quares* a un effet inhibiteur plus important que la variété *Lahlou* à l'égard des trois souches de l'ordre suivant CAM1>CAM3>CAM2.

Le test d'inhibition de l'attachement de *C. albicans* sur les disques hydroxyapatite confirme que l'extrait acétonique de grenade inhibe l'adhérence de ce dernier et réduit la formation de son biofilm.

Il ressort de la présente étude que les deux variétés de l'écorce de la grenade étudiée peuvent être utilisées comme une bonne source naturelle d'agents antioxydants et antifongiques.

Dans cette étude nous avons utilisés deux extraits non purifiés, ce qui ne nous renseigne pas sur les composés actifs responsables des activités antioxydantes et antifongiques. Il serait donc nécessaire de:

- Purifier et procéder à la séparation de ces composés phénoliques afin de les tester séparément ceux, parmi eux actifs;
- Etudier d'autres activités biologiques des extraits de la grenade;
- Rechercher d'autres activités et leur toxicité in vitro et in vivo.

*Références
bibliographiques*

-A-

- **Adjadj M. (2009).** *Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale Ajuga iva L. Schreber.* Thèse de Magistère en biologie cellulaire et moléculaire de l'université Mentouri Constantine, 96P.

- **Agbo-Godeau S. et Guedj A. (2005).** Mycoses buccales. EMC, *J. Stomatologie*, 22-45.
- **Ahmed S., Wang N., Hafeez B. B., Cheruvu V. K. et Haqqi T. M. (2005).** *Punica granatum* L. extract inhib-its IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J of Nutrition*, 135: 2096–2102.
- **Ahmet D., Mustafa Ozgen., Kenan S., Dayisoylu N E., et Coskun D. (2009).** Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *journal/molecules*, 1809-1816.
- **Ajaikumar K. B., Asheef M., Babu B. H., Padikkala J. (2005).** The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J of Ethnopharmacology*, 96: 171–176.
- **Al-Said A. F., Opara L. U. et Al-Yahyai R. A. (2009).** Physicochemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *J of food Engineering*, 90:129-134.
- **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112: 303–309.
- **Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., Hayek T., Presser D., Fuhrman B. (2000).** Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modification to LDL and platelet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein deficient mice. *Am J Clin Nutr*, 71: 1062–76.
- **Aviram M., Rosenblat M., Gaitini D., Nitecki S., Hoffman A., Dornfeld., Volkova N., Presser D., Attias J., Liker H. et Hayek T. (2004).** Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intimamedia thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical nutrition*, 23: 423-433.
- **Azzouz M A. et Bullerman L B. (1982).** Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J of food protection*, 45: 1248-130.

-B -

- **Badet C. et Quero F. (2011).** The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe*, 17: 19-22.
- **Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., et Aruoma O. I. (2004).** Total phenol, flavonoid, proanthocyanidins and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric*, 84: 1553-1561.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Research*, 46: 1086 -1108.
- **Baraud Jean. (2011).** Implication de NRF2 dans le métabolisme oxydatif des cellules leucémiques. *Thèse de doctorat en médecine* de l'université François Rabelais. P12-17.
- **Bele A.A., Jadhav V.M. et Kadam V.J. (2010).** Potential of tannins. *Asian j of plant sciences*, 9: 209-214.
- **Ben Nasr C., Ayed N. et Metche M. (1996).** Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203: 374-378.
- **Billerbek V.G., Roques C., Vanière P., Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiènes*, 3:248-251.
- **Boussalah N. (2010).** Propriétés antioxydantes de deux variétés de grenade (*Punica granatum* L.) de la région de Béjaia. *Thèse de Magister* de l'université de Béjaia.
- **Bruneton J.(2008).** Pharmacognose, phytochimie, plants médicinales .2 éd .TEC et DOC ;Lavoisier : 233 – 447 ;
- **Buffo J., Herman M. A. et Soll D. R. (1984).** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 85: 21-30.

- C -

- **Cam M. et Hisil Y. (2010).** Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry, In Press, Corrected Proof*.
- **Cardon D. (2003).** Le monde des teintures naturelles. Ed. *Belin*: 370- 586.
- **Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan, F., Ozek T.et Baser K.H.C.2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*.

- **Cemeroğlu B., Artık N. et Y Üncüler O. (1988).** Nar suyu üzerinde araştırmalar. *Doğa*, 12: 322-334.
- **Characklis W.G. et Marshall K.C. (1990).** Biofilms. *John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.*
- **Chast F. (2010).** Académie nationale de Pharmacie: Flavonoïdes alimentaires et santé humaine, particulièrement dans le domaine cardiovasculaire. *CR / Séance thématique*, 1-6.
- **Chevaux JM., Nanfi C., Brocker P. et Giumelli B. (2002).** Candidoses oro-pharyngées et prothèses amovibles chez les sujets âgés: les facteurs favorisants. *Inf Dent*, 10: 603-610.
- **Chira K., Suh J.H., Saucier C. et Teissedre P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6 : 75-82.
- **Chu W. S., Magee B. B. et Magee P. T. (1993).** Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol.* 175: 6637-6651.
- **Cole G. T., Seshan K. R., Phaneuf M. et Lynn K. T. (1991).** Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol.* 37: 637-646.
- **Costerton J.W., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D. et James G. (1994).** Minireview: biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176: 2137-2142.
- **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. et Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-582.

-D -

- **Dahanukar SA., Kulkarni RA. et Rege NN (2000).** Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian J Pharmacology.* 32: 81-118.
- **Daouameur K., Akhdari N., Amal S., Zougaghi L. et Moutaj R.. (2009).** Infections cutanéomuqueuses à *Candida albicans*: étude clinique. *Esp médic*, Tome 16, 160: 335-338.
- **De M., Krishna A De. et Banerjee A.B. (1999).** Composition comprising an extract of pomegranate. *Phytotherapy Res.* 13: 616-618.
- **Djafri S. et Faid S. (2011).** Contribution à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade. *Thèse d'Ingénieur d'état de l'université de Bejaia.*

-E -

- **Edeas M. (2010).** Polyphénols et jus de grenade. *Phytothérapie*. 8: 16-20.
- **Elmastasa M ., Gulçinb I ., Isildaka O ., Kufrevioglub O.I ., Ibaolua K. et Aboul-Eneinc H.Y. (2006).** Radical Scavenging Acitivity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts.
- **Elodie Wald. (2009).** Le grenadier (*Punica granatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. *Thèse de doctorat* en pharmacologie de l'université Henri Poincaré - Nancy 1: P26 et 132-133.
- **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. et Jurgens G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13, p. 341.
- **Evreinof V. A. (1949).** Fruits d'outre-mer. le grenadier .V.1, 3 .

-F -

- **Fabre B. Ermosilla V. (2008).** Uses of pomegranate tree extract for hear color retention. *U.S patent*.
- **Fauchère J.L . et avril j.l. (2002).** Antibiotiques in bactériologie générale et médicale .p-. Ed :*ellipse Marketing S.A* (Paris) : 141-175 .ISBN 2-7298-0747-0.
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité chimique* ; 108-115.
- **Filler S. G., Swerdloff. J. N., Hobbs C. and Luckett, P. M. (1995).** Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 63.
- **Flemming H.C., Wingender J., Moritz R., Borchard W. et Mayer C. (1999).** Physico-chemical properties of biofilms. Short review, *Biofilms in the aquatic environment. Edt The Royal Society of Chemistry*, 1-12.
- **Fotos PG., Vincent S. et Hellstein JW. (1992).** Oral candidosis. Clinical, historical and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 74: 41-49.
- **Fournier P. (1948).** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. *Paul Lechevalier* :Tome II : 291- 504.
- **Frenkel K. et Chrzan K. (1987).** Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis*, 3: 455-460.

- **Fu Y., Ibrahim A. S., Fonzi W., Zhou X., Ramos C. F. et Ghannoum, M. A. (1997).** Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, 143: 331-340.

-G-

- **Gagnon C. (2008).** Le grenadier persan et son fruit champion. Ed: *estate of Oziasn Leduc /SODRAC*.
- **Ghannoum, M. A. (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13: 122-143.
- **Gil MI., Tomas-Barberan FA., Hess-Pierce B., Holcroft DM. et KaderAA (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, 48(10): 4581-9.
- **Gow N. A. (2002).** *Candida albicans* switches mates. *Mol Cell*, 10: 217-218.
- **Graser Y., Volovsek M., Arrington J., Schonian G., Presber W., Mitchell T. G. et Vilgalys, R. (1996).** Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 12473-12477.
- **Guggenheim B., Giertsen W, Schupbach P.et Shapiro S. (2001).** Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*, 80:363-70.

-H-

- **Hagerman A.E. et Butler L.G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. *J of Agriculture and Food Chemistry*, 26 (4): 809-812.
- **Hamada S., Torii M. (1978).** Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun*,20:592.
- **Haidari et al. (2009).** Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir, University of Texas Health Science Center at Houston, USA.
- **Hartman R. E. (2006).** Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*, 24, 3: 506–515.

- **Haslam E. (1996).** Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod*, 59:205-215.
- **Hollebeeck S., Rogez H., Mignolet E., Rotzenberg R., Schneider YJ., Habib JL. et Larondelle Y. (2005).** Extraction, purification and identification of pomegranate husk polyphenols using HPLC –DAD and LC –MS approaches.
- **Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L. et Cassidy A. (2008).** Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr*, 88: 38-50.
- **Hoyer L. L., Payne T. L., Bell M., Myers A. M. et Scherer S. (1998).** *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*, 33: 451-459.
- **Huang D., Ou B., et Prior R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841–1856.

-I-

- **Ibata-Ombetta S., Idziorek T., Trinel P. A., Poulain D. et Jouault T. (2003).** *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 13086-13093.
- **Ignat I., Volf I., Vlentini I. et Popa V. I. (2011).** A critical review of methods for characterisation polyphenolic compounds in fruits and vegetable. *food Chemistry*, 126: 182-1835.

-J-

- **Jayaprakasha G.K., Negi P.S., et Jena B.S. (2006).** Antimicrobial Activities of Pomegranate. *Taylor and Francis Group, LLC*, 167-177.
- **Jung Bettina. et Curtay Jean-Paul. (2010).** La grenade, aliment-plus. Ed *marco pietteur*, P : 09- 10.
- **Jung K.H. et al. (2006).** Suppressive effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1258–1261.

-K -

- **Kakiuchi N., Hattori M. et Nishizawa M. (1986).** Studies on dental caries prevention by traditional medicines. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glycosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull*, 34: 720-725.
- **Kaur G., Jabbar Z., Athar M. et Alam M. S. (2006).** *Punica granatum* L. (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*.
- **Kehrer J.P., Smith C.V. (1994).** Free radicals in biology: sources, reactivities and rôles in the etiology of human diseases. Académie Press, 25-62.
- **Kolodzie J., Kayser O., Latte kp. et Ferreira D, (1999).** Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the micro dilution broth method. *Planta medica*, (5) :444-446.

-L -

- **Lagane Céline. (2007).** rôle de l'il-13 et des ligands de ppar- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *candida albicans*. Implication de ppar- γ . Thèse de Doctorat de l'université Toulouse III – Paul Sabatier.
- **Laifer S. (2005).** Pomegranate ancient fruit of life yields modern promise. *Le Magazine*, 87-91.
- **Lansky EP. et Newman RA. (2007)** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*, 109.
- **Lappin-Scott H.M. et Costerton J.W. (1995).** Microbial biofilms. *Cambridge University Press, Cambridge, England*.
- **Lee H.S. (2001).** Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *J of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2563-2568.
- **Leuenbeger M. (2009).** Dossier le monde des senteurs naturelles nutritives et sensuelles: la nouvelle ligne de soins à la grenade est là!, 147.
- **Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. et Cheng S. (2006).** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate peel extract. *Food Chemistry*, 96: 254-260.

- **Lortholary Olivie, (2003).** les mycoses, Elsevier Masson, ISBN 2842994582,9782842994587, P :181-191 .

-M -

- **Maksimovic Z ., Malencic D .,et Kovaevic N. (2005).** Polyphenol contents and antioxydant activity of Maydis stigma extracts *Bioresource Technology*, 96:873-877.
- **Martin S. and Andriantsitohaina R. (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51: 304-315.
- **Meena M.R., Sethi V. (1994).** Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *J. Food Sci. and Tech. Mysore*, 31: 68-70.
- **Meyer A., Deiana J. et leclerc H. (1994).** cours de microbiologie générale. Ed :Doin .Paris, p.365.
- **Milane Hadi. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. Strasbourg.
- **Monod M. et Borg-von Zepelin M. (2002).** Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*, 81: 114-128.
- **Morton J.F. (1987).** Pomegranate. In: *Fruits of warm climates*. Ed. Creative resources systems. Miami, Florida: p.352-355.

-N -

- **Negi PS., Jayaprakasha GK. et Jena BS. (2003).** Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80(3): 393-397.
- **Neurath R., Strick N. et al. (2004).** *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BioMed Central infectious diseases*,4:12- 41.
- **Neurath A. R., Strick N., LI Y. Y. et Debnath a. K. (2005)** *Punica granatum* (pomegranate) juice pro-vides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Ann NY Acad. Sci*, 1056 : 311-237.
-

-O -

- **Odabasoglu F , Aslan A .,Cakir A., Suleyman H ., Karagaz Y ., Malici M .et Bayir Y.(2004)** Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species *.Phytotherapy Research*.18:938-941.
- **Odds, J. C.(1988)** . *Candida and candidosis*
- **Oukabli A. (2004)**. Le grenadier : Des variétés performantes pour la culture. Bulletin mensuel d'information et de liaisons du PNTTA .MADRPM/DERD. 123 :1-14 .
- **Oyaizu M. (1986)**. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *J. Nut.*, 44: 307-315

-P -

- **Packer J. E., Slater T. F.et Willson .R. L, (1979)**. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-738.
- **Pannuti CM., Mattos JP., Ranoya PN., Jesus AM., Lotufo RF.et Romito GA.(2003)**. Clinical effect of herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis: a double-blind study. *Pesqui Odontol Bras* 17: 314–318.
- **Pereira JV., Pereira MSV., Sampaio FC., Sampaio MCC., Alves PM., Araújo CRF.et Higino JS. (2006)**. *In vitro* antibacterial and antiadherence effect of *Punica granatum Linn.* extract upon dental biofilm microorganisms. *Braz J Pharmacogn*, 16:88-93.
- **Pourut B. (2008)**. *Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia faba*. Thèse de doctorat, de l'université de Toulouse, 281p.
- **Prommouak C.,De-Eknamkul W.et Shothihepruk A.(2008)**.Extraction ot flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxydant activity of extract .Separation and purification *Techology* ,62 :444-448 .

-R -

- **Ram, A. (1998)** La richesse de l'Inde, dictionnaire des matières premières indiennes et des produits industriels, les matières premières. Tome VIII: Institut national de la communication scientifique, Conseil de la recherche industrielle et scientifique, New Delhi.
- **Reddy M. K., Gupta S. K., Jacob M. R., Khan S. I., Ferreira D. (2007)**. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum L.* *Planta Med.*

- **Revol B., Devoize L., Deschaumes C., Barthelemy I., Baudet-Pommel M. et Mondié JM (2006).** Stomatologie gériatrique. *Stomatologie*, 22-052-A-10.
- **Ribereau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux, Ed : Dunod. 10-26.
- **Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribereau-Gayon P. (1982).** Composés phénoliques. « Traité d'œnologie, science et technique du vin », Ed. Dunod : 477-519.
- **Ribereau-Gayon P. et Gautheret R.J. (1986).** *Les composés phénoliques des végétaux.* Ed. Dunod : 273.
- **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. et Pridham J.B. (1995),** the relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22 : 375-383.
- **Richard B. (2009),** les caroténoïdes : des pigments essentiels à la santé. J de Montréal, Votre Vie, 53.
- **Rodriguez-Amaya. (2001).** A guide to carotenoid analysis in foods, *International Life Sciences Institute Press*, 1-71 .
- **Rotrosen, D., Edwards, J. E., Jr., Gibson, T. R., Moore, J. C., Cohen, A. H. and Green, I., 1985.** Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanisms of attachment and endothelial cell penetration. *J Infect Dis* .152: 1264-1274.
- **Rotstein, D., Parodo, J., Taneja, R. Marshall, J. C. 2000.** Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock*. 14: 278-283.

-S -

- **Sampaio F.C., Pereira M.d.S.V., Dias C.S., Costa V.C.O. Conde N.C.O. et Buzalaf M.A.R. (2009).** In vitro antimicrobial activity of Ethnopharmacology :1-6.
- **Sarni-Manchado P. et Cheynier, V. (2006).** Structure phénoliques et goût. In : *les polyphénols en agroalimentaire*. TEC and DOC. LONDRES-PARIS-NEW YORK, (4) : 89-124 .
- **Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Chemistry*, 30:3875-3883.
- **Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C. and Hube, B. (2005).** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 48: 365-377.
- **Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G. et Heber D. (2005).** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin,

- ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.*,16: 360-367.
- **Sheets M.D., Du Bois M.L. et Williamson J.G. (1994).** The pomegranate. HS, 44: 1-3. Horticultural Sciences Département, Florida Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida.
 - **Sies . (1991)** introduction .In : oxidative stress : oxidants and antioxydant .academic press : London.
 - **Singh R.P., Murthy C., Jayaprakasha G.K., (2002).** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extract using in vitro models. *J. Agric. Food Chem*, 50,:81–86.
 - **Stanley -N. R., Lazazzera B. A., Britton R. A. et Grossman A.D. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *J. Bacteriol*, 185: 1951-1957.
 - **Stewart P. S. et J. W. Costerton (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276): 135-8.
 - **Storey T. (2007).** La grenade, le fruit médicament. *Santé*, 51: 46-47.
 - **Stoodley P., K. Sauer. Davies D.G,et Costerton J.W. 2002.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
 - **Suay I., Arenal F., Asensio F.J., Basilio A., Cabello M .A., Diez M.T.et al. (2000).** Sceerning of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van leewenhoek* ,78:129-139.
 - **Szpirglas H, Ben Slama L. (1999).**Pathologie de la muqueuse buccale. Paris : Ed *Scientifiques et Médicales Elsevier SAS*, 308.

-T -

- **Turkmen N., Velioglu Y.S.et Sari, F (2006).** Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphénols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*,99: 835-841.

-V-

- **Vasconcelos L.C.S., Sampaio F.C., sampaio M.C.C ., pereira M.S.V.,Higino J.S et peixoto M.H.(2006).**minimum inhobitory concentration of adhérence of *Punica granatum* l. (pomégranate) gel agains *S .mutans .s.mitis* and *C.Albicans* .Braz ,Dent .j 17(3) : 223- 227.

- **Vanier P. et Cyr J (2007).** La grenade au fil de temps, usages culinaires, conservations, écologie et environnement. Ed. *totalmedia inc* .institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels.
- **Viuda –Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez –Lopez J ., Sendra E., Sayas-Barbara E. et Pérez-Alvarez J.A (2011).** Antioxydant properties of pomegranate (*punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44:1217 1223.

-W-

- **Walali I., skiredj D. et elattir H. (2003).** L'amandier, le figuier, le grenadier .transfert de technologie en agriculture, 105:1-4.
- **Wang R., Ding Y., Liu R., Xiang L. et Du, L, (2010).** Pomegranate: constituents, bioactivities and pharmacokinetic .*Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* ,*Global Science Books*, 4(2): 77-87.

-Z-

- **Zahin Maryam., Farrukh Aqil. et Iqbal Ahmad. (2010).** Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Journal of Mutation Research* ,703: 99–107.
- **Zalman Henkin. (2008).** Waste peel from pomegranate juice factories makes healthy cattle feed, *ScienceDaily*

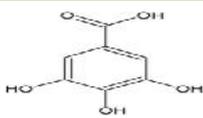
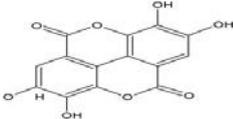
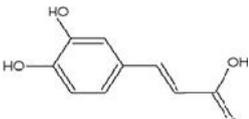
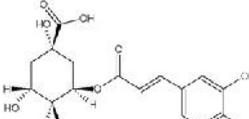
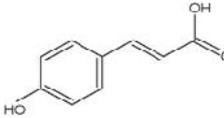
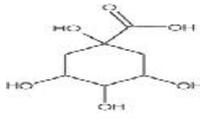
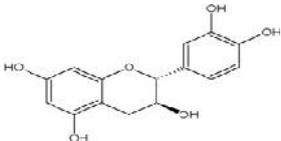
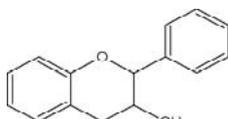
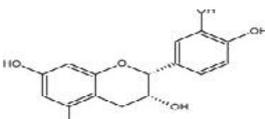
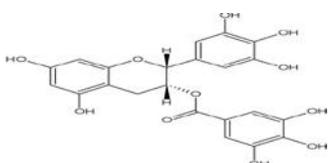
Références numériques

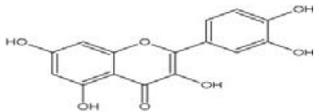
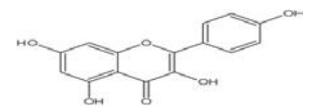
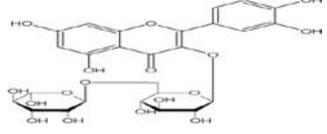
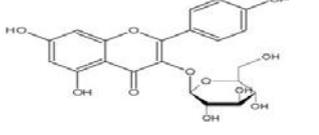
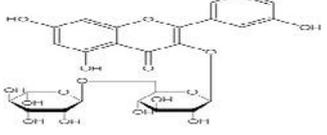
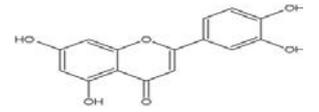
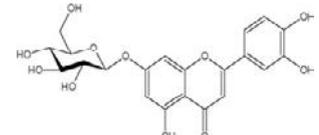
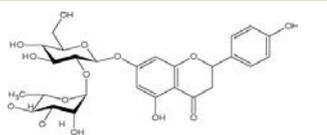
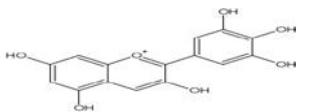
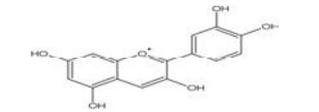
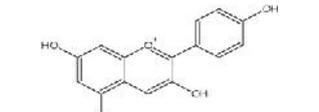
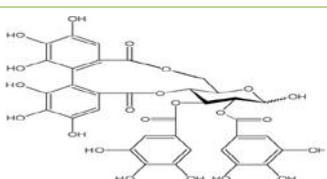
- **Anonyme 1:** http://www.marche.fr/petite_annonce_jardin-nature-plantes-punica-granatum-grenadier-ref1231576-dep74.html
- **Anonyme 2:** <http://www.medisite.fr/medisite/Grenade,3974.html>.
- **Anonyme 3:** http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?Doc=grenade_nu.
- **Anonyme 4:** http://www.boitearecettes.com/fruits_legumes/liste/grenade/grenade.htm

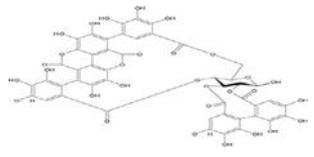
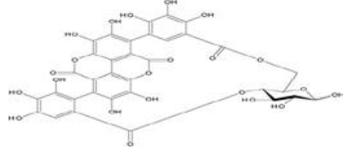
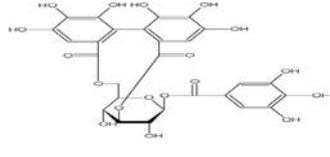
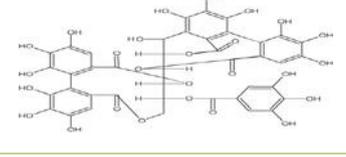
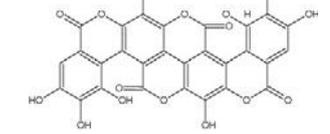
Annexes

Annexe 1

Tableau I: composés phénoliques essentiels de l'écorce de grenade et leurs structures (Elodie, 2009).

Classe chimique	Nom du composé	Structure chimique
Acide hydroxybenzoïque	Acide gallique	
	Acide ellagique	
Acide hydroxynamique (phenylpropanoïdes)	Acide cafeïque	
	Acide chlorogénique	
	Acide p-coumarique	
Acide cyclitol carboxylique et leurs sels	Acide quinique	
Flavan-3-ols	Catechine	
	Flavan-3-ol	
	Epicatechine	
	Epigallocatechine-3-gallate (ECGC)	

Flavonols	Quercetine	
	Kaempferol	
Flavonols glycosides	Rutine	
	Kaempferol3-o-glycosides	
	Kaempferol3-o-rhamnoglycoside	
Flavones	Luteoline	
Flavone glycosides	Luteoline7-o-glycoside	
Flavanone glycosides	Naringine	
Anthocyanidines	Delphinidine	
	Cyanidine	
	Pelargonidine	
Ellagitannins	Tellimagradine	

	Punicalagin	
	Punicaline	
	Corilagin	
	Casuarinine	
	Gallagylidilactone	

Annexe 2

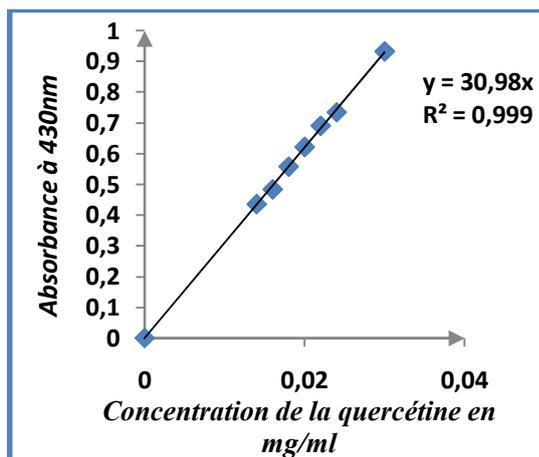


Fig N°1: courbe d'étalonnage des flavonoïdes

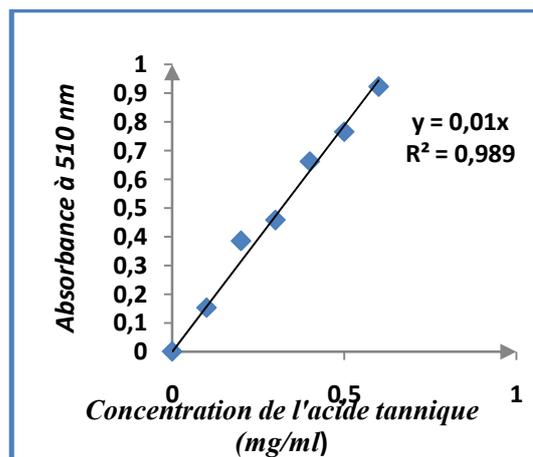


Fig N°2: courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables

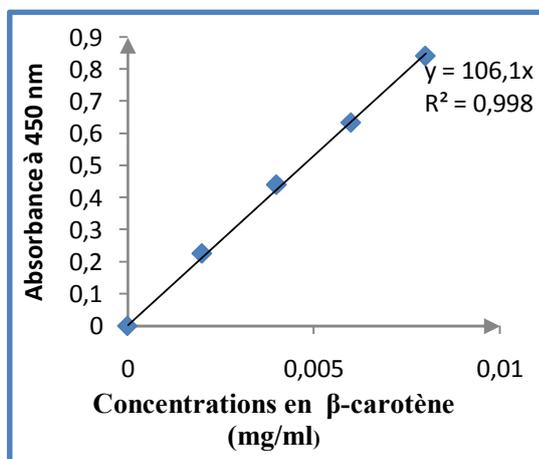


Fig N° 3: courbe d'étalonnage des caroténoïdes

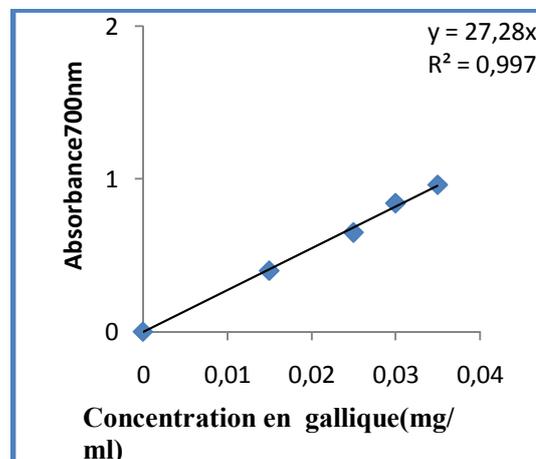


Fig N° 4: courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur

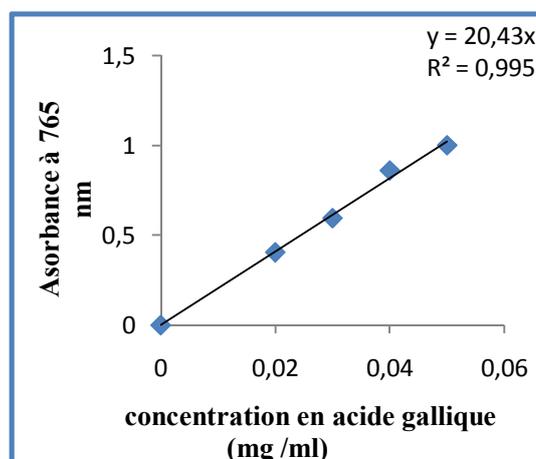


Fig N°5: courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Annexe 03

Tableau I: diamètres des zones d'inhibition

L'extrait	Diamètres (mm)			
	Concentration (g/ml)	CAM1	CAM2	CAM3
<i>Lahlou</i>	1	26,3±0,57	25±0,00	26±0,10
	0.5	20,6±0,57	22,3±0,57	22,6±0,15
	0.25	18,3±0,57	18±0,00	19,3±0,05
	0.125	15,3±0,57	15±0,00	15±0,10
<i>Quares</i>	1	28,3±1,52	26,3±1,52	26,6±0,57
	0.5	25,6±0,57	23±2,00	22,3±1,54
	0.25	21±1,73	19±1,00	19,6±0,57
	0.125	18±2,64	14,5±0,57	15,3±0,57
AmphotéricineB	0.01	24±0,00	20±0,00	22±0,00
Témoin négatif		0±0,00	0±0,00	0±0,00

Tableau II: inhibition de l'attachement du biofilm des trois souches par les extraits.

Souches	témoin	<i>Quares</i>			<i>Lahlou</i>		
		0,97mg/ml	0,48mg/ml	0,24mg/ml	0,97mg/ml	0,48mg/ml	0,24mg/ml
CAM1	4	1 ^A	2 ^A	3 ^A	1 ^B	2 ^B	3 ^B
CAM2	4	1 ^c	2 ^c	3 ^c	1 ^d	2 ^d	3 ^d
CAM3	4	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^b	2 ^b	3 ^b

a: Important, **A:** plus important, **c:** moins important **b:** plus modéré, **B:** modéré, **d:** moins modéré.

0: pas attachement, **4:** attachement fort.

Annexe 4

Tampon phosphate (0, 2 M pH 6,6)**K₂HPO₄ (la base)**K₂HPO₄.....34, 8g.H₂O.....1000ml.**KH₂PO₄ (l'acide)**KH₂PO₄.....27, 2g.H₂O.....1000ml.**Fercyanidine de potassium (1%)**

Fer k.....1g.

H₂O.....100ml.**Acide trichloracétique TCA (10%)**

TCA.....10g.

H₂O.....100ml.**FeCl₃ (0, 1%)**FeCl₃.....0,1g.H₂O.....100ml.**Carbonate de sodium (Na₂CO₃, 7, 5%)**Na₂CO₃.....7, 5g.H₂O.....100ml.**SDS (1%)**

SDS.....1g.

H₂O.....100ml.**TEA (5%)**

TEA.....5 ml.

H₂O.....100ml.**Tampon acétate (pH= 4, 9)**

Acide acétique glacial (0,2M)11, 4 ml.

NaCl.....9,86g.

H₂O.....800ml.

pH ajusté à 4,9 avec NaOH.

BSA (1g / 1L tampon acétate)

BSA.....1g.

Tampon Acétate.....1L

Annexe 5

Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande 2g

Hydrolysate acide de caséine 17,5g

Amidon 1,5g

Agar 10 g

Eau 1L

pH 7,4

Gélose Sabouraud

Peptone de viande 5g

Peptone de caséine 5g

Glucose 20 g

Agar 20g

Eau 1L

pH 6,3

Bouillon BHIB (Bouillon cœur cervelle)

Protéose peptone 10g

Infusion de cervelle de veau 12,5g

Infusion de cœur de bœuf 5g

Chlorure de sodium 5g

Phosphate disodique 2,5g

Glucose 2g

Eau 1L

pH 7,4

Glossaire

Galle: excroissance des végétaux à la suite des piqûres des insectes.

Iatrogène: c'est une maladie provoquée par un acte médical ou par les médicaments, même en absence d'erreur du médecin.

Inflammation: Réponse non spécifique à une agression, caractérisée par rougeur, chaleur et douleur au niveau de la zone infectée.

Acide cinnamique: c'est un acide organique $C_6H_5-CH=CH-COOH$. Ces dérivés ont l'odeur de cannelle.

Xérostomie: se définit par une sensation de sécheresse buccale due à une diminution du flux salivaire. La salive remplit deux fonctions essentielles: elle joue un rôle protecteur, assuré par la présence de protéines antimicrobiennes, ainsi qu'un rôle de lavage. Lorsque ces fonctions sont réduites, la fréquence des candidoses orales augmente.

Macération: Opération qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide.

Oblongue: plus longue que large.

Opportuniste: Se dit d'un germe qui ne devient pathogène que dans un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies.

Protéosome: Les protéasomes sont des complexes enzymatiques multiprotéiques que l'on retrouve chez les eucaryotes.

Stipule: petite feuille supplémentaire, réduite le plus souvent à la nervure médiane, et produite par une expansion du pétiole, qui s'insère de chaque côté de la base de certaines feuilles.

Résumé

L'objectif du présent travail est de mettre en évidence l'activité antifongique et antioxydante des extraits acétoniques de l'écorce de deux variétés de grenade (*Punica granatum* L.) locales *Quares* et *Lahlou*.

L'extrait de l'écorce de la variété *Quares* a montré des teneurs les plus importantes en polyphénols totaux (697, 20±24,09 mg EAG/g ES), en tanins hydrolysables (63,6±4,10 mg EAT/g ES) et en tanins condensés (173, 43±9,029 mg /g ES). Par contre, les flavonoïdes sont plus importantes dans la variété *Lahlou* (143,12±0,27 mg EQ/g ES).

Les résultats de cette étude ont montré que l'extrait acétonique de la variété *Quares* présente une meilleure activité scavanger sur H₂O₂, réductrice et ainsi une activité antifongique contre les espèces de *C. albicans* dans l'ordre suivant: CAM1>CAM3>CAM2 avec des CMI allant de 0,97-1, 95mg/ml et une CMF de 15,62 mg/ml. L'ordre d'inhibition de l'attachement du biofilm formé par *C. albicans* est comme suit: CAM1>CAM3>CAM2.

Mots clés: *Punica granatum* L, les antioxydants, *Candida albicans*, activité antioxydante, activité antifongique, biofilm.

Abstract

The objective of this work is to demonstrate the antioxidant and antifungal activity of acetone extracts from two varieties of pomegranate (*Punica granatum* L.) *Quares* and *Lahlou*.

The extract from the variety *Quares* showed the largest concentrations of total polyphenols (697, 20±24.09 mg EAG/g ES), in hydrolysable tannins (63.6±4.10 mg ATE/g ES) and condensed tannins (173, 43±9.029 mg/g ES). But flavonoids are greater in variety *Lahlou* (143.12±0.27 mgEQ/g ES).

The results of this study showed that acetone extract of the variety has better *Quares* scavanger activity of H₂O₂, thus reducing and antifungal activity against species of *C. albicans* in the following order: CAM1> CAM3> CAM2 with MICs ranging from 0.97-1, 95mg/ml CMF of 15.62 mg / ml. The order of biofilm inhibition of attachment formed by *C. albicans* is as follows: CAM1> CAM3> CAM2.

Keywords: *Punica granatum* L, antioxidants, *Candida albicans*, antioxidant activity, antifungal activity, biofilm.