



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

Évaluation de l'activité antimicrobienne des écorces de
grenade

Présenté par: Belkhiri Amina & Benfredj Afaf

Soutenu le 11 / 06 / 2024, Devant le Jury :

Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président : Mme. CHENOUF Nadia Safia	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant : Mme. SOUAGUI Yasmina	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur : Mme. IRATNI Nadjat	MAA	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2023/2024

Remerciements

الحمد لله الذي وفقنا على إنجاز وإتمام هذا العمل

*Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur de ce mémoire Mme **SOUAGUI Yasmina** pour l'aide compétente qu'elle nous a apportée, pour sa patience et sa confiance, ses encouragements. Nous vous en sommes très reconnaissantes et on espère être à la hauteur de votre confiance.*

*Nous remercions aussi les membres du jury qui vont juger ce travail : Mme **IRATNI Nadjet** et Mme **CHENOUF Nadia Safia**.*

*Nous remercions aussi tous les ingénieurs de labo particulièrement **GAHFIF Wahiba** et **DEHAMNA Wassima** et **BENYAHIA Fadila** pour l'aide qu'elles nous ont apportée pendant la période de la réalisation de ce travail.*

À tous les enseignants et les amis durant tout notre cursus.

Nous remercions à tous ceux qui nous ont aidés dans le laboratoire de la faculté.

Dédicace

A ma grand mère رَحْمَتُهَا اللهُ

A mon paradis, mes parentes c'est grâce à vous, merci de toujours être là pour moi, pour votre soutien j'espère que vous êtes fiers de moi merci de m'inspirer .

A mes sœurs meriem et marwa et mon bras droit mon frère Badreddine merci à votre soutien et de m'avoir encouragé pendant les moments difficiles.

A mes petits amoures Isak et Lina

A toute ma famille

Mes besties wouroud, Hadil, Khadidja, Nada, Kanza merci mes meilleures amies au monde.

A moi

Afaf

Dédicace

C'est avec une immense joie et un grand honneur que je dédie ce travail :

*A nos très chers mes parents mes yeux **Nasar** et **Fouzía** et merci de m'avoir toujours encouragé, vous avez été ma force motrice pour réussir dans mes études durant toutes ces années et pour travailler avec plus de courage et persévérance. Que dieu les garde pour moi.*

*A mes très chers grandpère et grand-mère **Elsaaïde** et **Mebarka** et **Ibrahím** et **Houría** que dieu prolonge leur vie.*

*A mon très cher frère **Amíne***

*A mes très chères sœurs **Imane** et **Chayma***

*A mes chers oncles **Elamrí**, **Mohamed**, **Noouredíne**,*

*A mes chères tantes **Zína**, **Fatíma**, **Farída**, **Sonía**, **Zahra**, **Rebíha** et tous leurs enfants du plus grand au plus petit.*

*A mes chères tantes **Nadíá**, **Náíma**, **Hamída**, **Lamía**, **Karíma**, **Souade**, **Líla** et tous leurs enfants du plus grand au plus petit.*

*A mon ami **Mohamed Gaouaoui***

*A mes fidèles amies **Maíssa Yakoubí** et **Amírakateb***

A Moi

*A ma binôme **Benfredj Afaf***

Amína

Table de matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre I: Matériel et Méthodes	4
I.1-Matériel biologique.....	4
I-1.1. Matériel végétal.....	4
I-1.2. Les microorganismes des référence.....	4
I-2. Méthodes	4
I-2.1. Préparation du matériel végétal.....	4
I-2.1.1. Préparation de la poudre de l'écorce de <i>Punica granatum L</i>	4
I-2.1.2. Préparation des extraits.....	4
I-2.2. Extraction par infusion et décoction.....	4
I-2.3. Influence du temps de macération sur l'extraction des molécules bioactives.....	5
I-2.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits	5
I-2.4.1. Préparation de l'inoculum.....	5
I-2.4.2. Ensemencement.....	5
I-2.4.3. Préparation des disques d'extraits	5
I-2.4.4. La lecture	5
I-2.5. Détermination de la CMI et de la CMB	6
I-2.6. Dosages biochimiques des molécules	6
I-2.6.1. Dosages de polyphénols.....	6
I-2.6.2. Dosages de flavonoïdes	6
I-2.6.3. Dosages de tanins hydrolysables	7
Chapitre II : Résultats et discussion	8
II-1. Résultats des tests de l'activité antimicrobienne des extrait de poudre	8

II-1-1. Résultats de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la variété 1	8
II-1-2. Résultats de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la variété 2	11
II-2. Résultats de l' influence du temps de macération sur l'extraction des molécules bioactives et l'activité antimicrobienne des deux variétés	16
II-3. Résultats d'extraction par infusion et décoction	17
II-4. Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB	21
II-5. Résultats du dosage chimique des molécules	2Error! Bookmark not defined.
Conclusion	24

Liste de références

ملخص / Résumé/abstract

Liste des tableaux

Numéro	Titre du tableau	Page
Tableau I	Les microorganismes cibles	4
Tableau II	Résultats de la CMI et de la CMB	22

Liste des figures

Numéro	Titre de la figure	Page
Figure 1	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 avec un solvant (a) et mélanges de solvants (b) vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923.	8
Figure 2	Activité antibactérienne des extraits de la variété 1 avec un solvant (a) et mélanges solvant (b) vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923.	8
Figure 3	Résultats de l'effet du méthanol (témoin) sur <i>S. aureus</i> .	9
Figure 4	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	9
Figure 5	Activité antibactérienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	9
Figure 6	Activité antibactérienne des extraits de la variété 1 vis-à-vis de <i>E. coli</i> ATCC25922	10
Figure 7	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	10
Figure 8	Activité des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	11
Figure 9	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 2 avec un solvant (a) et mélanges de solvant (b) vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923.	11
Figure 10	Activité des extraits de la variété 2 avec un solvant (a) et mélanges de solvant (b) vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923.	12
Figure 11	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	12
Figure 12	Activité des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	13
Figure 13	Activité des extraits de la variété 2 vis-à-vis de <i>E. coli</i> ATCC25922.	13
Figure 14	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	14
Figure 15	Activité des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	14

Figure 16	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 et 2 vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923.	16
Figure 17	Figure 17 : Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923 de la variété 1 et 2.	17
Figure 18	Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 et 2 vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	17
Figure19	Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> de la variété 1 et 2.	18
Figure 20	Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de <i>E. coli</i> ATCC25922 des extraits de la variété 1 et 2.	18
Figure 21	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 1 et 2 vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	19
Figure 22	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923.	20
Figure 23	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de <i>E. faecalis</i> .	20
Figure 24	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	21
Figure25	Activité antibactérienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de <i>E. coli</i> ATCC25922.	21
Figure 26	Résultats de la détermination de la CMB pour les deux variétés.	23

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

DO : Densité optique

EAT : Equivalent d'acide tannique

EAG : Equivalent d'acide gallique

EQ : Equivalent de quercétine

ext : extrait

g : gramme

mg : milligramme

min : minute

ml: millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

Ps : poids sec

µl : microlitre

µg : microgramme

UV/ VIS : Ultraviolet- Visible.

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées comme remède pour soigner les maladies depuis des millénaires (**Evreinoff, 1957**) ; suite à de nombreuses années d'utilisation empirique de préparations à base de plantes, la première extraction de substances actives – telles que les alcaloïdes morphine, strychnine, quinine, etc. – au début du XIXe siècle marque un tournant dans l'utilisation des plantes médicales contemporaines. Les plantes médicinales peuvent être utilisées sous deux formes distinctes : comme des mélanges complexes qui renferment une variété de composants (infusions, huiles essentielles, teintures, extraits) ou en tant que principes actifs purs, définis chimiquement (**Hamburger et Hostettmann, 1991**).

La résistance aux antimicrobiens représente l'une des principales préoccupations sur le plan mondial pour la santé publique et le progrès. Selon les estimations, la résistance des bactéries aux antimicrobiens a été associée directement à 1,27 million de décès à travers le monde en 2019 et a contribué à 4,95 millions de décès. Les agents pathogènes résistants aux médicaments sont principalement causés par l'utilisation abusive et excessive des antimicrobiens chez les humains, les animaux et les plantes (**OMS, 2023**).

L'accroissement de la toxicité des médicaments synthétiques et la baisse de leur efficacité ne sont que deux autres motifs de préoccupation. Ainsi, les études récentes se sont focalisées sur la découverte de nouveaux antimicrobiens à partir de plantes. Les plantes et leurs extraits ont été utilisés dans différentes branches de la médecine traditionnelle et, en raison de leur abondance, ils peuvent fournir une variété de métabolites secondaires avec une variété de structures. En effet, les métabolites secondaires végétaux présentent des propriétés prometteuses qui peuvent constituer des sources alternatives pour combattre la résistance microbienne (**Kupnik et al., 2021**).

Le grenadier est un arbuste ou un arbre buissonnant qui peut atteindre une hauteur de 2 à 5 mètres, avec des feuilles caduques, un tronc tortueux et des épines légèrement pointues. La plupart du temps, il pousse de manière naturelle ou cultivée dans toute la région méditerranéenne (**Wald, 2009**). La peau représente environ 50% du poids du fruit, ce qui en fait une source importante de composés bioactifs. Pendant ce temps, 40% du fruit de la grenade est comestible et 10% sont des grains (**Rebogile, 2016**).

La Grenade (*Punica granatum*, Linné) est une variété de fruits précieux qui se trouve dans les régions méridionales et subtropicales. *Malum granatum* est le nom latin de la pomme granulée (**Valero-Mendoza et al., 2023**).

Le nom scientifique actuel *Punica granatum* provient du nom latin *Pomum* (pomme), *granatus* (grain), ou pomme semée. Arhumani était le nom de la grenade en Égypte antique. Le nom *Punica granatum* a été finalement attribué par C. von Linné (**Chandra, 2010**).

Cet arbre a été introduit en Afrique du Nord par les Romains, qui étaient alors sous le contrôle des Phoeniciens et dont la capitale était Carthage. Le terme utilisé par les Romains était *Malum punicum*. À cette époque, le troisième fruit était appelé « *malum* » (pomme) : la pomme authentique, le coing (*malum stutheum*) et la grenade (**Evreinoff, 1957**).

La classification phylogénétique APGII (Angiosperm Phylogeny Group) est une classification phylogénétique réalisée en 2003, comprenant 45 ordres et 457 familles (**Wald, 2009**) :

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre: *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

Le grenadier (*Punica granatum L.*) est une culture commerciale importante qui est cultivée dans divers endroits du monde (**Rebogile, 2016**). Il est originaire de la région du Nord de l'Inde et de l'Iran. Mais il est maintenant largement cultivé en Californie, au Mexique, en Arizona et en Afrique (**Abdollahzadeh et al, 2010**). En Italie, en Espagne, au Maroc et en Algérie, il est fréquent de croiser des Grenadiers qui sont devenus sauvages dans les environs des maisons (**Evreinoff, 1957**).

Les actions pharmacologiques de la grenade ont une longue histoire et ont été décrites dans la littérature grecque et égyptienne. Des études récentes ont montré que la grenade a de nombreux effets potentiels, notamment des effets bactéricides, antifongiques, antiviraux, immunomodulateurs, anthelminthiques, stimulants, réfrigérants, astringents, stomachiques, toniques, laxatifs, diurétiques et anthelminthiques. Également utilisé pour réduire les effets indésirables des maladies cardiovasculaires, du diabète, de la diarrhée, de la dysenterie, de l'asthme, de la bronchite, de la toux, de la coagulopathie, de la fièvre, de l'inflammation, du syndrome d'immunodéficience acquise, de l'indigestion, des ulcères, des contusions, des plaies, des lésions buccales, du paludisme, du cancer de la prostate, de l'athérosclérose, de l'hypertension, de la maladie parodontale, de l'hyperlipidémie, de la stomatite dentaire,

infertilité masculine, vaginite, dysfonctionnement érectile, maladie d'Alzheimer, obésité, ischémie cérébrale chez les nourrissons (**Abdollahzadeh,2010**).

L'écorce de *Punica granatum* est utilisée pour traiter les infections génitales humaines, la mastite, l'acné, la folliculite, les hémorroïdes, la dermatite allergique, la tympanite, les brûlures, la diarrhée, la dysenterie et comme antioxydant (**Choi et al., 2011**).

L'objectif du présent travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne des écorces de deux variétés de grenade (*Punica granatum*). La partie expérimentale porte sur :

L'extraction des molécules bioactives par différents solvants et méthodes.

L'évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis de souches de référence

L'évaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*.

Détermination de la CMI et du CMB.

Puis, l'étude de la composition biochimique des écorces de grenade testées.

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I-1. Matériel biologique

I-1.1. Matériel végétal : les fruits de grenade, de deux variétés différentes, variété provenant de la région de BBA, précisément de Tagliat, et de la région de Kabylie (Béjaia) appelée communément « lahlou », récoltées du mois d'octobre 2023.

I-1.2. Les microorganismes de référence (cibles)

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence appartenant à la collection du laboratoire. Les souches utilisées sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau I : les microorganismes cibles

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Gram +
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram +
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Gram -
<i>Candida albicans</i> (prélèvement clinique)	/

I-2. Méthodes

I-2.1. Préparation de la poudre de l'écorce de *Punica granatum* L.

Les écorces de grenade des deux variétés ont été isolées et séchées dans un endroit sec et bien aéré à l'ombre, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été conservée dans un flacon en verre et maintenue à l'abri de la lumière et de l'humidité.

I-2.2. Préparation des extraits

Des extraits de chaque variété ont été préparés selon le protocole modifiée de (Bourgou et al.,2016) : 1 g de poudre d'écorce a été mis à macérer dans 10 ml d'eau distillée, méthanol, éthanol, acétone, acétate d'éthyle, des extraits de mélanges de solvant ont été également préparés, à savoir : eau-méthanol, eau-acétone, eau-acétate d'éthyle (60/40), méthanol-acétone-eau (40/40/20) et méthanol-acétate d'éthyle-eau (40/40/20) ; sous agitation magnétique pendant 30 min. Après la sédimentation de la poudre, les surnageants ont été récupérés et placés dans des boîtes pétri en verre, et laissés sécher complètement jusqu'à l'évaporation complète du solvant dans une étuve à température de 40° C. L'extrait a été par la suite récupéré dans 2 ml de méthanol (Abdollahzadeh et al.,2010). Les extraits obtenus ont été conservés dans des flacons en verre dans le réfrigérateur à 4 °C.

I-2.3. Extraction par infusion et décoction

Afin d'étudier l'influence de la technique d'extraction sur la solubilité des molécules bioactives et sur l'activité antimicrobienne, l'extraction par infusion et par décoction a été réalisée :

Par infusion : 1 g de poudre de *Punica granatum* L de chaque variété a été infusé dans 10 ml d'eau distillée pendant 24 h, puis filtré et le filtrat a été récupéré pour utilisation.

Par décoction : 1 g de poudre de *Punica granatum* L de chaque variété a été ajouté à 10 ml d'eau distillée puis mis à ébullition pendant 15 min, puis filtré et le filtrat a été récupéré pour utilisation.

I-2.4. Influence du temps de macération sur l'extraction des molécules bioactives

Pour étudier l'influence du temps de macération sur l'extraction des molécules bioactives, le même protocole de préparation de l'extrait méthanolique a été réalisé, en laissant macérer à des temps différents, à savoir 30 min, 3 h (Choi et al.,2011) , 24 h (Bouharb et al .,2014) et 72 h.

I-2.5. Étude de l'activité antibactérienne des extraits

a) Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 heures sur gélose nutritive, 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne avec une opacité équivalente à 0,5 Mc Farland, ainsi l'étalon doit présenter une densité optique (DO) allant de 0,08 à 0,11 à 625 nm (Standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999).

b) Ensemencement

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage selon la méthode de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009) :

- Plonger un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne et le laisser s'imbiber, le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de gélose nutritive dont l'épaisseur de la gélose est de 4 mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

c) Préparation des disques d'extraits

À l'aide d'une pince stérile, des disques en papier filtre de 6 mm de diamètre préalablement stérilisés (autoclavés) ont été imbibés de 100µl de chaque extrait, laissés sécher et par la suite aseptiquement déposés sur la surface du milieu de culture. Incubation à 37° C

pendant 24h. À l'aide d'une règle, des mesures des diamètres des zones d'inhibition autour des disques chargés d'extraits ont été réalisées.

I-2-6.Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

La CMI représente la concentration la plus basse de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après une incubation de 18 à 24 heures (**Toty et al.,2013**).

Une série de tubes à essai contenant 5 ml d'eau peptonée ont été préparés, à chaque tube ont été ajoutés 100µl de l'extrait méthanolique de chacune des deux variétés avec les différentes concentrations de 0,1-0,2-0,4-0,6-0,8-10-20-40-60-80-100 mg/ml ; puis 100µl de la suspension bactérienne a été ajoutée à chaque tube. Le tout bien homogénéisé et incubé à 37 °C pendant 24h. Après incubation, la lecture a été effectuée par visualisation de la croissance à l'œil nu(présence ou absence d'un trouble).

I-2-7.Détermination de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration la plus faible des substances bioactives qui laisse au plus 0,01% de germes vivants (**Toty et al., 2013**).

Un prélèvement de 100 µl a été effectué dans chacun des tubes qui ne présentent aucune culture visible, étalés sur milieu gélosé et les boîtes incubées à 37 C° pendant 24h. La lecture a été effectuée après incubation et la détermination du résultat par la présence ou l'absence de la croissance (colonies) des germes pathogènes testés.

I-2-8. Dosage biochimique des molécules

I-2-8-1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu selon le protocole modifié décrit par (**Singleton et Rossi, 1965 ; Mansour et al., 2013**),0,5 ml de l'extrait méthanolique ont été mélangés avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium 7,5 %. Après 5 minutes, 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été laissé à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 30 minutes ; l'absorbance a été ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

I-2-8-2.Dosage des flavonoïdes

La méthode colométrique de trichloride d'aluminium a été utilisée pour la détermination du taux des flavonoïdes, à partir du protocole décrit par **(Bachiri et al., 2016)**. 1 ml d'une solution de trichloride d'aluminium à 2 % ont été ajoutés à 1 ml d'extrait méthanolique, puis laissé pendant 40 min à température ambiante ; l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 415 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

I-2-8-3. Dosage des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ont été dosés selon la méthode colorimétrique de **Willis et Allen (1998)** modifiée. 0,3 ml d'extrait méthanolique dilué par 1,5 ml d'eau distillée et 1 ml de KIO₃ à 2,5%. L'absorbance a été mesurée à 550 nm après 30 min d'incubation. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II-1. Résultats des tests de l'activité antimicrobienne des extraits de poudre

II-1-1. Résultats de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la variété 1

II-1-1-1. Activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 de extraits en utilisant un seul solvant et un mélange de solvants de la variété 1 sont représentés dans les histogrammes suivants :

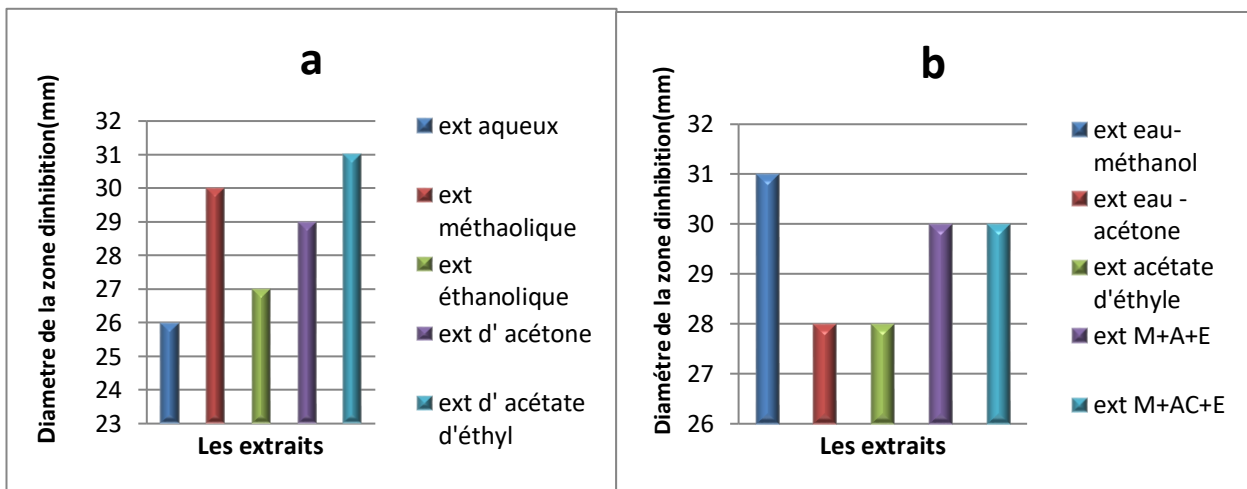


Figure 1 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 avec un solvant (a) et mélanges de solvants (b) vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923.

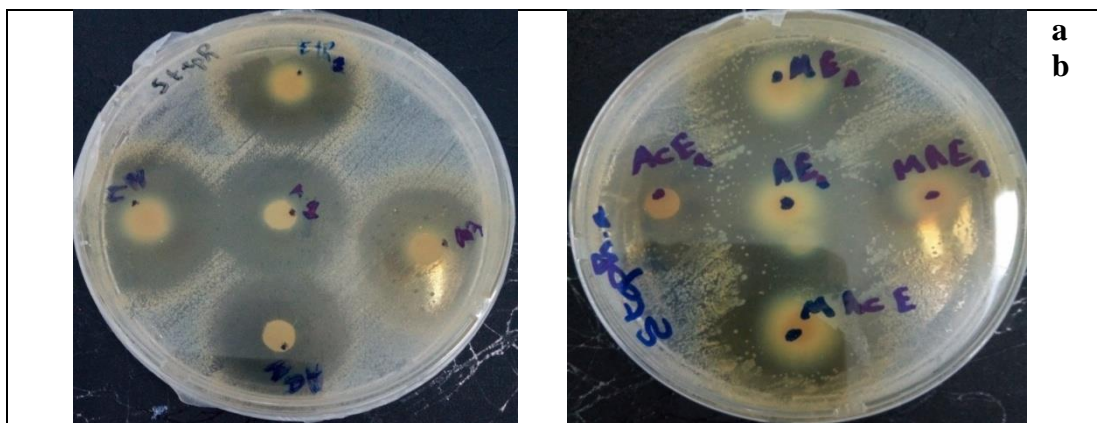


Figure 2 : Activité des extraits de la variété 1 avec un solvant (a) et de mélanges solvant (b) vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923.



Figure 3 : Résultats de l'effet du méthanol (témoin) sur *S. aureus*.

II-1-1-2. Activité vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *E. faecalis* des extraits de la variété 1 sont représentés dans les histogrammes suivants :

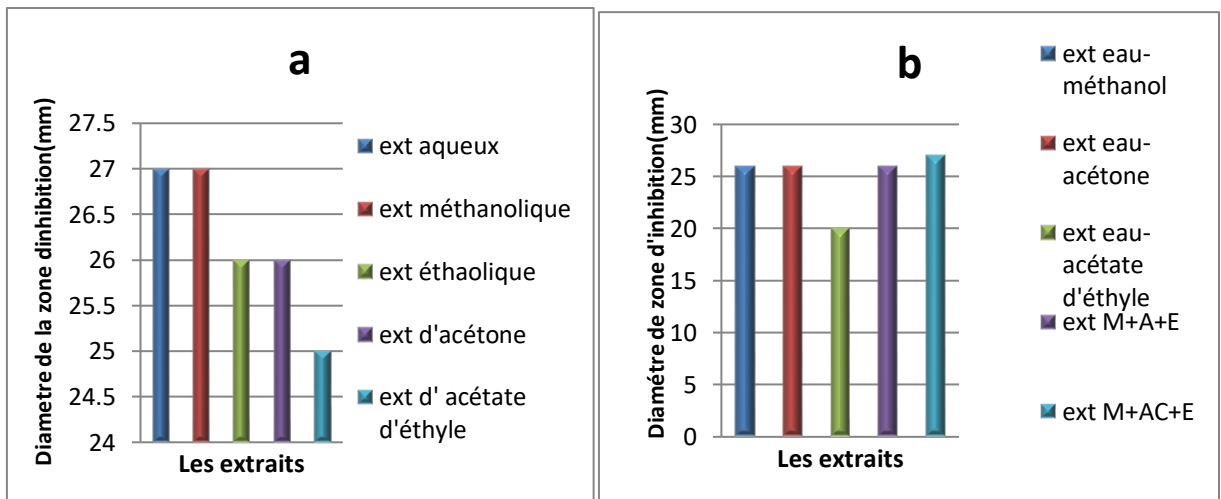


Figure 4 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de *E. faecalis*.

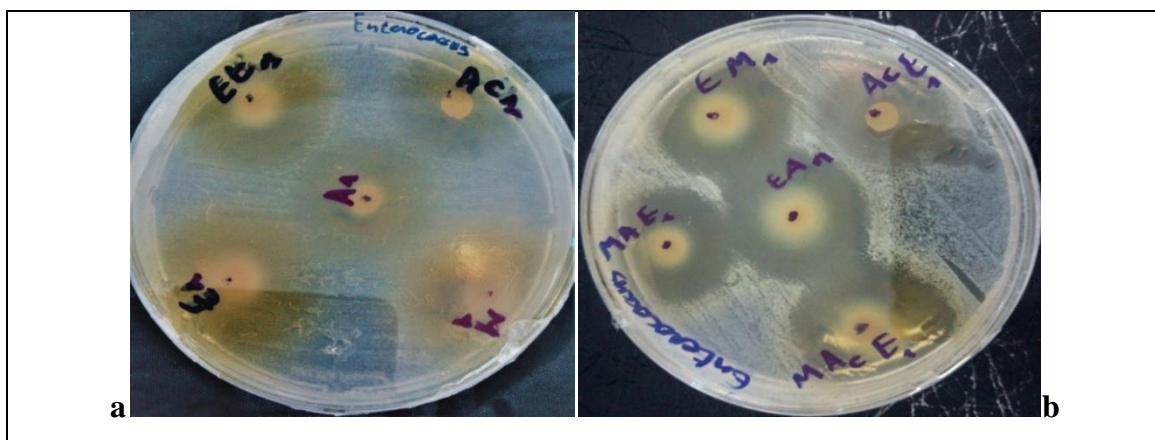


Figure 5 : Activité antibactérienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de *E. faecalis*.

II-1-1-3. Activité vis-à-vis de *Escherichia coli*

La souche *E. coli* ATCC25922 a montré une résistance à tous les extraits de la variété 1.

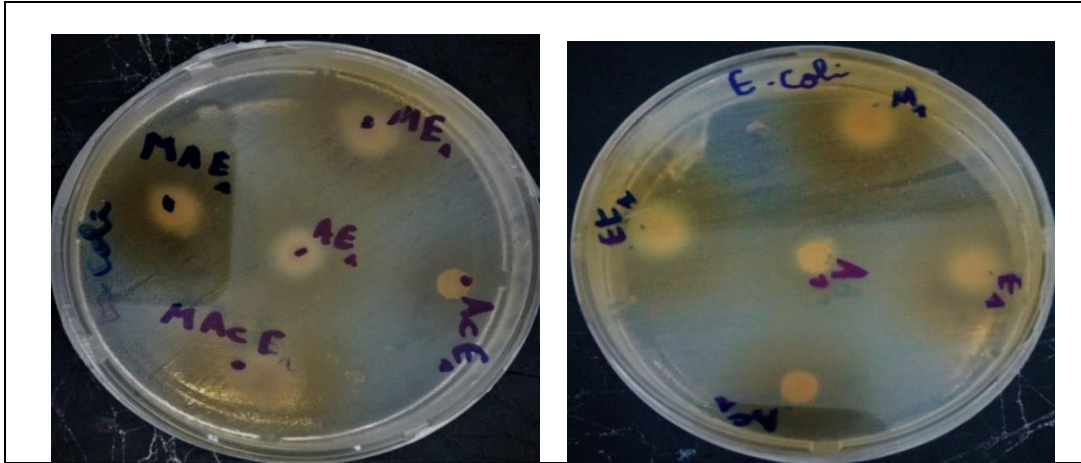


Figure 6 :Activité antibactérienne des extraits de la variété 1 vis-à-vis de *E. coli* ATCC25922

II-1-1-4. Activité vis-à-vis de *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Candida albicans* des extraits de la variété 1 sont représentés dans les histogrammes suivants :

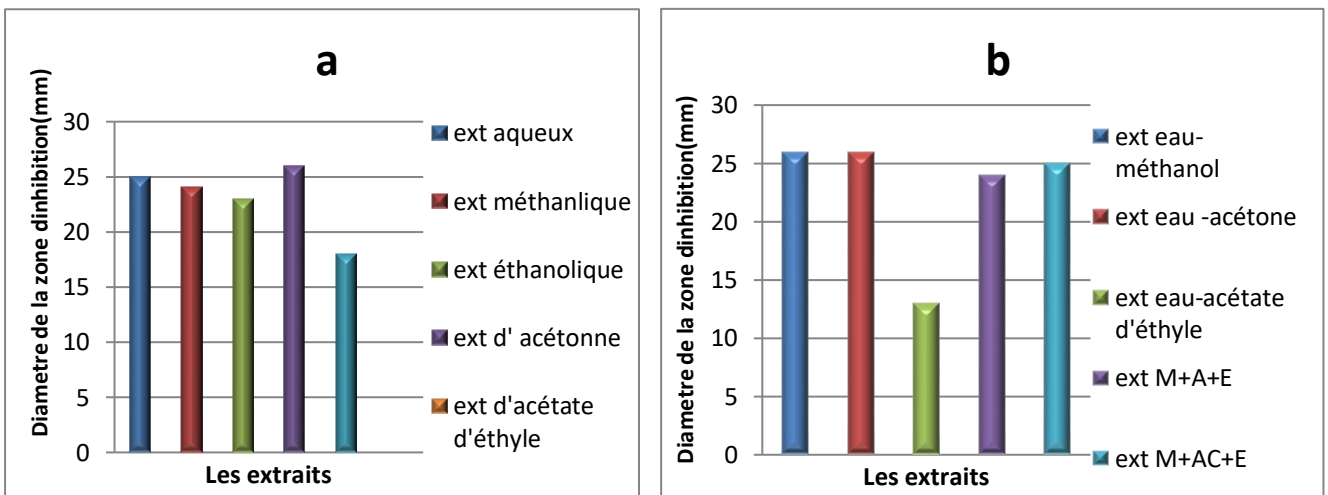


Figure 7 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de *Candida albicans*.

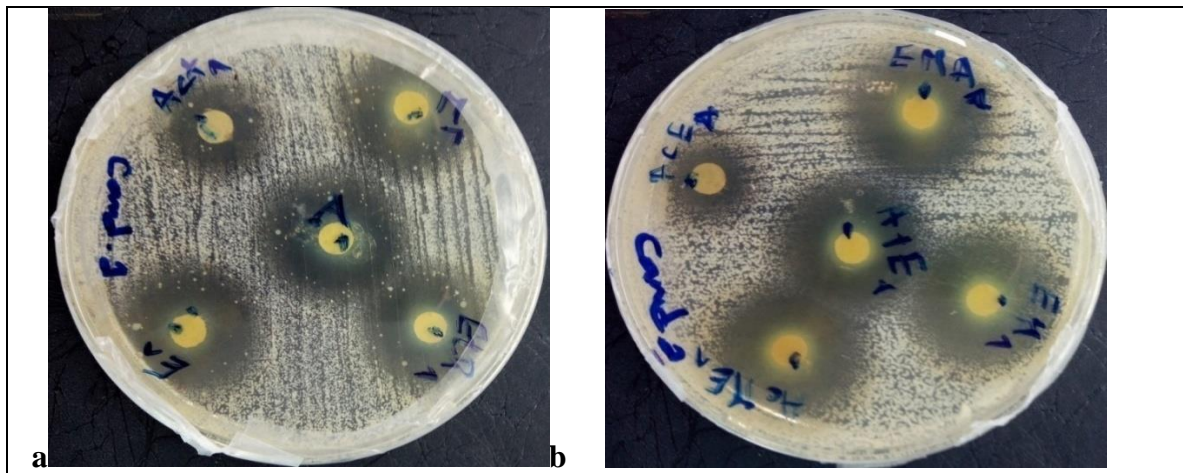


Figure 8 : Activité des extraits de la variété 1 (a) avec un solvant (b) et mélanges de solvants vis-à-vis de *Candida albicans*.

II-1-2. Résultats de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la variété 2

II-1-2-1. Activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 des extraits avec un seul solvant et avec un mélange de solvants de la variété 2 sont représentés dans les histogrammes suivants:

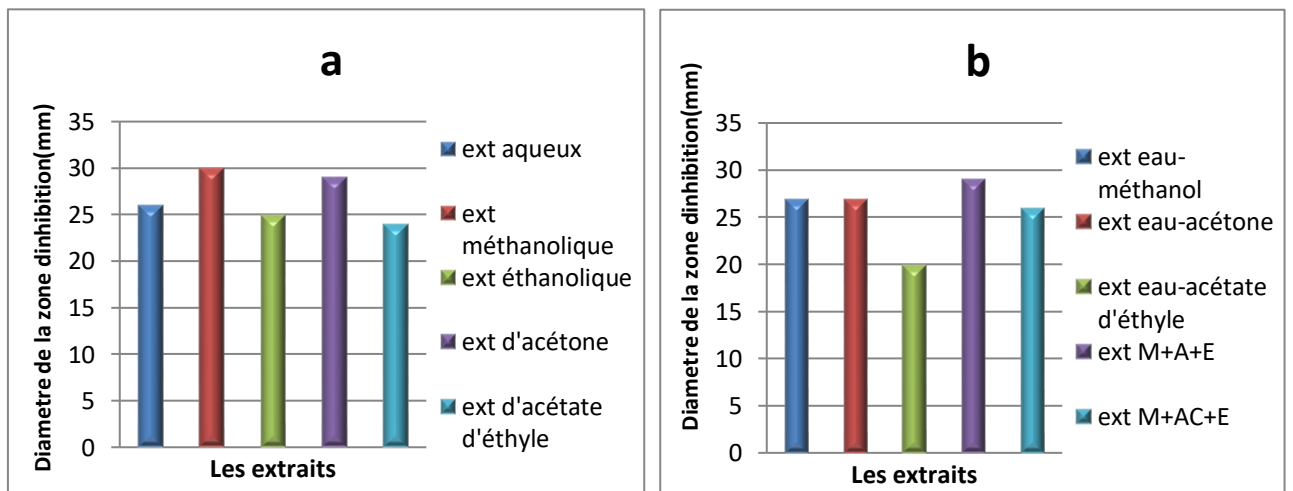


Figure 9 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 2 avec un solvant (a) et de mélanges solvant (b) vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923.

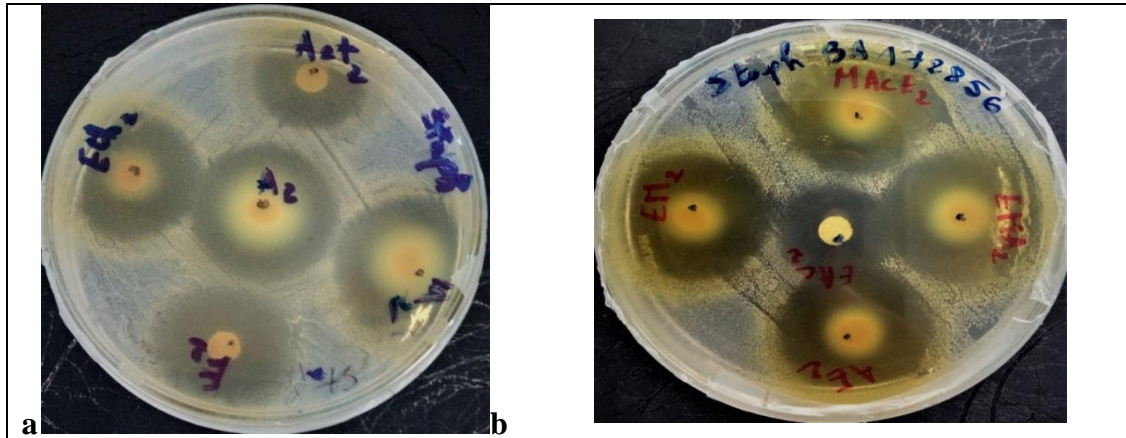


Figure 10 : Activité des extraits de la variété 2 avec un solvant (a) et mélanges de solvant (b) vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923.

II-1-2-2. Activité vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *E. faecalis* des extraits avec un seul solvant et avec un mélange de solvants de la variété 2 sont représentés dans les histogrammes suivants :

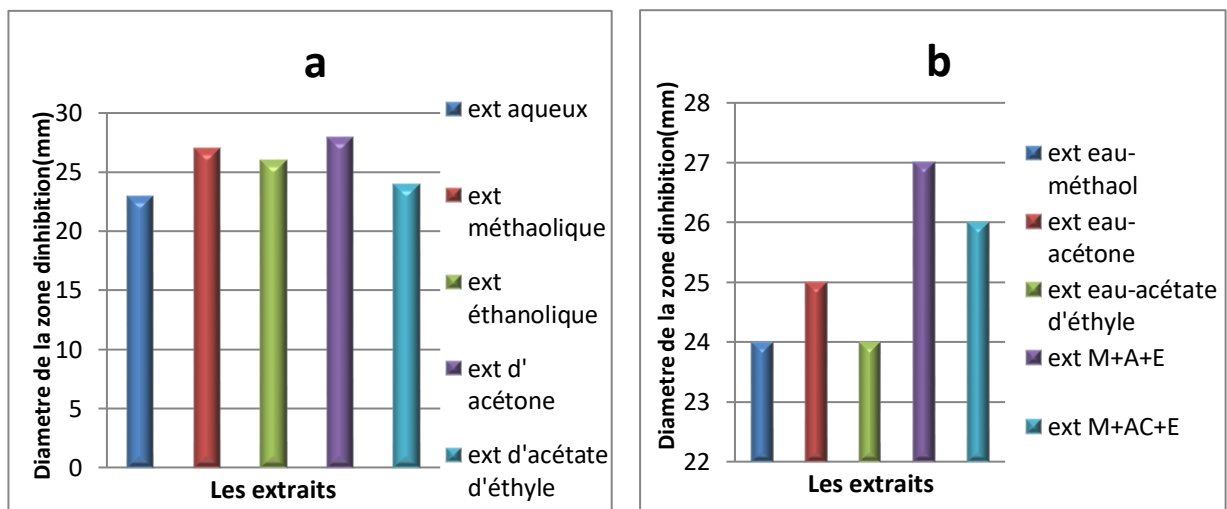


Figure 11 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de *E. faecalis*.

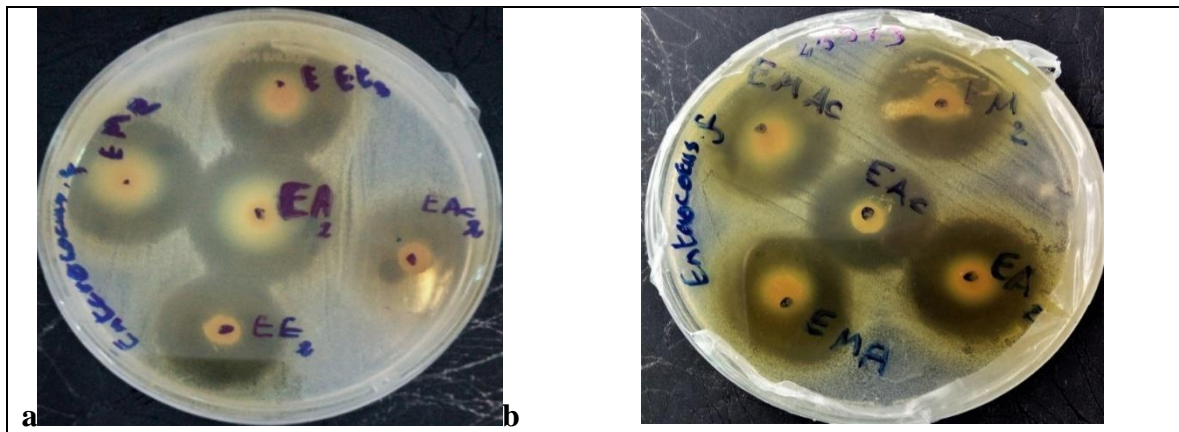


Figure 12 : Activité des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de *E. faecalis*.

II-1-2-3. Activité vis-à-vis de *Escherichia coli*

La souche *E. coli* ATCC25922 a montré une résistance à tous les extraits de la variété 2.

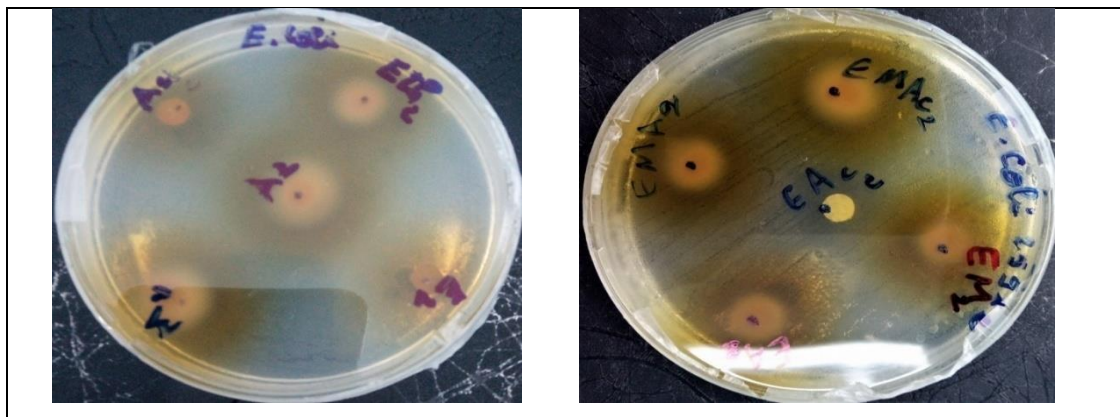


Figure 13 : Activité des extraits de la variété 2 vis-à-vis de *E. coli* ATCC25922.

II-1-2-4. Activité vis-à-vis de *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Candida albicans* des extraits avec un seul solvant et avec un mélange de solvants de la variété 2 sont représentés dans les histogrammes suivants :

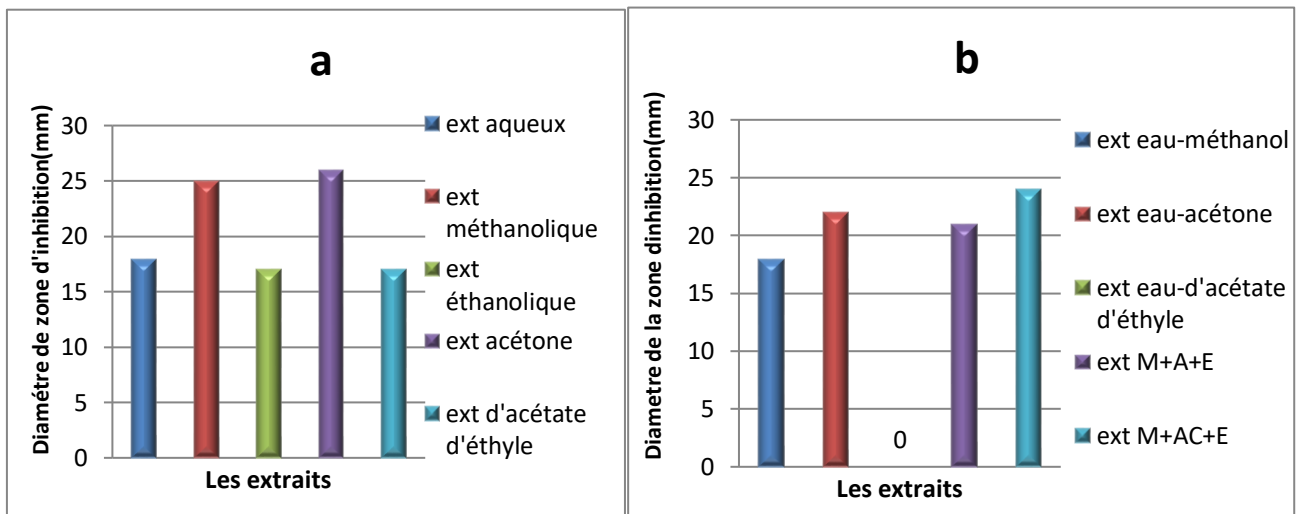


Figure 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de *Candida albicans*.

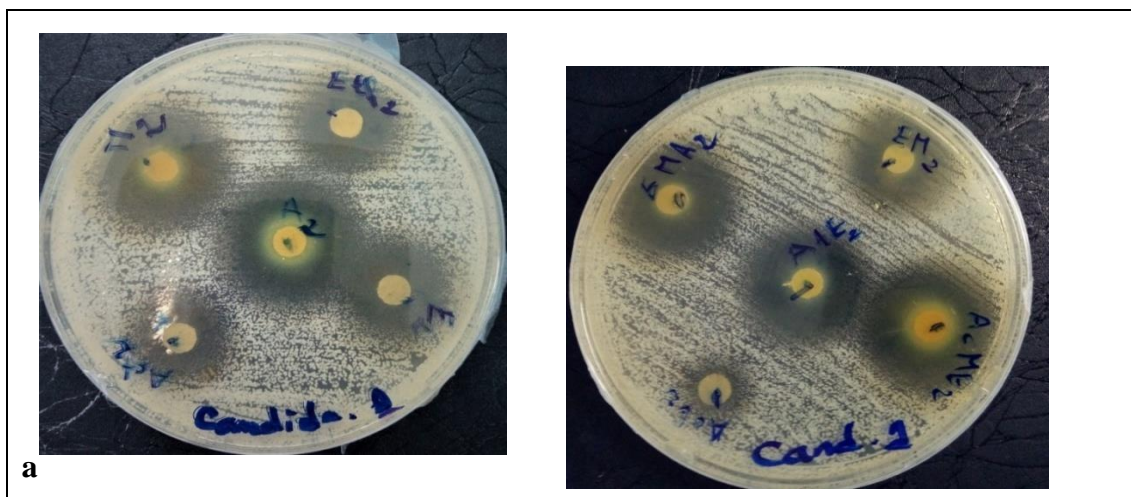


Figure 15 : Activité des extraits de la variété 2 (a) avec un solvant (b) avec mélanges de solvants vis-à-vis de *Candida albicans*.

Selon les résultats obtenus, tous les extraits ont montré une activité sur les souches testées : *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, sauf vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC25922 qui a montré une résistance à tous les extraits. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'extrait méthanolique avec des zones d'inhibition de 24 à 30 mm de diamètre, puis l'extrait acétonique avec 26-29mm, l'acétate d'éthyle avec 17-31mm suivi par l'extrait aqueux avec 18-27mm, et l'extrait éthanolique avec 17-27mm.

Pour l'extrait méthanolique nos résultats corroborent avec ceux de **Abdollahzadeh et al., 2011** qui étaient contre des pathogènes oraux et ceux de **Mansour et al., 2013** qui ont

évalué l'activité de 21 variétés de grenades tunisiennes, les résultats obtenus des zones d'inhibition allant de 14 à 34 mm de diamètre contre les souches testées *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella typhimurium* ATCC1408, *Escherichia coli* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 et *Staphylococcus epidermidis* CIP106510.

Nuamsetti et al., 2012 ont obtenus résultats similaires aux nôtres pour l'extrait éthanolique et aqueux. **Ibrahium, 2010** ont obtenu des résultats avec des zones d'inhibition de 11 à 25,7 mm de diamètres avec l'extrait éthanolique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* à différentes concentrations.

Les résultats des travaux de **Al-Zoreky, 2009**, leurs extraits aqueux et acétonique n'ont montré aucune activité.

Nos résultats corroborent avec ceux de **Karthikeyan et Vidya, 2019** qui ont obtenu des activités vis-à-vis des germes à Gram positif. *Escherichia coli* ATCC25922a montré une résistance à tous les extraits, ce qui corrobore avec les résultats de **Kanatt et al., 2010** avec *Escherichia coli* JM109 ; et ceux de **Opara et al., 2009** et **Benjabeur, 2012**. Les bactéries à Gram négatif montrent plus de résistance à la plupart des extraits des plantes (**Kanatt et al., 2009**) cela est dû à la présence de la membrane externe dans leur paroi. Tandis que (**Balaban et al., 2022**) ont obtenu une zone d'inhibition de moins de 25 mm et **Orak et al., 2011** une zone de 33 mm vis à vis de *E. coli* ATCC 25922 avec l'extrait aqueux. Pareil pour les résultats de **Mansour et al., 2013** avec *E. coli* ATCC25923 et ceux de **Ibrahium, 2010**, **Karthikeyan et Vidya, 2019** ; **Nuamsetti et al., 2012**.

On a noté une diminution remarquable de l'activité de l'extrait eau-acétate d'éthyle par rapport à l'activité de l'acétate d'éthyle seul, ce qui peut être expliqué par la différence de polarité et la faible miscibilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau. Une légère diminution de l'activité de l'extrait de mélange eau-méthanol et eau-acétone. Tandis que le mélange eau-méthanol et acétate d'éthyle donne un très bon résultat, pareil pour le mélange eau-méthanol et acétone.

La procédure d'extraction est impactée par divers facteurs tels que : la composition chimique de ces composés, la méthode d'extraction employée, la taille des particules d'échantillon et le délai d'extraction (**Telli et al., 2010**). La quantité de polyphénols récupérée des matières végétales est déterminée par la capacité des composés phénoliques à se dissoudre dans le solvant utilisé pour l'extraction. De plus, l'importance de la polarité des solvants sera essentielle pour accroître la solubilité phénolique (**Naczka et Shahidi, 2006**). Ainsi, il est complexe de concevoir une méthode d'extraction standard qui convient à l'extraction de tous les phénols végétaux (**Allothman et al., 2009**).

Les extraits testés ont montré une bonne inhibition de *Candida albicans* avec des zones allant de 13 à 26 mm de diamètre sauf l'extrait eau-acétate d'éthyle de la variété 2 qui n'a montré aucune activité. Nos résultats sont similaires à ceux de **Balaban et al., 2022** qui ont obtenu des zones d'inhibition allant de 8 à 25 mm. A l'inverse des résultats de **Abdollahzadeh et al., 2011** et de **Bendjabeur, 2012** ; leurs extraits à différentes concentrations n'ont aucune activité vis-à-vis de *Candida albicans*.

II-2. Résultats de l'influence du temps de macération sur l'extraction molécules bioactives et l'activité antimicrobienne des deux variétés

II-2-1. Activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 des extraits après macération à 30min, 3h, 24h et 72h de la variété 1 et 2 sont représentés dans les histogrammes suivants :

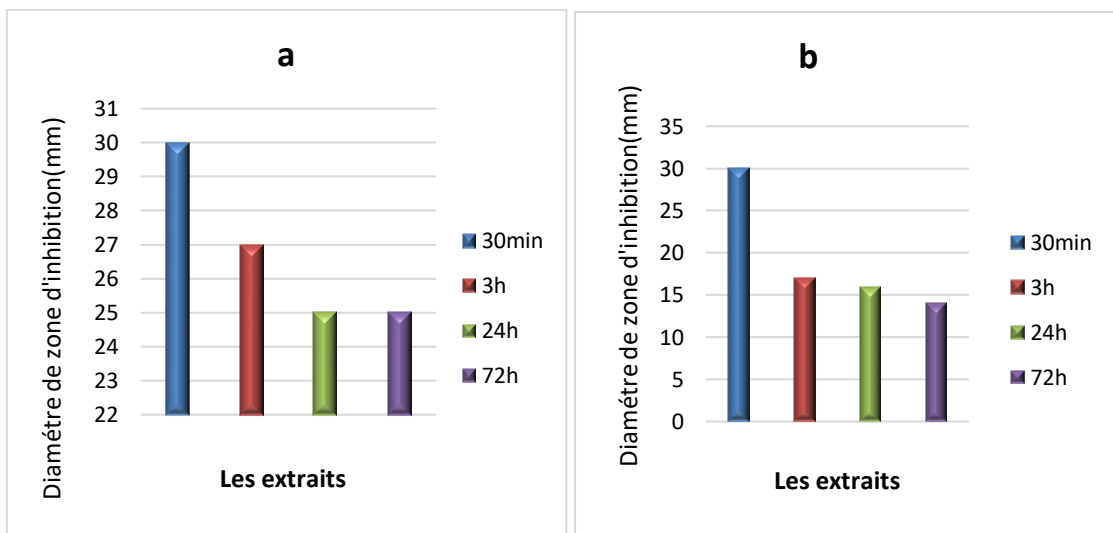


Figure 16 : Résultats de l'influence du temps sur l'extraction et l'activité vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 variété 1 (a) et variété 2 (b).

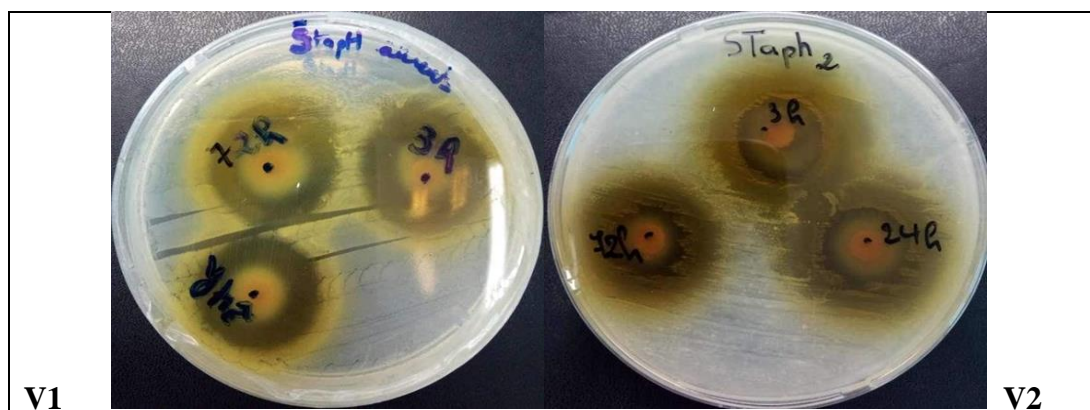


Figure17:Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de *S. aureus*ATCC25923 de la variété 1 et 2.

II-2-2. Activité vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *E. faecalis* des extraits après macération à 30min, 3h, 24h et 72h des deux variétés sont représentés dans les histogrammes suivants :

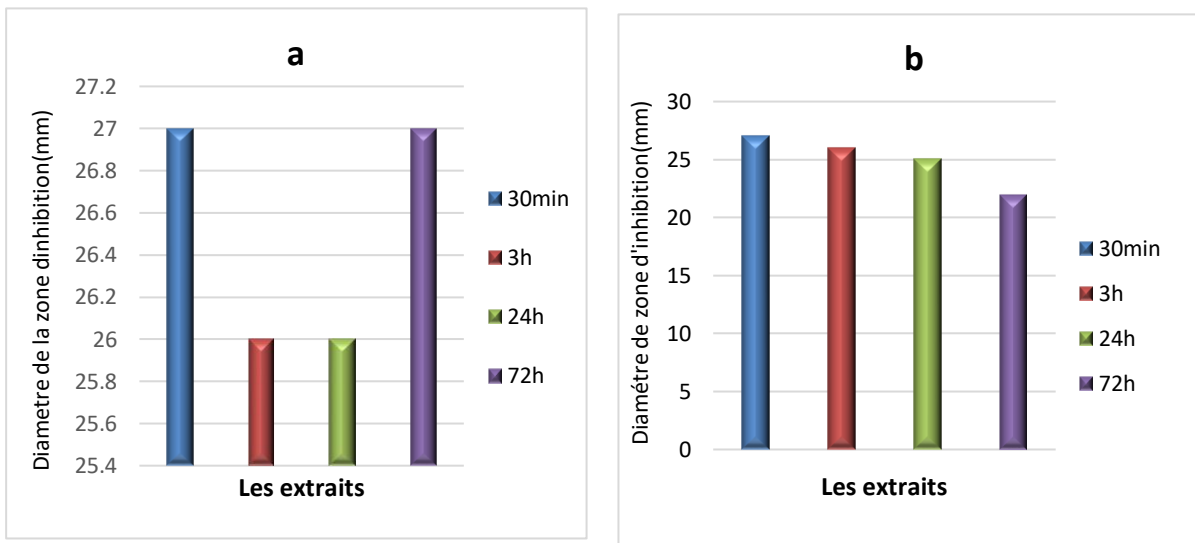


Figure 18 : Résultats de l'influence du temps sur l'extraction et l'activité vis-à-vis de *E. faecalis* variété 1 (a) et variété 2 (b).

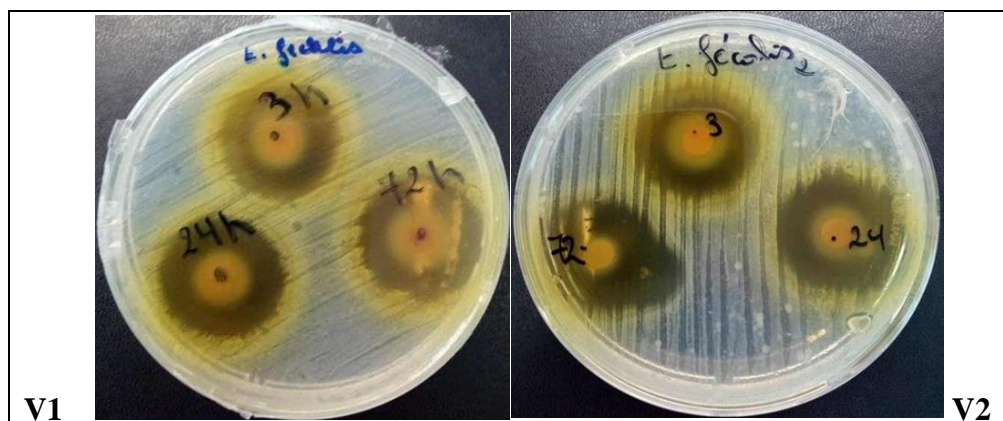


Figure 19 :Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de *E. faecalis* de la variété 1 et 2.

II-2-3. Activité vis-à-vis de *Escherichia coli*.

La souche *E. coli*ATCC25922 a montré une résistance à tous les extraits des deux variétés.

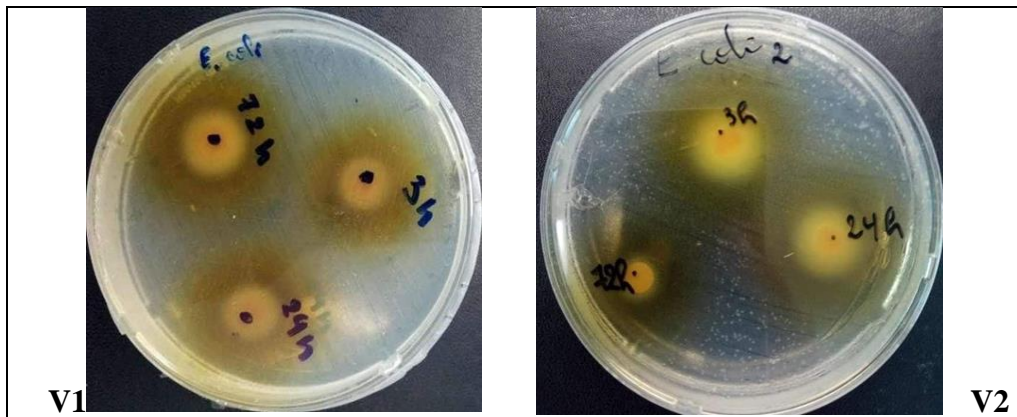


Figure 20 : Activité des extraits en fonction du temps vis-à-vis de *E. coli* ATCC25922 des extraits de la variété 1 et 2.

II-2-4. Activité vis-à-vis de *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Candida albicans* des extraits après macération à 30min, 3h, 24h et 72h des deux variétés sont représentés dans les histogrammes suivants :

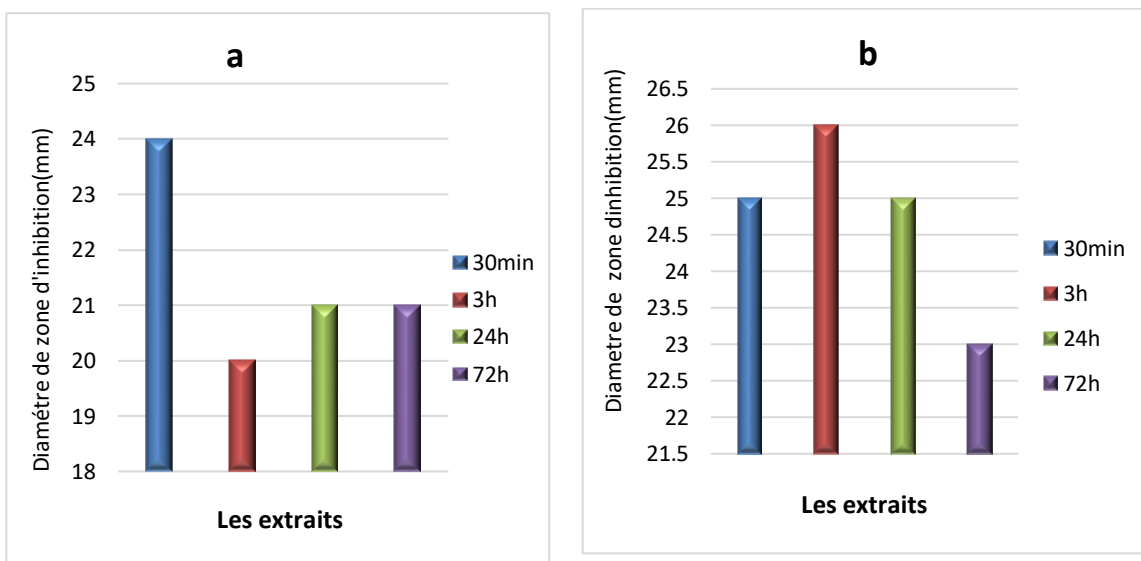


Figure 21 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de la variété 1 et 2 vis-à-vis de *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par différents temps de macération (30 min, 3h-24h et 72h) indiquent une diminution du diamètre des zones d'inhibition avec le temps. Les meilleurs résultats ont été obtenus à 30 minutes.

Les résultats du dosage phytochimique des polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tannins ont montré une diminution en teneurs en polyphénols et en flavonoïdes avec la

prolongation du temps de macération pour les deux variétés, et une légère diminution de la teneur en tannins hydrolysables, cela peut expliquer la baisse d'activité antimicrobienne.

Nos résultats corroborent avec ceux de **Zamet *al.*, 2012** qui ont obtenu une dégradation rapide des polyphénols et proanthocyanidines de l'écorce de grenade dans un temps supérieur à 30 minutes, le meilleur rendement était dans un intervalle de 5 à 20 minutes. Pareil pour les résultats de **Jia *et al.*, 2009** et **Boussalah, 2010** qui montrent que le meilleur rendement est obtenu après 1h-1h30min, et une diminution de la teneur en polyphénols a été observée après deux heures, ces résultats ont été obtenus au cours de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade. Cette diminution de la teneur en polyphénols peut être expliquée par l'oxydation des composés phénoliques au cours du temps (**Nazck et Shahidi, 2006 ; Druzynska *et al.*, 2007**).

II-3. Résultats d'extraction par infusion et décoction

II-3-1. Activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 des extraits par infusion et décoction des deux variétés sont représentés dans l'histogramme suivant :

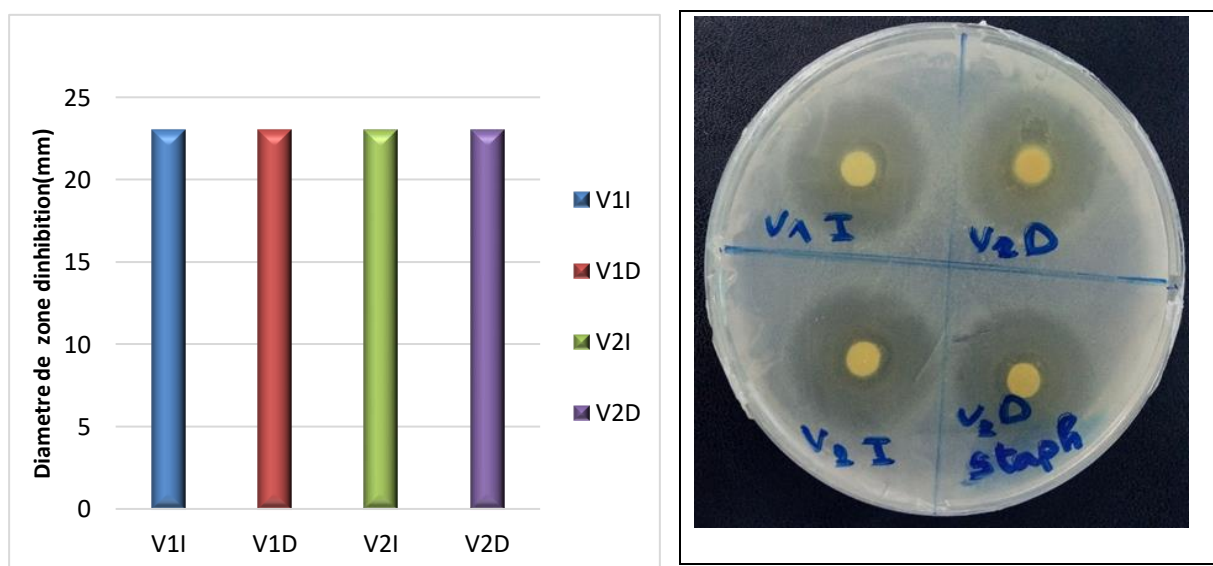


Figure 22 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923.

II-3-2. Activité vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *E. faecalis* BA2856 des extraits par infusion et par décoction des deux variétés sont représentés dans l'histogramme suivant :

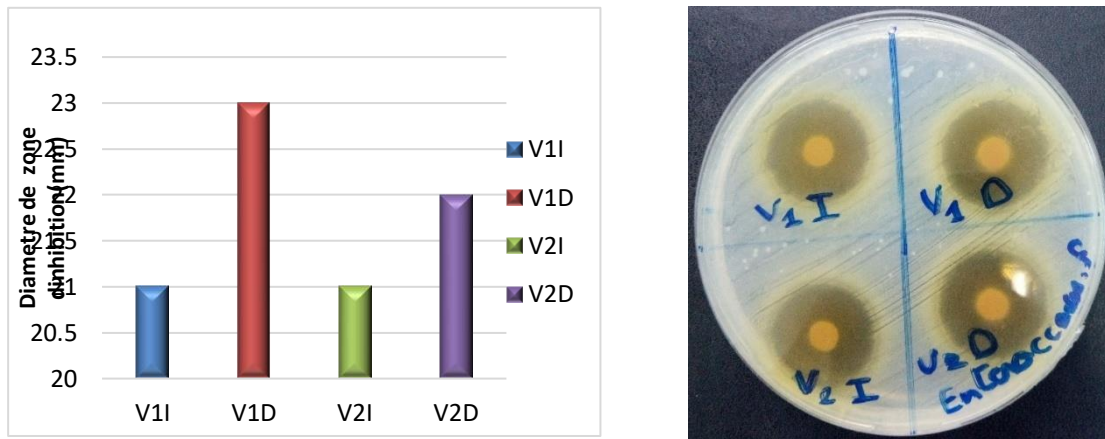


Figure 23 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de *E. faecalis*.

II-3-3. Activité vis-à-vis *Candida albicans*

Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Candida albicans* des extraits par infusion et par décoction des deux variétés sont représentés dans l'histogramme suivant :

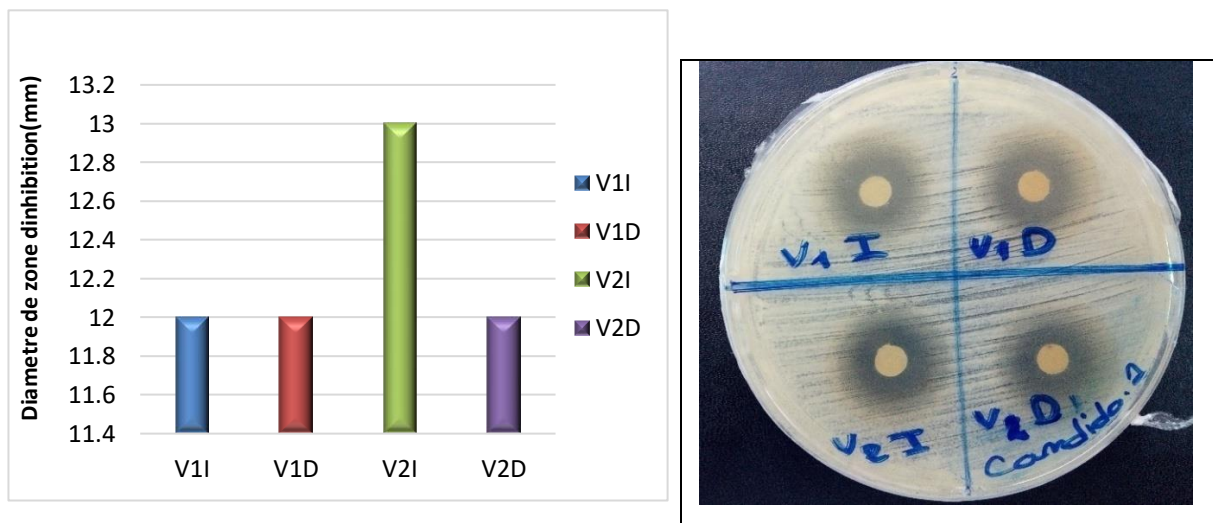


Figure 24: Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de *Candida albicans*.

II-3-4-Activité vis-à-vis de *Escherichia coli*

La souche *E. coli* ATCC25922 a montré une résistance aux extraits par infusion et décoction des deux variétés 1 et 2.

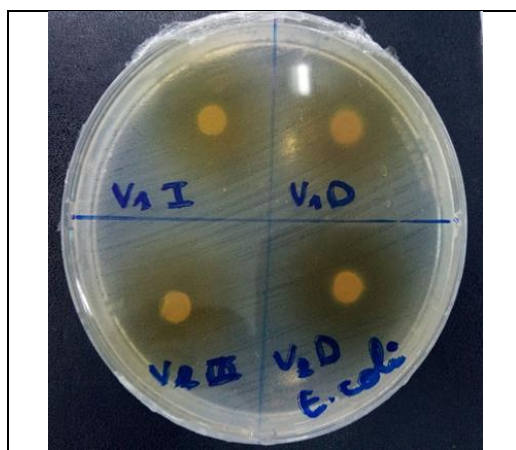


Figure 25 :Activité antibactérienne des extraits par infusion et décoction vis-à-vis de *E. coli* ATCC25922.

Les extraits obtenus par infusion et décoction pour les deux variétés présentent des diamètres de zones d'inhibition proches. Nuamsetti et al.,2012 ont montré que l'extrait d'eau bouillante présente une activité similaire aux activités des autres extraits éthanolique, acétonique, ce qui veut dire que l'extrait est thermostable, ce qui correspond à nos résultats, même effet des extraits à l'eau bouillante et à l'eau distillée.

La quantité en polyphénols récupérée des matières végétales est déterminée par la capacité des composés phénoliques à se dissoudre dans le solvant utilisé pour l'extraction. De plus, l'importance de la polarité des solvants sera essentielle pour accroître la solubilité phénolique (Naczki et Shahidi, 2006). Ainsi, il est complexe de concevoir une méthode d'extraction standard qui convient à l'extraction de tous les phénols végétaux Allothman,2009.

II-4. Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB

Les résultats de la détermination de la CMI et de la CMB basés sur la charge bactérienne dans le milieu liquide et sur la densité optique (DO) de chaque tube pour les deux variétés sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau II : Résultats de la détermination de la CMI et de la CMB

Souches	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	80 mg /ml	100mg/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	20 mg/ml	100mg/ml
<i>Candida albicans</i>	4mg/ml (80 mg/ml)	100mg/ml

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide. À cause de la couleur et de la turbidité de l'extrait, il était difficile de déterminer la CMI visuellement. Selon (Nuamsetti et al., 2012) on prélève 100 μ l de chaque tube étalé sur la surface de gélose nutritive. Les résultats de détermination de la CMI sont basés sur la charge bactérienne dans le milieu solide et sur la densité optique (DO) de chaque tube des deux variétés. Les résultats de la détermination de la CMB après étalement de 100 μ l de la suspension des tubes ne montrant aucune croissance visible sont présentés sur la figure 26.

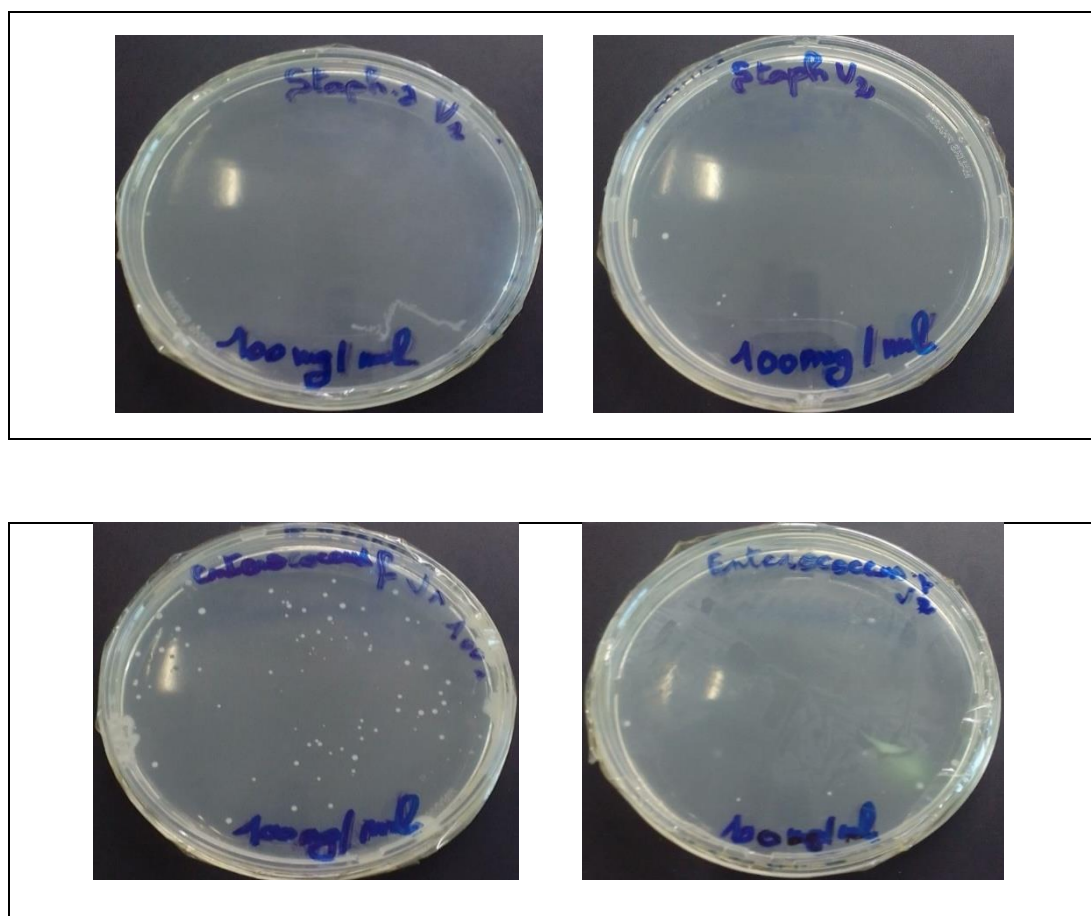


Figure 26 : Résultats de la détermination de la CMB pour les deux variétés

II-5. Résultats du dosage chimique des molécules

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de l'échantillon (mg EAG/g Ps).

La teneur en polyphénols de la variété 1 était de 168,28 mg EAG/g Ps, tandis que celle de la variété 2 était de 199 mg EAG/g Ps. Selon **Hasnaoui et al., 2014** la teneur en polyphénols varie en fonction de la variété de grenade. Cela peut-être dû aussi à la présence d'anthocyanidines, responsables de la couleur des grenades rouge, jaune...

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids sec de nos échantillons ($\mu\text{g EQ/g Ps}$). La teneur en flavonoïdes de la variété 1 était de $59,96 \mu\text{g EQ/g Ps}$ et la variété 2 de $48,68 \mu\text{g EQ/g Ps}$.

La quantité des tanins hydrolysables a été rapportée en microgramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de poids secs de nos échantillons ($\mu\text{g EAT/g Ps}$). La teneur en tanins de la variété 1 est légèrement supérieure de celle de la variété 2 qui sont de $0,44 \mu\text{g EAT/g Ps}$ et $0,39 \mu\text{g EAT/g Ps}$, respectivement.

Les phénols sont un ensemble hétérogène de substances organiques dont la qualité et la quantité diffèrent selon plusieurs facteurs. La composition en polyphénols totaux varie selon le type de cultivar et les différentes parties du fruit, la région de culture, le climat, la maturation et les conditions de conservation. Cette variation en polyphénols est due aussi aux méthodes d'extraction, aux conditions environnementales et à la température d'extraction (**Doukani, 2018 ; Jalal et al., 2018**).

Conclusion

Conclusion

L'écorce de grenade *Punica granatum* L. est une source naturelle de nouvelles molécules bioactives ayant des activités biologiques différentes, parmi elles l'activité antimicrobienne. Ces molécules peuvent être utilisées dans plusieurs domaines pharmaceutiques pour leurs propriétés antioxydantes, remplacer les médicaments synthétiques ; cosmétique, agroalimentaire, la conservation des aliments.

Lors de la présente étude, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'écorce de deux variétés de grenade *Punica granatum* L, l'extraction a été faite par le méthanol, l'eau distillée, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, et différents mélanges et deux extraits aqueux obtenus par infusion et décoction ont été testés sur quatre souches *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC25922 et la levure *Candida albicans*. Tous les extraits ont montré une forte activité vis-à-vis des germes testés sauf sur *E. coli* qui a montré une résistance à tous les extraits.

La meilleure activité a été obtenue avec l'extrait méthanolique des deux variétés sur les bactéries à Gram positif et l'extrait acétonique des deux variétés sur *Candida albicans*.

La CMI déterminée pour l'extrait méthanolique à différentes concentrations montre que la CMI de *Staphylococcus aureus* était 80 mg/ml, 20 mg/ml pour *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* à 4mg/ml et 80mg/ml (confusion !). La CMB était de 100 mg/ml pour toutes les souches.

Les extraits obtenus par macération ont montré une meilleure efficacité comparée aux extraits par décoction et infusion qui présentent une activité similaire ce qui indique que l'extrait est thermostable. On a noté que le temps de macération a une influence sur les molécules bioactives par diminution de teneur en polyphénols totaux avec la prolongation de temps de macération.

Les deux variétés présentent une activité antimicrobienne similaire. Selon les résultats de l'étude phytochimique obtenus par dosage des molécules, les deux variétés sont différentes dans leur composition, avec une teneur de polyphénols totaux élevée pour la variété 2 et une teneur en flavonoïdes et tannins élevée pour la variété 1.

D'après les résultats de cette étude, nous concluons que l'écorce de *Punica granatum* L. est une excellente source de molécules bioactives à activité antimicrobienne.

Les références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdollahzadeh S. H., Mashouf R. Y., Mortazavi H., Moghaddam M. H., Roozbahani N. & Vahedi M. (2011).Antibacterial and antifungal activities of Punica granatum peel extracts against oral pathogens. *Journal of Dentistry*8(1), 1.

Alothman M., Bhat R., & Karim A. A. (2009).Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry* 115, 785-788.

Al-Zoreky N. S. (2009).Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology* 134(3), 244-248.

Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399(10325): P629-655. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Bachiri L., Echchegadda G., Ibjbijen J. & Nassiri, L. (2016). Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*12(30), 313-333.

Balaban M., Koç C., Sar T., & Akbas M. Y. (2022). Screening for bioactive compound rich pomegranate peel extracts and their antimicrobial activities: extraction methods for increased antibacterial and antifungal properties. *Johnson Matthey Technology Review* 66(1), 81-89.

Bendjabeur S. (2012). *Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade Punica granatum L.) en vue de leur utilisation alimentaire* thèse de doctorat (ENSA).

Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., El amri J., Chakir S. & Alaoui T. (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences* 78:6685 – 6693.

Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F. & Ksouri R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology* 28(12), 1649-1655.

Chandra R., Babu K. D., Jadhav V. T., Jaime A., & Silva T. D. (2010). Origin, history and domestication of pomegranate. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 2, 1-6.

Choi J. G., Kang O. H., Lee Y. S., Chae H. S., Oh Y. C., Brice O. O., ... & Kwon D. Y. (2011). In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011.

Doukani K., Chahda K., Tabak S., & Bouhenni H. (2018). Profil phytochimique et activité anti Helicobacter pylori de la grenade (*PunicagranatumL.*)(fruit et écorce) dans la région de Tiaret. *Algerian Journal of Natural Products* **6**(1), 618-629

Drużyńska B., Stępniewska A. & Wołosiak R. (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **6**(1), 27-36.

Evreinoff V. A. (1957). Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* **4**(3), 124-138.

Hamburger M. & Hostettmann K. (1991). 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**(12), 3864-3874.

Hudzicki J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology* **15**(1), 1-23.

Ibrahium M. I. (2010). Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *World Journal of Agricultural Sciences* **6**(4), 338-344.

Jalal H., Pal M. A., Hamdani H., Rovida M., & Khan N. N. (2018). Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **7**(5), 992-997.

Kanatt S. R., Chander R. & Sharma A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International journal of food science & technology* **45**(2), 216-222.

Karthikeyan G. & Vidya A. K. (2019). Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activity of pomegranate peel. *Life Science Informatics Publications* **5**(1), 218.

Kupnik K., Primožič M., Vasic K., Knez Ž. & Leitgeb M. (2021). A comprehensive study of the antibacterial activity of bioactive juice and extracts from pomegranate (*Punica granatum L.*) peels and seeds. *Plants* **10**(8), 1554.

Mansour E., Khaled A. B., Lachiheb B., Abid M., Bachar K. & Ferchichi A. (2018). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from tunisian pomegranate.

Mphahlele R. R., Fawole O. A., Makunga N. P. & Opara U. L. (2016). Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC complementary and alternative medicine* **16**, 1-12.

Nacz M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **41(5)**, 1523-1542.

Nuamsetti T., Dechayuenyong P. & Tantipaibulvut S. (2012). Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils. *Science Asia* **38(3)**, 319-22.

OMS Antimicrobial Resistance. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (access en 13 Avril 2024). [Antimicrobial resistance \(who.int\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)

Opara L. U., Al-Ani M. R. & Al-Shuaibi Y. S. (2009). Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punicagranatum L.*). *Food and Bioprocess Technology* **2**, 315-321.

Orak H. H., Demirci A. Ş. & Gümüş T. (2011). Antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.* cv.) peel.

Singleton V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **16(3)**, 144-158.

Telli A., Mahboub N. & Boudjeh S. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera L*) variété Ghars.

Toty A., Guessennd N., Bahi C., Kra A., Otokore D. & Dosso M. (2013). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harunganamad agascariensis* sur la croissance de souche multi-résistante. *bulletin de la société Royale des Sciences de Liège*, 12-21.

Valero-Mendoza A. G., Meléndez-Rentería N. P., Chávez-González M. L., Flores-Gallegos A. C., Wong-Paz J. E., Govea-Salas M., ... & Ascacio-Valdés J. A. (2023). The whole pomegranate (*Punica granatum L.*), biological properties and important findings: A review. *Food Chemistry Advances* **2**, 100153.

Wald E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum L.*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat (Faculté de Pharmacie). Université Henri Poincaré - Nancy 1. 158p.

Willis R.B. & Allen P.R. (1998). Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *Annals Biochem.* **123**: 435- 441.

Zam W., Bashour G., Abdel Wahed.W. & Khayata W. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4(3)**, 675-682.

Résumé

La présente étude consiste en l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'écorce de l'espèce *Punica granatum* L., l'extraction a été faite par divers solvants organiques par la méthode de macération, et deux autres extraits aqueux obtenus par infusion et par décoction. Les extraits ont été testés sur deux bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis*, sur une bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC25922 et une levure *Candida albicans*. Des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins hydrolysables ont été réalisés.

Les extraits ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des germes testés sauf *E. coli* qui a montré une résistance à tous les extraits. Une différente composition chimique (polyphénols, flavonoïdes et tanins) a été obtenue pour les deux variétés. A l'issue de cette étude on peut conclure que les écorces de grenade possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes.

Les mots clés : Activités antimicrobiennes, écorce de grenade, extraction, *Punica granatum* L., solvants organiques.

Abstract

The present study involves the evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* L. peels. The extraction was conducted with various organic solvents by maceration method. And two other aqueous extracts were obtained by infusion and decoction. The extracts were tested against two Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis*, and against a Gram –negative bacteria *Escherichia coli* ATCC25922, and against a yeast *Candida albicans*. The total polyphenols, flavonoids, and hydrolysable tannins were quantified.

The all extracts showed antimicrobial activity against the tested germs except for *E. coli*, which showed resistance to all extracts. Different chemical compositions (polyphenols, flavonoids, and tannins) were obtained for both varieties. According to the results obtained with this study, we can conclude that pomegranate peels have interesting antimicrobial properties.

Keywords: Antimicrobial activity, pomegranate peel, extraction, *Punica granatum* L., organic solvents.

ملخص

تنطوي هذه الدراسة على تقييم النشاط المضاد للجراثيم الذي تقوم به قشور نبات *Punica granatum* L. وقد أجريت عملية الاستخلاص بمذيبات عضوية مختلفة من خلال طريقة النقع . وتم الحصول على مستخلصين مائيين آخرين عن طريق الغلي و التسريب وقد اختبرت المستخلصات على بكتيريتين إيجابيتين الغرام *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* و بكتيريا سالبة الغرام *Escherichia coli* ATCC25922 و خميرة *Candida albicans* وقد تم تحديد كمية الليوليفينولات الإجمالية، والفلافونويدات، والتانينات القابلة للتحلل المائي . أظهرت جميع المستخلصات نشاطا مضادا للميكروبات ضد الجراثيم المختبرة باستثناء *E. coli* التي أظهرت مقاومة لكل المستخلصات .

وتم الحصول على تركيبات كيميائية مختلفة (بوليفينول، وفلافونويدات، وتانينات) لكلا النوعين . وفقا للنتائج التي تم الحصول عليها من خلال هذه الدراسة، يمكننا أن نستنتج أن قشر الرمان لها خصائص مثيرة للاهتمام مضادة للميكروبات .
الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للميكروبات، قشر الرمان، والاستخلاص، *Punica granatum* L، المذيبات العضوية.