



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



## *Université Frères Mentouri Constantine 1*

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

### **MASTER**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biochimie Appliquée

### **Thème**

**Evaluation des activités antifongique et antibactérienne des extraits de plantes des genres *Centaurea papposa* rouge et *Punica granatum* L.**

**Soutenu le : 19/09/2021**

**Par :** M<sup>elle</sup> BERDOUDI Asma

M<sup>elle</sup> Aouissat Souha Ihssene

#### **Jury d'évaluation :**

**M<sup>me</sup> MOSBAH Asma**

MCA

Univ. Constantine 1

**Présidente**

**M<sup>me</sup>. BELLIL Inès**

MCA

Univ. Constantine 1

**Encadrante**

**M<sup>me</sup> BENCHIHEUB Meriem**

MCA

Univ. Constantine 1

**Examinatrice**

**Année universitaire 2020/2021**

# Remerciement

Nous commençons par remercier dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage, la volonté et l'amour du savoir pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme « **BELLIL Ines** » maître de conférences (Classe A) à la faculté SNV, Université Frères Mentouri – Constantine 1, d'avoir accepté de nous encadrer, de nous avoir proposé ce travail et de n'avoir jamais lésiné à nous prodiguer conseils et assistance pour la bonne conception et l'achèvement de celui-ci. Nous vous en sommes très reconnaissantes et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

Nous remercions également la doctorante **BENOUCHENNE Djamila** pour ses conseils précieux, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour sa grande patience, sa modestie, sa générosité.

Nous remercions également le docteur **BOUANAKA hamza** pour ses conseils et sa générosité.

Nous remercions également l'examinatrice de ce travail, **MOSBAH Asma**. Maître de Conférences classe A. Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.

On tient à remercier également **BENCHIHEUB Meriem**, Maître de Conférences classe A. pour son précieux

apport dans notre cursus et d'avoir aimablement accepté d'être membre du jury.

C'est une grande opportunité qui nous a été offerte ici afin de remercier nos familles pour avoir toujours été derrière nous. A nos papas et nos mamans pour leur compréhension, leurs conseils, leur amour inconditionnel et leur support moral et intellectuel. A nos frères et soeurs A nos amis qui nous ont toujours soutenus et encouragés.

# Dédicace

♥ Grace a la volonté divine d'Allah notre dieu tout puissant et bien veillant qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédie !

♥ À la chose la plus précieuse que j'ai, à celles qui représentent les femmes du monde ensemble, source d'amour et de tendresse, à celle qui n'a jamais dit non à mes exigences qui peut me supporter dans mes moments les plus difficiles de l'étude, mon très cher mère **Dakiche Samira**.

♥ A la prunelle de mes yeux, l'homme de ma vie, mon modèle, la lumière de mon chemin, le symbole du sacrifice pour notre réussite, mon très cher père **Boukhmis**. Je souhaite que j'aie réalisé l'un de vos rêves par ce modeste travail. Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

♥ A mes meilleurs amis qui je les trouve toujours derrière nous surtout dans les périodes les plus difficiles **Mina** et **Chouchou** je vous aime tellement.

♥ A mes chers frères et soeurs : **Yasser, Youcef, Abdelmalek, Lokmane, Anfel, Hind**

♥ A Ma très chère grand-mère.

♥ A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université

♥ A tous mes collègues de la promotion de Master II Biochimie appliquée (2020-2021) surtout la meilleurs déléguée **Baïche Kenza** pour leur aide et sa patience, A **Abdlehak**, A tous ceux qui ont contribué pour que ce projet soit possible, je vous dit Merci beaucoup.

# Dédicace

Grâce à la volonté divine d'Allah notre Dieu tout puissant j'ai pu réaliser ce modeste travail, que  
je dédiais !

À ma très chères mères oureida pour sa tendresse ses sacrifices, elle qui m'a soutenue et  
encouragé durant ces  
années d'études, Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours qu'elle trouve ici le  
témoignage de ma profonde Reconnaissance.

À mon très cher père Salim ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés  
pour mon éducation et ma formation je ne saurai te remercier.

À mes chers frères : Amine mon bras droit et petit frère Imed

À ma chère tante : Mouni

À Ma chère grand-mère

À ma famille et proche et ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité  
Et à celui qui ont partagé avec moi tous les moments de joie lors de la réalisation de ce travail  
et à ceux qui m'ont chaleureusement supportée et encouragée tout au long de mon parcours

# Liste des Abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Désignation</b>
<b>APG:</b>	Angiosperm Phylogeny Group
<b><i>B.subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>C° :</b>	Degré Celsius
<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CP :</b>	Composés phénoliques
<b>DO :</b>	Densité Optique
<b>DZI :</b>	Diamètre de zone d’Inhibition
<b>E.coli :</b>	Escherichia coli
<b>EAc:</b>	Extrait acétate d’éthyle
<b>EBut:</b>	Extrait butanol
<b>ED:</b>	Eau distillée
<b>EDich:</b>	Extrait dichlorométhane
<b><i>F. cerealis</i></b>	<i>Fusarium cerealis</i>
<b><i>F. culmorum</i></b>	<i>Fusarium culmorum</i>
<b><i>F. oxysporum</i></b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b><i>F:</i></b>	<i>Fusarium</i>
<b>GN :</b>	Gélose nutritive
<b>MEOH:</b>	Méthanol
<b>MH :</b>	Mueller Hinton
<b>NaCl :</b>	Chlorure de sodium
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>P.vulgaris</i></b>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b><i>S.aureus :</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>UFC :</b>	Unité Formant Colonie

## Liste Des Figures

Figure 1: Carte de répartition géographique de la famille des Asteracées .....	4
Figure 2: Types des fleurs des plantes d' <i>Astéraceae</i> .....	5
Figure 3: <i>Centaurea papposa</i> (Coss.) Greuter .....	9
Figure 4: Structure chimiques des composées isolées .....	10
Figure 5: <i>Lythrum salicaria</i> .....	11
Figure 6: Répartition géographique des <i>Lythraceae</i> (en noire).....	11
Figure 7: Arbre de grenadier .....	12
Figure 8: Feuilles du grenadier.....	13
Figure 9: Fleurs du grenadier .....	14
Figure 10: Fruit du grenadier .....	15
Figure 11: Position de <i>Punica granatum</i> L. selon la classification APGII.....	16
Figure 12: Centre d'origine et de diversité des arbres grenadiers cultivées (IV) selon le chercheur Vavilov (1951) .....	17
Figure 13: Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne .....	18
Figure 14: La formule chimique brute d'une fonction phénol (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH).....	23
Figure 15: Les différentes classes des composés phénoliques .....	24
Figure 16: Structure de base d'un flavonoïde .....	26
Figure 17: Structure de base des tanins hydrolysables; (A) l'acide gallique; (B) l'acide éllagallique .....	29
Figure 18: Structure chimique des tanins condensés .....	30
Figure 20: Structure de base des coumarines .....	30
Figure 21: Structure chimique de lignine .....	30
Figure 22: Structure des saponosides .....	31
Figure 23: Quelques exemples des alcaloïdes.....	31
Figure 24: Extraction et fractionnement des métabolites.....	33
Figure 25: <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
Figure 26: <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
Figure 27: <i>Esherichia coli</i> .....	43

Figure 28: <i>Proteus vulgaris</i> .....	45
Figure 29: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
Figure 30: Préparation de milieux de culture .....	46
Figure 31: Préparation des déluitions .....	47
Figure 32: Protocole du test de l'activité antimicrobienne des extraits .....	49
Figure 33: Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques .....	50
Figure 34: Préparation des extraits.....	59
Figure 35: Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion à partir des puits .	60
Figure 36: Activité antibactérienne d'extrait N-butanol de ( <i>Centaurea papposa</i> ).....	61
Figure 37: Activité antibactérienne d'extrait Dichlorométhane de ( <i>Centaurea papposa</i> ) .....	62
Figure 38: Activité antibactérienne de l'extrait Acétate d'ethyl ( <i>Centaurea papposa</i> ) .....	63
Figure 39: Activité antibactérienne de l'extrait Dichlorométhane ( <i>Punica granatum</i> ).....	64
Figure 40: Activité antibactérienne de l'extrait N-butanol ( <i>Punica granatum</i> ) .....	70
Figure 41 : Activité de l'extrait n-butanol vis-à-vis des <i>F. oxysporum, F.cerealis,F.culmorum</i> ..	70
Figure 42 : Activité de l'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis des <i>F. oxysporum, F. cerealis, F. culmorum</i> .....	71
Figure 43 : Activité de l'extrait n-butanol vis-à-vis des <i>F. oxysporum, F. cerealis, F.culmorum</i>	71
Figure 44: Activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Centaurea papposa</i> vis-à-vis de <i>F. culmorum, F. oxysporum, F.cerealis</i> .....	72
Figure 45 : Activité antifongique de l'extrait dichlorométhane de <i>Centaurea papposa</i> . vis-à-vis des <i>F. culmorum, F. oxysporum, F. cerealis</i> .....	73
Figure 46 : Activité antifongique de l'extrait n-butanol de <i>Centaurea papposa</i> . vis-à-vis des <i>F. culmorum, F. oxysporum, F. cerealis</i> .....	74
Figure 47 : Activité antifongique de l'extrait n-butanol de <i>Punica granatum L</i> , vis-à-vis des <i>F. culmorum, F. oxysporum, F. cerealis</i> .....	75
Figure 48 : Effet des différentes concentrations des extraits acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol de <i>Centaurea papposa</i> sur la sensibilité des souches <i>Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Fusarium cerealis</i> .....	7

## *Liste Des Tableaux*

Table 1: Localisation de quelques espèces du genre <i>Centaurea</i> .....	6
Table 2: Effet thérapeutiques des <i>Centaurea</i> .....	8
Table 3: Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie .....	18
Table 4: Les principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque .....	25
Table 5: Principaux acides hydroxycinnamiques .....	25
Table 6: Les principales familles des flavonoïdes .....	27
Table 7: Quelques exemples des différents types de terpénoïdes .....	32
Table 8: Les activités biologiques des composés phénoliques .....	34
Table 9: Souches utilisées et leur classification .....	52
Table 10: Activité antibactérienne d'extract N-butanol de ( <i>Centaurea papposa</i> ) .....	56
Table 11 : Activité antibactérienne d'extract Dichlorométhane ( <i>Centaurea papposa</i> ) .....	57
Table 12: Activité antibactérienne d'extract Acétate d'éthyle de ( <i>Centaurea papposa</i> ).....	58
Table 13: Activité antibactérienne d'extract N-butanol de ( <i>Punica granatum</i> ).....	67
Table 14 : Activité antifongique d'extract dichlorométhane de <i>Centaurea papposa</i> représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.....	68
Table 15 : Activité antifongique de l'extract acétate d'éthyle de <i>Centaurea papposa</i> représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.....	68
Table 16 : Activité antifongique de l'extract n-butanol de <i>Punica granatum</i> L représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.....	69



# Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste des figures

Liste de tableaux

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction ..... 1

## Revue bibliographique

### Chapitre 1: Généralités sur les espèces étudiées

1	Généralités sur La famille des Astéracées .....	3
1.1	Distribution géographique .....	3
1.2	Caractéristiques botaniques .....	4
1.3	Systématique.....	5
2	Généralités sur le genre <i>Centaurea</i> .....	6
2.1	Description botanique du genre <i>Centaurea</i> .....	6
2.2	Richesse en métabolites secondaires des espèces du genre <i>Centaurea</i> .....	7
2.3	Propriétés pharmacologiques du genre <i>Centaurea</i> .....	7
3	<i>Centaurea papposa</i> (Coss.) Greuter .....	8
3.1	Description botanique.....	8
3.2	Place dans la systématique .....	9
3.3	Synonyme de l'espèce.....	9
3.4	Etudes phytochimique antérieurs sur <i>Centaurea papposa</i> .....	10
4	Généralités sur la famille des Lythracées .....	10
4.1	Distribution des <i>Lythraceae</i> .....	11
4.2	Caractéristiques des <i>Lythraceae</i> .....	11
5	Le grenadier dans le règne végétal.....	12

5.1 Historique du grenadier ( <i>Punica granatum</i> L) .....	12
5.2 Description morphologique .....	13
5.3 Nomenclature.....	15
5.4 Classification botanique .....	15
5.5 Origine géographique et aire de répartition du grenadier .....	16
5.5.1 Origine.....	16
5.5.2 Aire de répartition géographique .....	16
5.6 Usages traditionnels et empiriques de ( <i>Punica granatum</i> L).....	19
5.7 Composition chimique de la grenade ( <i>Punica granatum</i> L).....	20

## **Chapitre 2: Métabolites secondaires**

1 Les métabolites secondaires.....	22
1.1 Définition.....	22
1.2 Classification.....	23
2 Composés phénoliques.....	23
2.1 Acides phénoliques simple.....	24
2.2 Les Flavonoïdes .....	26
2.2.1 Structure chimiques et classification des flavonoïdes.....	26
2.3 Tanins .....	28
2.3.1 Les tanins hydrolysables .....	28
2.3.2 Les tanins condensés .....	29
2.4 Les Anthocyanes.....	29
2.5 Les Coumarines .....	30
2.6 Les Lignines.....	30
3 Les Saponosides.....	31
4 Les Terpènes .....	31
5 Les Alcaloïdes.....	32
6 Activités biologiques des composés phénoliques .....	34

## **Chapitre 3: Activités biologiques**

1	L'activité antibactérienne .....	35
1.1	Généralités .....	35
1.2	Les Bactéries.....	35
1.3	Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	36
1.3.1	La méthode par diffusion .....	36
1.3.2	La Méthode de dilution.....	36
1.4	La nature de l'activité antibactérienne .....	36
1.5	Mode d'action contre les bactéries .....	37
2	L'activité Antifongique.....	37
2.1	Les champignons phytopathogènes.....	37
2.2	La nature de l'activité antifongique .....	38
2.3	Les mécanismes de défense.....	38
2.3.1	Les barrières mécaniques .....	38
2.3.2	Les barrières biochimiques .....	38

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre 1: Matériel et Méthodes**

1	Matériel et méthode .....	39
2	Préparation du matériel végétal.....	39
2.1	Séchage et broyage .....	39
2.2	Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.....	39
2.2.1	Extraction par macération .....	39
2.2.2	Extraction par macération à l'eau (phase aqueuse).....	39
2.2.3	Fractionnement de la phase aqueuse.....	40
3	Les activités biologiques .....	42
3.1	Evaluation de l'activité antibactérienne .....	42

3.1.1	Les souches bactériennes testées.....	42
3.1.2	Méthode de diffusion sur disques .....	45
3.1.2.1	Préparation des disques .....	46
3.1.2.2	Stérilisation du matériel.....	46
3.1.2.3	Préparation de milieu de culture .....	46
3.1.2.4	Préparation des dilutions d'extrait des plantes.....	46
3.1.2.5	Préparation de l'inoculum .....	47
3.1.2.6	Ensemencement .....	48
3.1.2.7	La lecture.....	49
3.2	Evaluation de l'activité antifongique.....	51
3.2.1	Les souches fongiques utilisées .....	51
3.2.1.1	Stérilisation du matériel.....	53
3.2.1.2	Préparation des extrais .....	53
3.2.1.3	Préparation de champignon .....	54
3.2.1.4	Préparation de la suspension fongique .....	54
3.2.1.5	Culture des souches fongiques .....	54
3.2.1.6	Mise en œuvre pratique .....	54
3.2.1.7	La lecture.....	55

## **Chapitre 2: Résultats et Discussions**

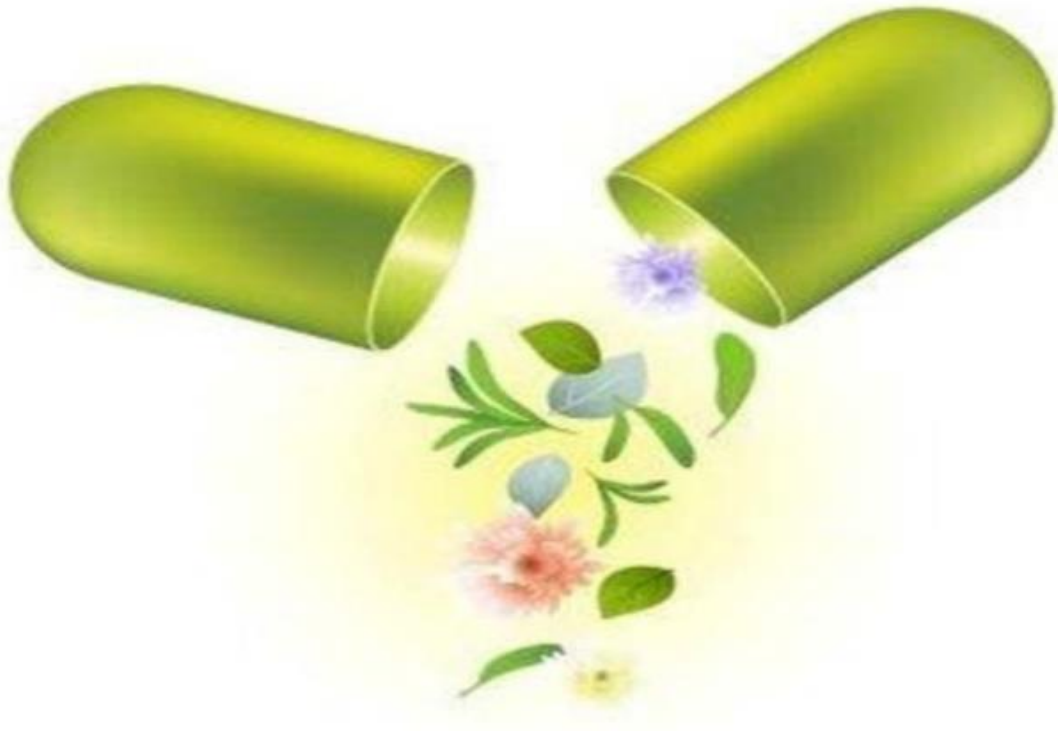
1	Activités biologiques <i>in vitro</i> des extraits de <i>Centaurea papposa</i> et <i>Punica granatum</i> L56	
1.1	Evaluation de l'activité antibactérienne .....	56
1.1.1	Pouvoir antibactérien.....	62
1.2	Evaluation de l'activité antifongique .....	67
1.2.1	Pouvoir antifongique.....	76
	Conclusion.....	78

References bibliographies

Abstract

ملخص

Résumé



# *Introduction*

**L**es plantes médicinales sont un patrimoine précieux de l'humanité, et en particulier de la majorité des communautés pauvres des pays en développement qui en dépendent pour les soins de santé primaires et leurs moyens de subsistance. Ils utilisent la plupart des espèces végétales, ligneuses et à base de plantes comme médicaments, ils les considèrent donc comme une source de soins médicaux en l'absence d'un système médical moderne.

Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent des plantes efficaces dans les différents modèles pharmacologiques et quasiment dépourvues de toxicité (**Bouzi**, 2017).

Actuellement, l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des pathologies est devenue l'une des principales voies d'accès aux soins. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes qui constituent un réservoir inépuisé de nouveaux métabolites secondaires (**Nasri**, 2016).

Ces métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols des végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, Pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Les plus représentés sont les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins (**Kanoun**, 2011).

L'Algérie est reconnue par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existent à l'état spontané, ainsi que par l'utilisation populaire dans l'ensemble des terroirs du pays. Cependant, la flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% d'endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Bouzi**, 2017). Dans le cadre de notre mémoire de master, nous nous sommes intéressées à l'espèce *Centaurea papposa* appartenant au genre *Centaurea* et à la famille des *Asteraceae*, et à l'espèce *Punica granatum* L (grenadier) de la famille des *Lythraceae*. En se basant sur leur compositions chimiques particulièrement riche en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, composés terpéniques, lignines, faisant d'elles une source essentielle de principe actifs.

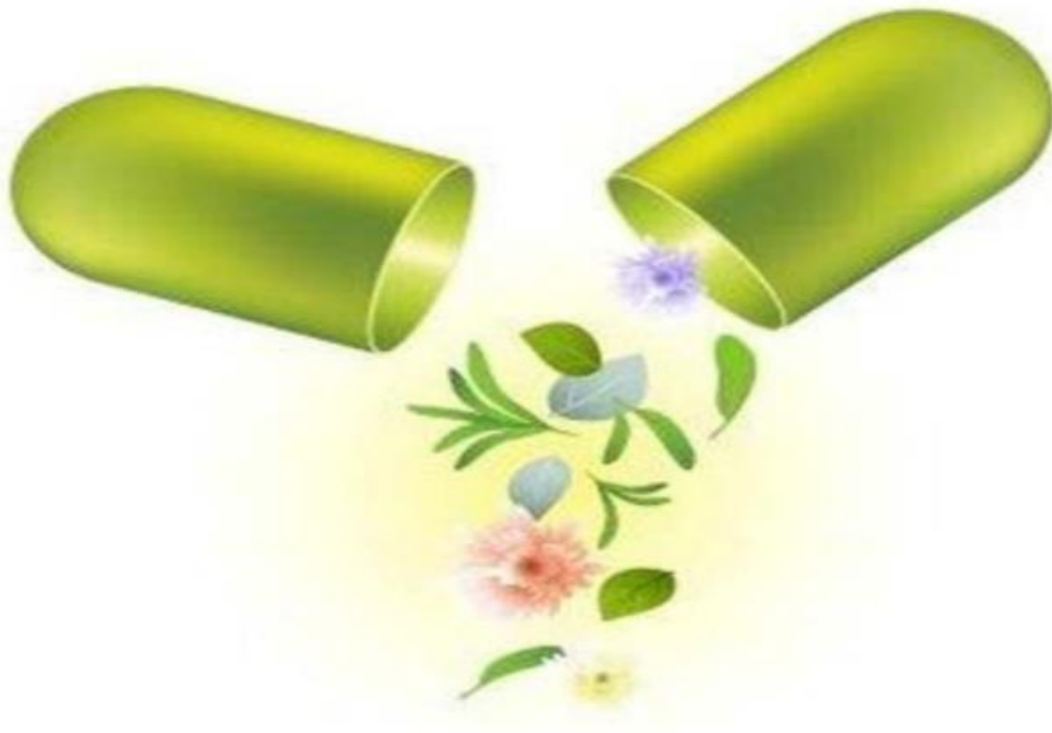
La présente étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de ces deux plants médicinaux.

Notre travail à caractère phytochimique est constitué de deux parties :

- **La première partie** : est une synthèse bibliographique ou nous apportons des généralités sur les plantes, les métabolites secondaires et les activités biologiques
  
- **La deuxième partie** : Expérimentale, est abordée à l'extraction de trois extraits (n-butanol, dichlorométhane et acétate d'éthyle) à partir de feuilles de *Centaurus papposa* et *Punica granatum* L, puis à l'étude de leur effet antibactérien et antifongique. Enfin, une conclusion qui nécessite de dégager les perspectives nécessaires pour mieux se plonger dans ce travail est donnée.

# *PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*





*CHAPITRE 1 : Généralités sur les espèces  
étudiées*

## 1 Généralités sur La famille des Astéracées

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur (**Charles Dorniet al., 2017**). La famille *Asteraceae* est la plus vaste du groupe des dicotylédones. Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc.). Dans cette famille on y retrouve un grand nombre d'espèces très communes dans les champs et les villes. Elles possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires (**Matsuda et al., 2002**).

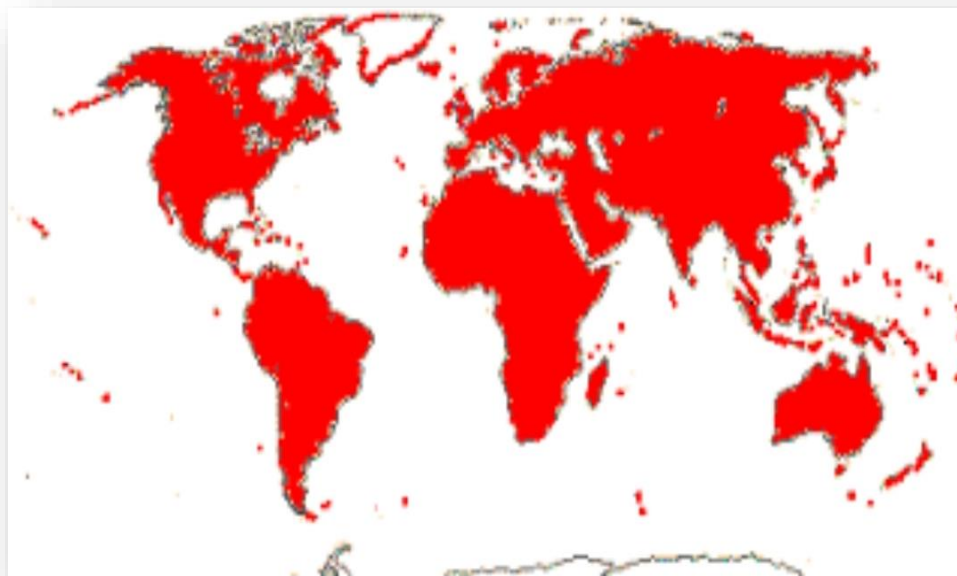
La famille des Astéracées est la plus étendue du monde végétal, avec environ 25000 espèces réparties en 1300 genres, dispersées sur toute la Terre (**Bremer et Anderberg Arne, 1994**). Les genres les plus importants du point de vue du nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). D'après Quezel et Santa, en Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces. Ce qui représente environ 8 à 10 % de toutes les plantes à fleurs (**Quezel et Santa, 1963**).

Ce sont essentiellement des plantes herbacées, même si la famille comprend aussi des arbres, des arbustes ou des lianes, et ils ont des formes de croissances telles que des géophytes, des épiphytes et des plantes grimpantes (**Sánchez-Chávez, 2019**).

### 1.1 Distribution géographique

La position géographique et la diversité climatique de l'Algérie lui confère une des flores les plus diversifiées et les plus originales du bassin méditerranéen. La connaissance de la composition floristique et la répartition des communautés d'adventices permet une bonne gestion de la parcelle (**Fertout-Mouri, 2018**). En effet, c'est dans l'étage bioclimatique subhumide que l'on trouve le maximum d'espèces en dépit de sa surface relativement faible, de Saharien, de l'Aride et du Semi-aride (Ionesco 1965): plus de 60 % de la flore totale et 40 % de la flore rare y sont présentes (**FernaneetIbn Tattou, 1999**).

Les composées ont une distribution mondiale (sauf l'Antarctique) avec une large diversification écologique. Toutefois, elles sont abondantes principalement dans les régions tropicales et subtropicales bordant les zones semi-arides et désertiques, elles sont moins fréquentes dans les forêts tropicales (Fig.01) (**Quezel et Santa, 1963**).



**Figure 01:** Carte de répartition géographique de la famille des Astéracées dans le monde (en rouge).

## 1.2 Caractéristiques botaniques

**Morphologie générale :** Les Astéracées ont la caractéristique commune d’avoir des fleurs réunies en capitules, sans pédoncules, placées sur l’extrémité d’un rameau ou d’une tige et entourées d’une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre (**Barkely et al., 2006**).

Suivant le type de fleurs composant le capitule, on a les inflorescences suivantes (Fig.02) :

- **Tubuliflores** : composées uniquement de fleurs actinomorphes, tubuleuses (*Centaurea*).
- **Liguliflores** : composées uniquement de fleurs zygomorphes, ligulées à 5 dents (*Lactuca*).
- **Labiatiflores** : composées uniquement de fleurs zygomorphes bilabiées (*Mustisia*).
- **Radiées** : fleurs zygomorphes ligulées à 3 dents à la périphérie, fleurs actinomorphes tubuleuses au centre (*Senecio*).



*Tubuliflores*  
(*Centaurea*)

*Liguliflores*  
(*Senecio*)

*Labiatiflores*  
(*Mutisia*)

*Radiées*  
(*Laitue*)

**Figure 02:** Types des fleurs des plantes d'*Astéraceae*.

Les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette).

Les fruits sont des akènes généralement surmontées d'une aigrette de poils (Pappus) apparaissant sous la forme d'écailles, de soies, d'arêtes ou d'une couronne qui favorise leur dispersion par le vent (Spichiger *et al.*, 2004).

### 1.3 Systématique

**Règne** : Plantae

**Sous-règne** : Tracheobionta (Plantes vasculaires)

**Embranchement** : Phanerogamae (Phanérogames)

**Sous-embranchement** : Magnoliophytina (Angiospermes)

**Classe** : Magnoliopsida (Dicotyledones)

**Sous-classe** : Asteridae

**Ordre** : Asterales

**Famille** : *Asteraceae* (Compositae)

## 2 Généralités sur le genre *Centaurea*

L'étymologie de l'appellation du genre « *Centaurea* » dérive du nom grec « Centaureios »herbe du Centaure Chiron, auquel on attribuait la découverte des propriétés de ces plantes (**Bandyukova et al., 1969**).

Les centaurees sont des plantes à résine ou à essence sans latex, elles se multiplient par touffes ou par semis, généralement au printemps. Elles se rencontrent sur différents types d'habitats tels que, les déserts et les semi-déserts, les pentes raides, les hautes montagnes, les terres arables, les zones à inondations périodiques, les zones sèches et partiellement exposées au soleil (**Hellwig, 2004**).

Le genre *Centaurea* comprend plus de 500 espèces, dont 45 se développent spontanément en Algérie, dont 7 sont localisées dans le désert du Sahara (**Labeledet et al., 2019**). Il est répandu aussi bien sur le territoire national qu'en Europe, Asie, Afrique, Amérique du Nord (Canada et USA) et Australie (Tab.01) (**Gousiadou et skaltsa, 2003 ; Mabblerley, 1987**).

**Tableau 01:** Localisation de quelques espèces du genre *Centaurea* (**Mishio et al., 2006**).

Localisation	Espèces	Références
Région méditerranéenne	<i>C. calcitrapa ; C. hololeuca</i>	( <b>Lourenco et al., 2002</b> )
Afrique du nord	<i>C. chamaerhaponticum ; C.pullata</i>	( <b>Benayache et al., 1992</b> )
Toute l'Europe	<i>C. maroccana ; C.ptosimopappa</i>	( <b>Celik et al., 2006</b> )
Saharienne	<i>C.ruthencia; C.tougourensis</i>	( <b>Adekenov et al., 1986</b> )
Europe de l'Est	<i>C.solstitialis ; C.diffusa</i>	( <b>Anand et al., 2003</b> )
Algérie	<i>C.pubescens ; C.musimomum</i>	( <b>Medjrubi et al., 1997</b> )

### 2.1 Description botanique du genre *Centaurea*

Ce genre regroupe de nombreuses plantes de la famille des *Astéraceae*, assez proches des chardons et des circes, mais qui s'en distinguent notamment par leurs feuilles non épineuses. Les Centaurees sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes comme pour tous les composées, les fleurs ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées. Dans le cas des Centaurees, les fleurs sont toutes tubulées, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes.

Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes.

L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces.

Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses à hile latéral, profond, barbu ou non portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque, notamment pour les fruits du centre (**Quezel et Santa, 1963**).

## 2.2 Richesse en métabolites secondaires des espèces du genre *Centaurea*

Récemment plusieurs espèces du genre *Centaurea* font le sujet d'une large investigation phytochimique en raison de leur richesse en métabolites secondaires connues pour leurs diverses activités biologiques, on cite à titre d'exemples: les flavonoïdes, les lignanes, les acétylènes, les sesquiterpènes lactones. Ces derniers sont les substances les plus fréquentes chez les espèces du genre *Centaurea*, caractérisées par des activités biologiques très importantes: anti tumeur, cytotoxique, antimicrobienne, hypothermique (**Lee et al., 1977**).

## 2.3 Propriétés pharmacologiques du genre *Centaurea*

Depuis l'antiquité de nombreuses espèces du genre *Centaurea* sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner et pour traiter différentes maladies. Les *Centaurea* ont plusieurs effets pharmacologiques tels que: anticancéreux, antiinflammatoire, anti-affection urogénitale, anti-nociceptif, antipyrétique, anti-artérioscléreux, antinéoplasique et anti-infection microbienne. Elles sont aussi utilisées contre les douleurs rhumatismales, les problèmes cardiovasculaires, les maux de tête, les symptômes gastrointestinaux, les parasitaires et comme soulageant de la fièvre, ce sont aussi des remèdes stimulant et cicatrisant des plaies (**Labed et al., 2019 ; Belkacem et al., 2014 ; Baharfar et al., 2009 ; Kilic, 2013 ; Koca et al., 2009 ; Leonardi et al., 2011**). Elles présentent une activité élevée dans les systèmes vivants, avec un fort intérêt pharmacologique ce qui explique leurs utilisation à long terme dans la médecine traditionnelle.

Le tableau ci-dessous présente quelques effets thérapeutiques déjà étudiés du genre *Centaurea*.

Tableau 02: Effets thérapeutiques des *Centaurea*.

Espèces	Propriétés thérapeutiques	Références
<i>C. Amaena et C. Aksoyi</i>	Antioxydants, antibactériens	(Albayrak <i>et al.</i> , 2017)
<i>Centaurea albonitens</i>	Agent anticancéreux potentiel et un activateur de la sensibilité chimiothérapeutique.	(Bahmani <i>et al.</i> , 2018)
<i>Centaurea pungens</i>	L'activité antimicrobienne	(Albayrak <i>et al.</i> , 2017)
<i>Centaurea maroccana</i>	Protecteur contre l'hépatotoxicité	(Schauenberg, 2006)
<i>C. Drabifolia et C. Lycopifolia</i>	Antioxydants, anti microbienne, anti alzheimer, anti diabétique	(Zengin <i>et al.</i> , 2018)
<i>Autres</i>	Activités antimicrobienne, antivirale, antifongique, cytotoxique, anticancéreuse,	(Toribio <i>et al.</i> , 2004) (Berrin <i>et al.</i> , 2007) (Skaltsa <i>et al.</i> , 2000)
	Effet analgésique, diurétique et combat le refroidissement.	(Medjroubi <i>et al.</i> , 2005) (Shoeb <i>et al.</i> , 2007) (Djeddi <i>et al.</i> , 2008).

### 3 *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter

#### 3.1 Description botanique

La *Centaurea papposa* est une plante vivace à souche ligneuse, endémique et très rare. Son aire de répartition est de la Wilaya de Skikda jusqu'au frontières tunisiennes, mais se localise au niveau de Cape de Garde d'Annaba. La tige et les feuilles sont tomenteuses blanchâtres. Les feuilles très découpées, les inférieurs bipinnatifides à lobes oblongs. Les bractées moyennes de l'involucre lancéolé-aiguës ; à appendice comportant des denticulations régulières, non épineuses et en petit nombre. L'inflorescence est un capitule petit de 1 à 1.5 cm de diamètre, disposés en corymbe composé. Les corolles roses. Le fruit est un petit akène, strié à stries blanchâtres et bien apparentes. L'aigrette présente et courte (1/3 environ de l'akène) (Fig.03) (Quezel et Santa, 1962).



**Figure 03** : *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter.

### 3.2 Place dans la systématique

Selon Dupont et Guignard (2012), la *Centaurea papposa* appartient à la classification suivante :

**Règne** : Plante

**Embranchement** : Embryophytes

**Sous Embranchement** : Trachéophytes

**Super Classe** : Spermatophytes

**Classe** : Angiospermes

**Grade** : Triporées

**Grade** : Triporées évoluées

**Ordre** : Astérales

**Famille** : Astéracées

**Sous-famille** : Carduoïdées

**Tribu** : Carduées

**Sous-tribu** : Cardopatinées

**Genre** : *Centaurea*

**Espèce** : *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter

### 3.3 Synonyme de l'espèce

- ✿ *Centaurea gymnocarpa* var. *papposa* Coss
- ✿ *Centaurea glomerata* var. *papposa* (Coss.)



### 3.4 Etudes phytochimique antérieurs sur *Centaurea papposa*

De nombreuses études chimiques antérieures ont été enregistrées sur des espèces appartenant au même genre *Centaurea*, sur les lactones sesquiterpéniques, les flavonoïdes. Récemment quatre sesquiterpènes lactones et un flavonoïde ont été isolés de l'extrait acétaté d'éthyle des parties aériennes de *Centaurea papposa*. Il s'agit (Fig.04) :

D'un gémacranolide connu comme étant cnicine (1), d'un eudesmanolide malacitanolide (2), deux nouveaux élemanolides le 8 $\alpha$ -O-(3,4-dihydroxy-méthylènebutanoyloxy)-dehydromelitensine (3), 8 $\alpha$ -O-(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoyloxy)-15-oxo-5,7RH, 6 $\alpha$ H-éleman-1,3,11(13)-trien-6,12-olide (4), 8 $\alpha$ -O-(3, 4-dihydroxy-méthylènebutanoyloxy)-dehydromelitensin méthylester (5), une flavone l'eupatorine (6) (Grafakou et al., 2018).

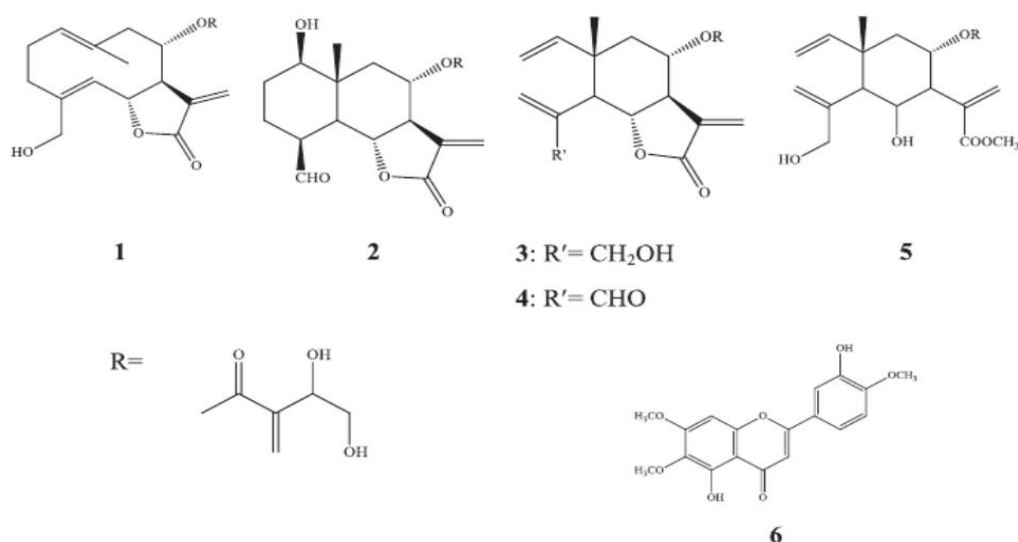


Figure 04 : Structures chimiques des composés isolés.

## 4 Généralités sur la famille des Lythracées

C'est une famille de plantes à fleurs, comprenant 32 genres, avec environ 620 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres. Elle comprend également la grenade (*Punica granatum*, anciennement en *Punicaceae*).

Les *Lythraceae* a une distribution mondiale, avec la plupart des espèces dans les tropiques, mais s'étendant également dans les régions à climat tempéré.

Botaniquement, les feuilles sont généralement par paires (opposées) et les pétales de fleurs émergentes du bord du tube du calice. Les pétales semblent souvent froissés (Fig.05) (Stevens, 2011).



**Figure 05 :** *Lythrum Salicaria*.

#### 4.1 Distribution des *Lythraceae*

Les *Lythraceae* sont largement distribuées, mais avec la plupart des espèces tropicales et certaines tempérées. (Stevens, 2011 ; Judd *et al.*, 2008). Ils sont absents du Sahara et des régions les plus arides de l'Australie (Stevens, 2011). De nombreuses espèces sont présentes dans des habitats aquatiques ou semi-aquatiques (Fig.06).



**Figure 06:** Répartition géographique des *Lythraceae* (en noire).

#### 4.2 Caractéristiques des *Lythraceae*

Les espèces de *Lythraceae* sont le plus souvent des herbes et moins souvent des arbustes ou des arbres, les arbustes et les arbres ont souvent une écorce squameuse (Mabberley, 2008). Traits partagés par les espèces au sein des *Lythraceae*, qui les distinguent d'appartenir à d'autres familles de plantes sont les pétales froissés dans le bourgeon et le tégument externe à plusieurs couches de la graine (Judd *et al.*, 2008).

## 5 Le grenadier dans le règne végétal

### 5.1 Historique du grenadier (*Punica granatum* L)

La grenade (*Punica granatum* L., *Punicaceae*) est une plante et un fruit anciens et bienaimés. Le nom «grenade» suit le nom latin du fruit *Malum granatum*, qui signifie «pomme granuleuse». Le nom générique *Punica* se réfère à Pheonicia (Carthage) à la suite d'une supposition erronée concernant son origine. La grenade et son utilisation sont profondément ancrées dans l'histoire humaine, et l'utilisation se trouve dans de nombreuses cultures humaines anciennes comme nourriture et comme remède médical. Malgré cela, la culture de la grenade a toujours été restreinte et généralement considérée comme une culture mineure. Le grenadier nécessite une longue saison chaude et sèche afin de produire un bon rendement de fruits de haute qualité (**Larrosa et al, 2010**).

Des découvertes scientifiques récentes corroborent l'utilisation traditionnelle de la grenade comme remède médical et indiquent que les fruits, fleurs, écorces et feuilles de grenade contiennent des substances phytochimiques bioactives qui sont antimicrobiennes, réduisent la tension artérielle et agissent contre les maladies graves comme le diabète et le cancer. Ces découvertes ont conduit à une plus grande sensibilisation du public aux bénéfices du fruit de la grenade, en particulier dans le monde occidental, et par conséquent à une augmentation importante de la consommation de ses fruits et jus (**Lansky et Newman, 2007**).

Il existe plus de 1000 variétés de *Punica granatum* L. (**Lansky et Newman, 2007**). Les critères les plus utilisés pour les distinguer sont la taille du fruit, la couleur de l'écorce, la couleur des graines, la dureté des pépins, la teneur en jus, l'acidité et l'astringence et la période de maturation (**Stover et Mercure, 2007**).



**Figure 07** : Arbre de grenadier.

## 5.2 Description morphologique

La grenade est un arbuste qui tend naturellement à développer plusieurs troncs et a une apparence buissonnante. Lorsqu'il est domestiqué, il est cultivé comme un petit arbre qui peut atteindre 5 m. Dans des conditions naturelles, il peut parfois atteindre plus de 7 m à l'autre extrême, dans un environnement naturel sévère, on peut trouver des variétés de brousses rampantes (**levin, 2006**). En outre, il existe des cultivars nains qui ne dépassent pas 1,5 m (**Levin 1985, 2006, Liu 2003**).

Le grenadier s'adapte au climat méditerranéen, il possède également une bonne résistance au froid. En effet, il survivra à des températures de l'ordre de -12 à -15 °C (**Sheete et al, 2004**).

### ☀ Feuille :

Les feuilles du grenadier sont brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long, de sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre (**Alhijna et Bourich, 2017**). Ces feuilles sont caduques, opposées et disposées sur les rejets comme ils peuvent être en touffes sur les pousses courtes, glabres sur les deux faces. Caractérisées par la couleur verte foncé de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante (**Avreinoff, 1957**). Notons que les feuilles du grenadier ne possèdent pas de stipule (Fig.08).



**Figure 08:** feuilles du grenadier.

### ☀ Fleur :

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes (quand elles sont sous forme de boutons). Elles sont très ornementales, de couleur rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule (Fig.09) (Melgarejo et Salazar, 2003).

La période normale de la floraison de différents cultivars de grenadier se produit généralement entre mars- avril et juin- aout. Elle dure jusqu'à 10 –12 semaines et voire plus selon les variétés et les conditions géographiques (Ben-Arie *et al*, 1984). Pour la biologie florale, le grenadier est une espèce monoïque qui développe, sur le même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles en formes de "Vase" et des fleurs males stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés en forme de cloche (Melgarejo et Salazar, 2003).



**Figure 09:** Fleurs du grenadier.

### ☀ Fruit :

La grenade est une grosse baie ronde, de 8 à 12 cm de diamètre, au péricarpe dur et coriace qui, à maturité, vire au jaune-rouge-orangé. Quand on coupe la grande en deux, on découvre une multitude de graines d'une forme caractéristique en « germe de rubis », rangées dans des loges (6 à 12 loges) délimitées par des cloisons membraneuses blanchâtres de saveur âpre. Chacune de ces graines est constituée d'un pépin enrobé d'une épaisse couche moelleuse, très juteuse, de couleur rouge-rose translucide, c'est cette pulpe qui constitue la partie comestible de la grenade, elle représente 55% du poids total du fruit (Fig.10) (Espirade, 2002).



**Figure 10** : fruit du grenadier.

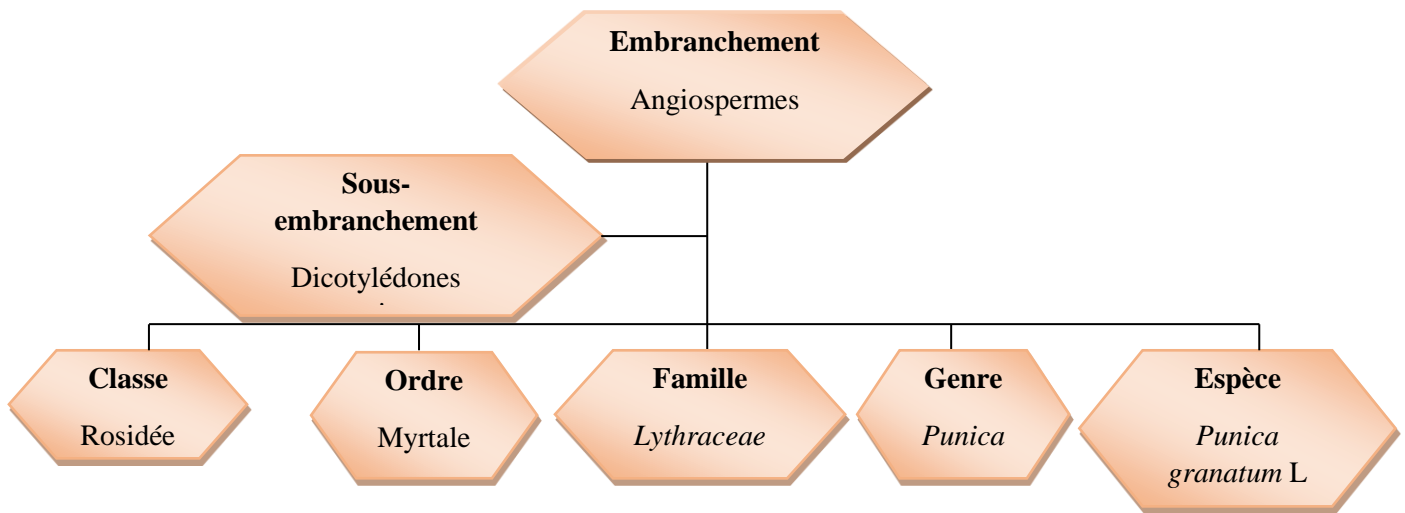
### 5.3 Nomenclature

Selon les langues parlées dans chaque pays, le nom vernaculaire de *Punica granatum* varie. Ainsi le nom de cet arbre sera :

- ✓ En arabe : الرمان
- ✓ En anglais : Pomegranate ou Pome Granate.
- ✓ En allemand : Granatapfelbaum, Granatbaum, Gemeine Granat, Balluster.
- ✓ En espagnol : Granado cultivado, Mangrano.
- ✓ En italien : Granato.
- ✓ En chinois : Ngan Che Lieou, Shi Liu (**Reguieg, 2019**).

### 5.4 Classification botanique

Le grenadier « *Punica granatum* » vient du latin « *Malum granatum* » qui signifie « Fruit à petits grains » (**CYR, 2017**). Il a été décrit par Linné et introduit pour la première fois dans sa classification en 1753, qui a été révisée en 2003, par un groupe de botanistes, « Angiosperm Phylogeny Group » ou APG, donnant naissance à une nouvelle classification phylogénétique APGII (Fig.11) (**Wald, 2009**). La position du grenadier est la suivante :



**Figure 11** : Position de *Punica granatum L.* selon la classification APGII. Source : (Spichiger *et al*, 2004).

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

## 5.5 Origine géographique et aire de répartition du grenadier

### 5.5.1 Origine

Le grenadier est une plante fruitière, originaire de l'Himalaya dans le nord de l'Inde jusqu'en Iran. Il est considéré parmi les premiers fruits cultivés par l'homme depuis environ 4000 ans av.j, cependant il est cultivé et naturalisé depuis l'Antiquité dans toute la région Méditerranéenne.

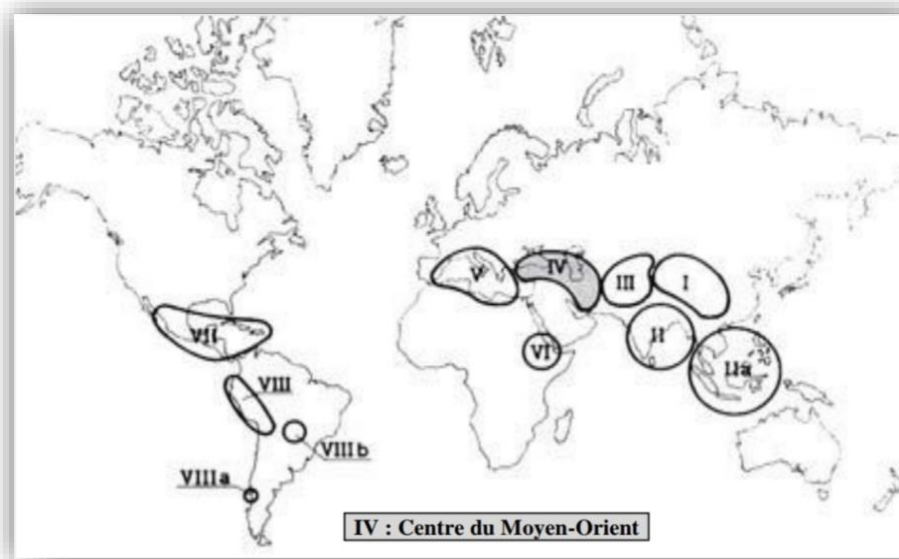
Au cours des derniers milliers d'années, il s'est répandu partout dans le monde, de l'Asie à l'Europe puis à l'Amérique du Nord. Il est actuellement cultivé dans les régions Tropicales et subtropicales du monde (Melgarejo et Valero, 2012 ; Kurtay, 2014).

### 5.5.2 Aire de répartition géographique

#### ✿ Dans le monde

Le *Punica granatum L.* est cultivé à une échelle considérable dans de nombreux pays d'Orient tels qu'Iran, Afghanistan, Transcaucasie, Turquie et Turkestan, de même sa culture est largement pratiquée dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc ....etc.) (Evreinoff, 1957 ; Kanoun, 2014).

On le trouve encore en Amérique et on le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Israël, en Egypte, en Syrie et dans les pays balkaniques (Fig.12) (Evreinoff, 1957).



**Figure 12** : Centre d'origine et de diversité des arbres grenadiers cultivés (IV) selon le chercheur Vavilov (1951) (Sanchez-Monge, 1974).

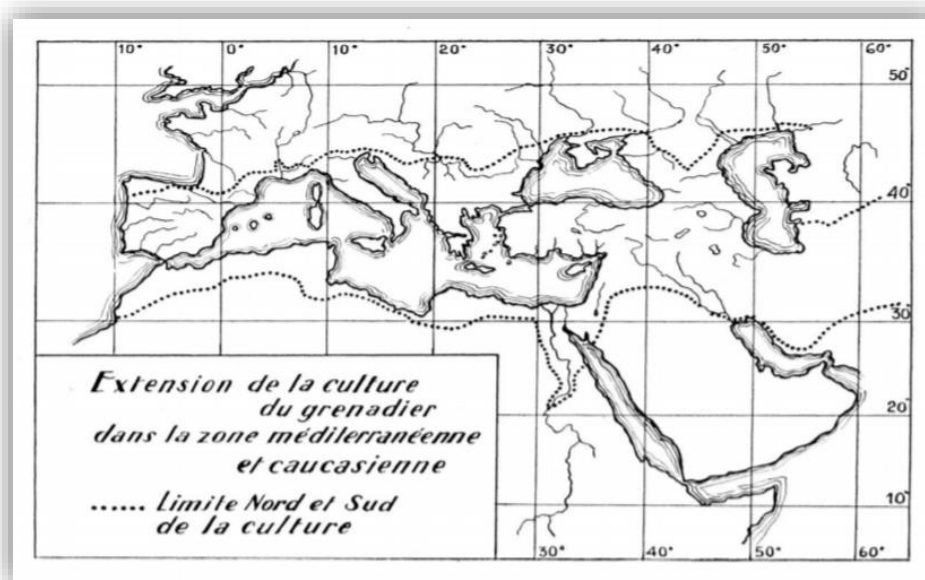
### ✿ L'introduction du Grenadier dans la culture européenne et méditerranéenne

C'est les Romains qui ont introduit cet arbre en Afrique du Nord, et ils le connaissaient sous le nom de « *Malum panicum* », décrit par les auteurs romains depuis l'époque de Caton (IIe siècle avant J-C).

En Espagne, la culture du Grenadier s'est développée surtout sous l'occupation arabe, d'où son nom «Granada » provenant du nom de la ville de Grenade, où cette culture était florissante, mais actuellement est moins appréciée qu'elle ne l'était dans le passé.

En Italie, en Espagne, au Maroc et en Algérie, on observe souvent des grenadiers redevus sauvages, au voisinage des habitations (Fig.13) (Evreinoff, 1957).





**Figure 13 :** Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne (Evreinoff, 1957).

### ✿ Le grenadier en Algérie

Malgré le fait que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes.

Il est répandu dans toute l'Algérie et spontané souvent dans le Tell Algéroconstantinois (Meftah, 2003). En Oranie, les variétés les plus cultivées sont : Tendral (appelée Molla), Blanca, Si Hueso, Colorado. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie, cependant, (Lahlou, Elmouze, etc.) sont connus.

Le tableau suivant représente les quatorze variétés qui sont actuellement autorisées à être produites et commercialisées par l'Etat (Inraa, 2006).

**Tableau 03 :** Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (Inraa, 2006).

Espagne rouge	Gajin	Gajin Selection station
Corda travita	Sefri	Chelfi
Moller hueso	Zemdautomne	Doux de kolea
Mellisse	Sulfani	Messaad
Papers shell	Spanish duoy	

### 5.6 Usages traditionnels et empiriques de (*Punica granatum* L)

Le Grenadier est une espèce fruitière méridionale et subtropicale précieuse. Il est sans doute celui qui se prête aux usages les plus variés même décoratifs. Il n'est pas seulement utile par ses fruits, mais par les produits qui en sont extraits (Evreinoff, 1957). Il possède une large gamme de bioactifs (Ravikumar *et al.*, 2019). Chaque partie de cette plante a des propriétés thérapeutiques.

La fleur de *Punica granatum* a traditionnellement été utilisée pour traiter la pharyngite et la bronchite (Khare *et al.*, 2004 ; Bekir *et al.*, 2013). Diverses parties de la grenade ont été utilisées pour traiter la fièvre, la bronchite, les infections des voies respiratoires, le paludisme, ect (Siban *et al.*, 2012). Les fleurs de grenade sont utilisées pour traiter le diabète, l'hématurie, les hémorroïdes, l'hémoptysie et la dysenterie (Mithun *et al.*, 2012).

Le péricarpe du fruit de la grenade contient des composés qui peuvent jouer un rôle important dans les activités antibactériennes contre certaines bactéries intestinales et pathogènes d'origine alimentaire (Ganeshkumar *et al.*, 2013).

L'extrait de fleur de *Punica granatum* a un effet inhibiteur sur le facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des cellules activées (NF-kB), qui est un facteur de transcription pour les cytokines et les molécules d'adhésion des leucocytes (Sarker., 2012). L'extrait d'écorce de *Punica granatum* peut être un traitement bénéfique pour la dysenterie, la diarrhée, l'acidose et l'hémorragie en réduisant l'émergence d'un clone épidémique (Ganeshkumar *et al.*, 2013).

Plusieurs études récentes sur la grenade, en soulignant son rôle comme un vasculoprotector en raison de la présence de tanins hydrolysables, ellagitanins, et l'acide ellagique, trouvé que cela réduit le stress oxydatif et de l'agrégation plaquettaire, ainsi que l'absorption des lipides par les macrophages (Dongdong, 2018).

Il est également possible que des grenades pourraient être utilisées dans le processus de soins de santé bucco-dentaire. En outre, il a été montré pour être efficace dans le renforcement des gencives et fixer les dents lâches. Auparavant, Abdollahzadeh et ses collègues (2011) ont signalé que l'extrait de *Punica granatum* était un puissant antibactérien contre les agents pathogènes oraux tels que *Streptococcus mutans* et *Staphylococcus aureus* (Al-Obaidi *et al.*, 2017).

Les extraits de zeste de grenade ont été trouvés pour être les plus efficaces à inhiber la croissance d'une variété de bactéries, y compris *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Karthikeyan et Vidya, 2019).

Dans les cellules RAW 264,7, l'extrait de grenadier a un potentiel anti-inflammatoire en modulant la synthèse de plusieurs médiateurs et cytokines impliqués dans le processus inflammatoire, tels que NO, PGE 2, IL-6 et TNF (Jianjun xu, 2017).

Quand il vient au traitement du cancer, *Punica granatum* a été montré pour avoir un haut taux d'activités anti-cancer (Mustafa *et al.*, 2020) de la vessie humaine cellule T24 (Masci *et al.*, 2016), le cancer du col de l'utérus (Guo *et al.*, 2016), les cellules cancéreuses de la prostate (Deng *et al.*, 2017), cellules de cancer du sein (Dikmen *et al.*, 2011), de cancer du côlon (Moreira *et al.*, 2017) et de cancer de la thyroïde (Li *et al.*, 2016). L'utilisation de cette espèce offre une alternative phytothérapeutique pour prévenir les dommages de l'ADN et réduire les effets secondaires oxydatifs associés aux chimiothérapies de traitement du cancer (Mahmoudieh *et al.*, 2019).

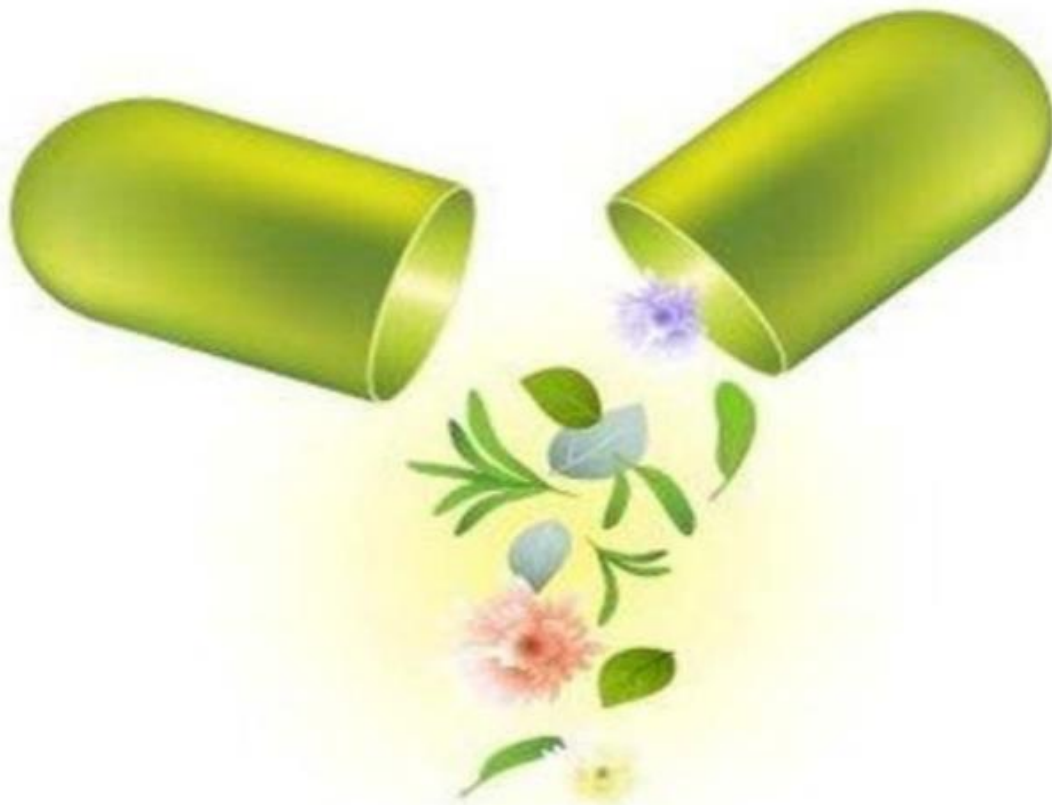
### 5.7 Composition chimique de la grenade (*Punica granatum* L)

*Punica granatum* est également utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter de nombreuses maladies. Des recherches antérieures ont identifié les activités biologiques de la grenade comme anticancérogène, antimicrobienne, antioxydante et antivirale (Malik et 2005 ; Turfan *et al.*, 2011).

Des études chimiques antérieures sur la grenade ont révélé que ses écorces, ses fleurs et son jus contenaient une variété d'antioxydants, notamment des anthocyanes, des catéchines et des ellagitanines (Duman *et al.*, 2009 ; Hayrapetyan *et al.*, 2012). D'autres composés tels que les alcaloïdes, les sucres, et l'acide organiques (tels que l'acide citrique, malique, tartrique, fumarique succinique, et l'acide ascorbique) sont ajoutés à ce produit, des acides aminés, des acides gras et les minéraux tels que le calcium, le magnésium, le phosphore, le potassium et le sodium (Douaouri, 2018), l'acide ellagique l'acide gallique, et punicalagine ont tous été trouvés pour être impliqués dans la génération de NO, PGE-2, et IL-6 en réponse à LPS (Ben Saad, 2017). Les graines sont également une source riche de lipides qui représentent de douze à 20% du poids total des graines (Elfalleh *et al.*, 2011 ; Fernandes *et al.*, 2015).

La grenade pourrait être une bonne source de composés bioactifs phénoliques. Les anthocyanes et les ellagitanins étaient deux groupes de composés polyphénoliques trouvés dans l'écorce de grenade tunisienne (Wafa *et al.*, 2017). Environ 50% du la poids totale du la fruit est occupé par peau, qui est également une riche source de composés bioactifs tels que des composés phénoliques, flavonodes, ellagitanines, proanthocyanidines, et des minéraux, principalement du potassium, azote, calcium, phosphore, magnésium, et le sodium (Sreekumar *et al.*, 2014).

Les fleurs de *Punica granatum* contiennent au moins six composés efficaces différents, y compris l'acide maslinique, daucostérol, et glucosinolates, l'acide ursolique, l'acide ellagique, l'éthyle l'acide carboxylate de brevifoline, et l'acide tri-Ométhyléllagique (**Bekir, 2013**).



*CHAPITRE 2 : généralités sur les Métabolites  
Secondaires*

## 1 Les métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire dérive du métabolisme primaire et fournit des métabolites à faibles quantités, mais dont l'application dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance (**Harbone, 1998**). Les composés phénoliques, les alcaloïdes ainsi que les huiles essentielles font partis du groupe des métabolites secondaires (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

### 1.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (**Boudjouref, 2011**). Ces métabolites sont généralement caractérisés par leurs faibles concentrations dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total) (**Newman et Cragg, 2012**). Ces derniers n'exercent donc pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante. Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut cependant limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un organisme (**Guignard, 1996**).

Les métabolites secondaires sont biosynthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Ils ont essentiellement pour rôle d'accroître la compétitivité de l'organisme qui les biosynthétise en lui conférant un avantage sur d'autres organismes (**Coffi et al., 2012**).

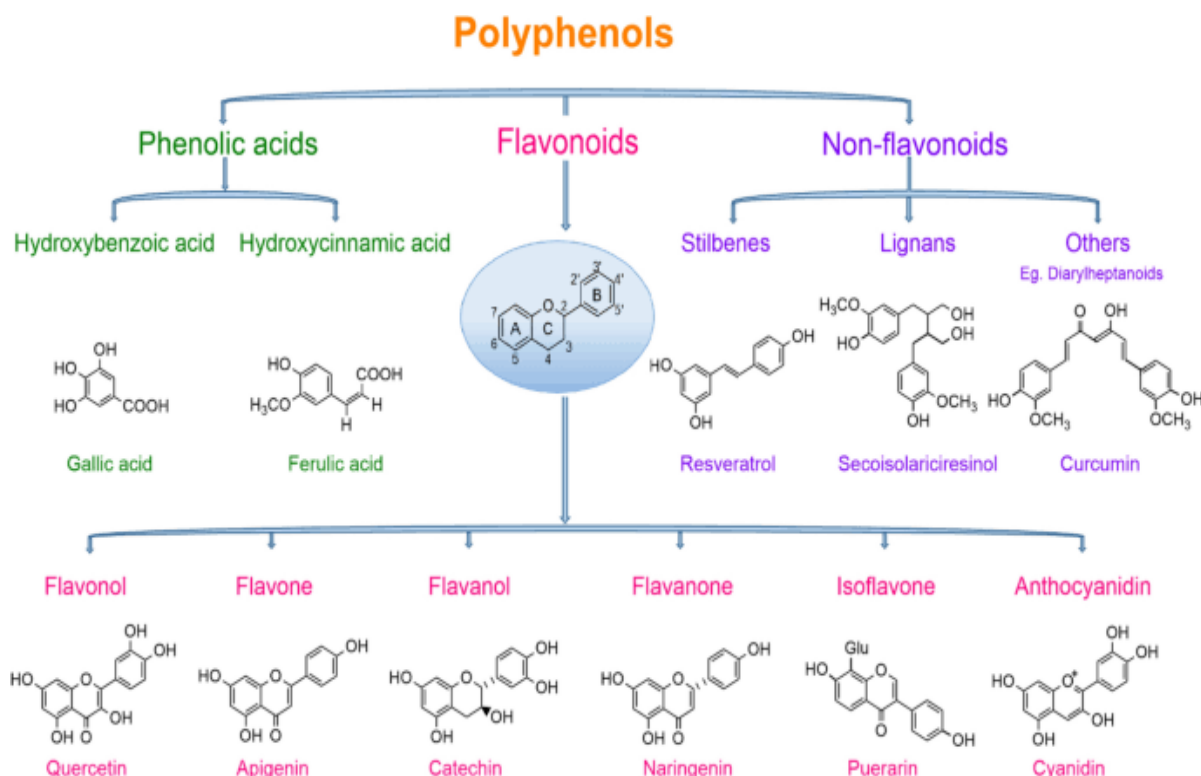
Les métabolites secondaires ont donc des fonctions biologiques qui peuvent s'avérer essentiels (**Scharf et al., 2014**) :

- ❖ les pigments isoprénoïdes et les parfums (isoprénoïdes volatils) des plantes attirent les insectes pollinisateurs (essentiels pour la reproduction).
- ❖ moyens de défense contre des agressions d'origines biotiques et abiotiques.
- ❖ communication entre plantes, micro-organismes ou animaux (hormones, phéromones, ...).

Les plantes produisent plus de 200.000 métabolites secondaires. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils représentent une immense valeur économique, en particulier pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Crozier et al., 2006**).

## 1.2 Classification

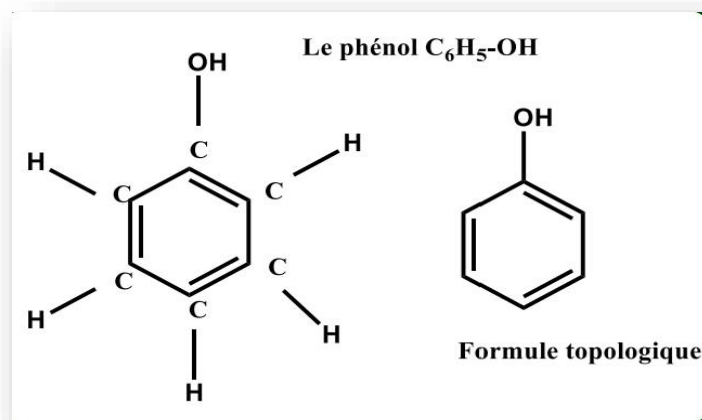
Les CP peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord, par la complexité du squelette de base ensuite, par les degrés de modification de ce squelette (degrés d'oxydation, d'hydrolyation, de méthylation...) et enfin, par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules : glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des CP (Fig.02) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).



**Figure 01** : Les différentes classes des composés phénoliques.

## 2 Composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols, excluant ainsi les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. La désignation générale « composés phénoliques » concerne donc à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Fleuriet *et al.*, 2005).



**Figure 02:** la formule chimique brute d'une fonction phénol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH).

### ➤ Polyphénols monomériques

#### 2.1 Acides phénoliques simple

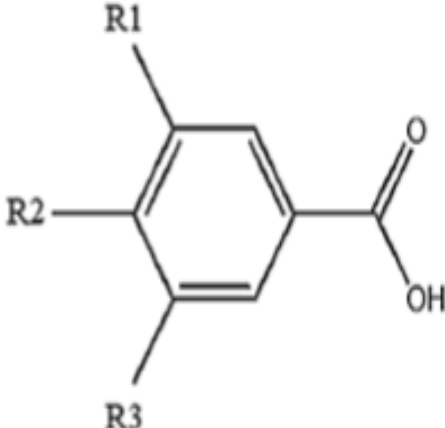
Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (**Haslam, 1994**). Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (**Pandey et Rizvi, 2009**).

##### ✓ Acide phénols dérivés d'acide benzoïque

Sont des hydroxybenzoïques et ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (**Harrar, 2012**). Les plus répandus sont : l'acide salicylique et l'acide gallique (Tab.01) (**Bruneton, 1999**).



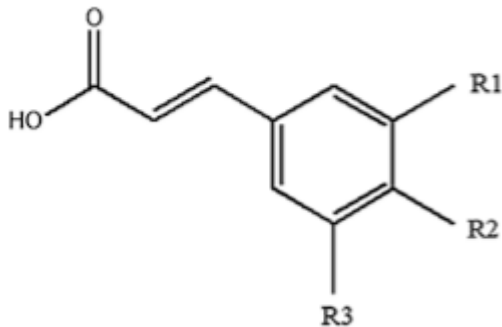
**Tableau 01:** Les principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxy benzoïque
	H	OOH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	H	OH	H	OH	Acide gentisique

### ✓ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide pcoumarique et l'acide synaptique (Tab.02) (Haslam, 1994).

**Tableau 02:** Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acide phénolique
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféïque
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

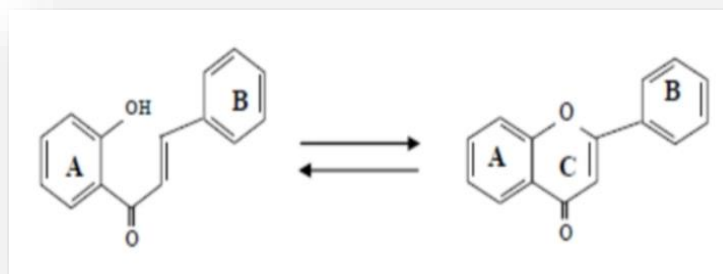
## 2.2 Les Flavonoïdes

Le nom flavonoïde provient du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Karaali et al., 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007**). Cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde (de flavus, jaune en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la classe des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (fleurs, fruits et parfois des feuilles). Près de 6500 de flavonoïdes sont repartis en 12 classes connues.

Les flavonoïdes sont isolés en premier lieu par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais ne sont réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui. Ils sont désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leurs efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient alors clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (**Nijveldt et al., 2001**).

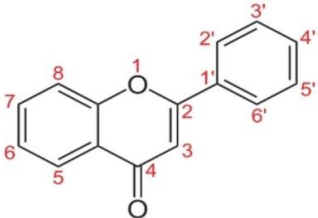
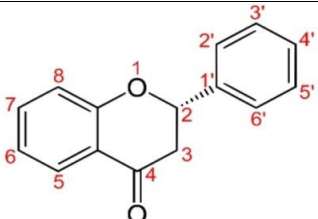
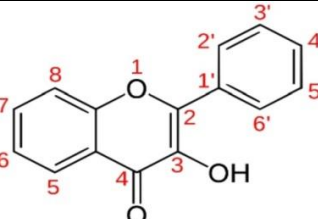
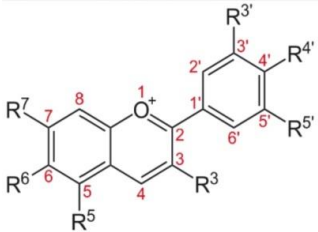
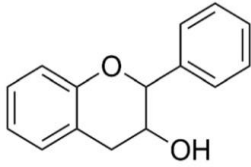
### 2.2.1 Structure chimiques et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous la même Structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Balentine et al., 2005**). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (**Emerenciano et al., 2007**), en formant une structure de type diphenylepropane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Fig.03) (**Narayana et al., 2001 ; Malešev et Kuntić, 2007**).



**Figure 03** : Structure de base d'un flavonoïde.

**Tableau 03:** Les principales familles des flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001 ; Massimo *et al.*, 2007 ; Malešev *et al.*, 2007).

Famille	Exemple	Structure	Source de nourritures
<b>Flavones</b>	Apigénine, Lutéoline		Les oignons, les pommes, le brocoli, les baies et persil
<b>Flavanones</b>	Naringénine, Butine		Les agrumes
<b>Flavonols</b>	Kaempférol, Isorhamnetine, Quercétine, Myricétine		Le thé vert et noir, le vin rouge, oignons et tomate
<b>Anthocyanidines</b>	Cyanidine, delphicianidine, pelargonidine, péonidine, petunidine		Les fraises, les baies, les raisins, le vin et le thé
<b>Flavone-3-ol= Flavanol</b>	Catéchine, gallocatechine, Epicatechine, Gallate		Chocolat, abricot

## ➤ Polyphénols sous forme de polymères

### 2.3 Tanins

Tanins (ou tanins) sont des composés d'origine végétale qui appartiennent à la famille des polyphénol (**Berthod *et al.*, 1999**) solubles dans l'eau (**Akiyama *et al.*, 2001**), selon (**Cowan, 1999**), leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Da. Ils ont la capacité de transformer la peau fraîche en un matériau imperméable : le cuir. Cette propriété de tannage (comme son nom l'indique) est causée par la formation de liaisons entre la molécule de tanin et les fibres de collagène dans la peau.

Cette classe de molécules a des propriétés uniques, telles que la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Reed, 1995 ; Sereme *et al.*, 2010**). Ils peuvent être liés à la cellulose et à une variété de minéraux (**Muanda, 2010**). Les tanins présentent aussi des propriétés antiseptiques, antibiotiques, astringentes, anti-inflammatoires, anti diarrhéiques, hémostatiques et vasoconstrictrices (**Ali-dellile, 2013**).

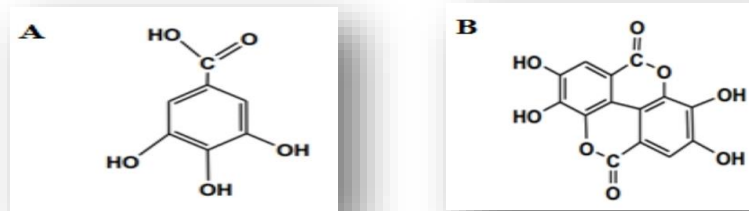
D'après (**Tondi *et al.*, 2013**) les tannins jouent également un rôle dans la protection des plantes contre la lumière UV et les radicaux libres, la défense contre les agents pathogènes (animaux, insectes, champignons et bactéries). En plus ils sont connus comme des agents protecteurs de quelques plantes contre la sécheresse due aux différents mécanismes moléculaires (**Pizzi et Cameron, 1986**). Sur le plan structurel les tanins sont divisés en 2 catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Haslam, 1994 ; Clifford et Scalbert, 2000 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000**).

#### 2.3.1 Tanins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Les oses trouvés dans ces tanins sont surtout représentés par le glucose, ces tanins sont de deux types :

- ✚ Les tanins galliques qui sont les esters d'oses (glucose) et d'acides galliques.
- ✚ Les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques.

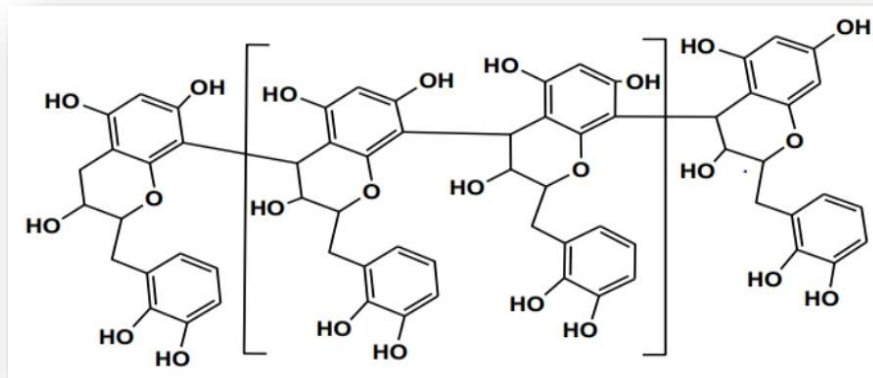
Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide ellagique (Fig.04) (**Boudjellal, 2008**).



**Figure 04 :** Structure de base des tanins hydrolysables; (A) l'acide gallique ; (B) l'acide éllagallique (Cresitini et Langue, 2015).

### 2.3.2 Tanins condensés

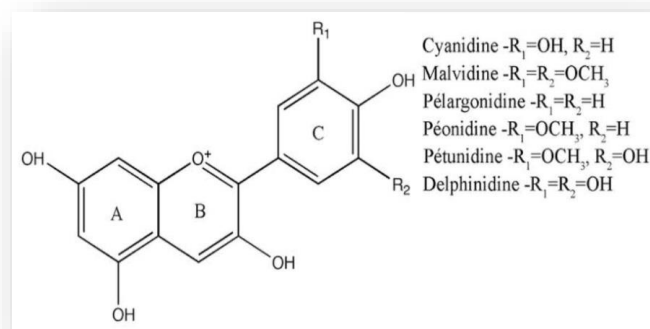
Il s'agit des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons carbonées fortes, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (Hopkins, 2003). L'absence de sucre caractérise les tanins condensés (Fig.05) (Allal, 2016).



**Figure 05 :** Structure chimique des tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

## 2.4 Anthocyanes

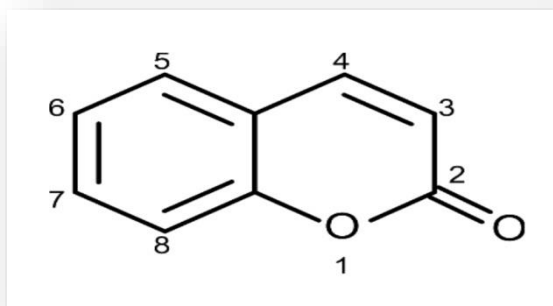
Le terme "anthocyanes" provient du (grec anthos = fleur et kianos = bleu) (Amrani Joutei et Gloris, 1994). Les anthocyanes sont des pigments issus du métabolisme des flavonoïdes. Ils sont responsables de la couleur des feuilles et fruits auxquels ils donnent leur teinte bleu, violet et pourpre (Bruneton, 1993). Ils sont localisés dans les vacuoles de cellules de l'épiderme. Les antioxydants connus comme anthocyanes jouent un important rôle dans l'élimination des radicaux libres de l'organisme (Fig.06) (Jackman et Smith, 1996).



**Figure 06** : structure de base des anthocyanes.

## 2.5 Coumarines

Les coumarines sont le plus souvent englobées dans l'étude des flavonoïdes. La coumarine (1,2-benzopyrone) est un composé d'origine naturelle, qui peut être trouvé dans une large gamme de plantes notamment dans les racines. Environ 1620 dérivés de coumarine sont isolés à partir d'une variété d'espèces végétales et microbiennes (**Constanze *et al.*, 2015**). Elles sont caractérisées par une structure qui comporte le noyau benzo- $\alpha$  pyrone, ce sont des molécules qui se composent d'un noyau benzénique relié à un noyau pyrone (**Jain et Himanshu, 2012**). Ils sont cependant le résultat de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxycinnamique (Fig.07).



**Figure 07** : Structure de base des coumarines (**Harkati, 2011**).

## 2.6 Lignines

Les lignines sont les principaux composants de la paroi cellulaire (**Ralston *et al.*, 2005**). Ils forment une structure hétérogène et agissent à la fois sur le maintien de l'intégrité structurale de celle-ci. Ainsi qu'un échafaudage pour les polysaccharides. Les polysaccharides augmentent le caractère hydrophobe de la structure de la lignine, ce qui facilite le transport de l'eau dans les tissus, en empêchant l'absorption d'eau (**Holderness *et al.*, 2008**). La lignine est un très grand polymère,

insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations (Fig.08) (Sakagami *et al.*, 2005).

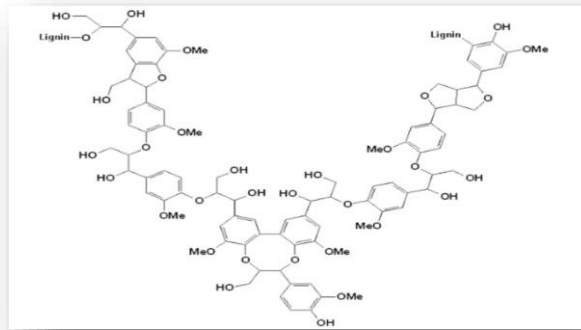


Figure 08 : Structures chimiques de lignine (Scalbert et Williamson, 2000).

### 3 Saponosides

Le terme saponosides est dérivé de mot savon, sont des terpènes glycolysés comme ils peuvent aussi se trouver sous forme aglycones, ils ont un goût amer et acre (Hopkins, 2003). Ils existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes (Fig.09) (Iserin *et al.*, 2001).

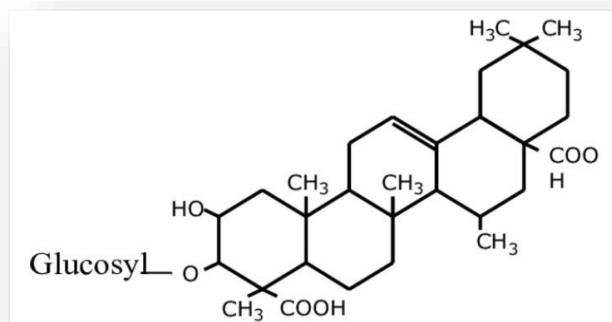


Figure 09 : Structure des saponosides.

### 4 Terpènes

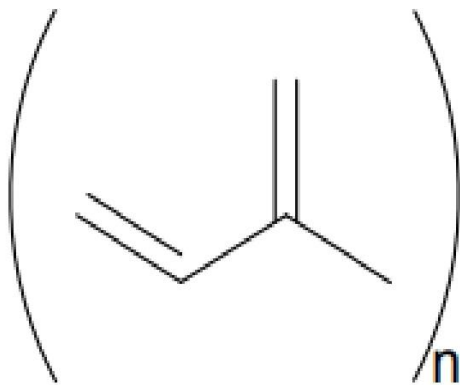
Ces substances sont appelées également trapénoïdes, Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est  $(C_5H_X)_n$  dont le  $x$  est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et  $n$  peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule  $C_5H_8$ . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

(Maurizid et Werner, 1988). Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (Tab.04).

**Tableau 04** : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes (Belbache, 2003).

N	Classe		Exemple
1	C5	Hemiterpène	Isoprène
2	C10	Monoterpène	Nérol, myrcène
3	C15	Sesquiterpène	La chaîne de la chlorophylle, vitamine E
4	C20	Diterpène	Huiles essentielles
6	C30	Triterpène	Phytostérols
8	C40	Tétraterpène	Caroténoïdes
>8	>40	Polyterpène	Protéines, cytoquinine

Isoprène = terpène



## 5 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont parmi les composés les plus importants en raison de leurs propriétés pharmacologiques et médicinales.

En 1803, DEROSNE a isolé le premier semi alcaloïde (Papaver somniferum), une drogue qui a été utilisée pour des siècles pour sa propriété analgésique et narcotique. En 1805, SERTURNER a caractérisé cet alcaloïde et l'a nommé morphine (Walton et Brown, 1999).

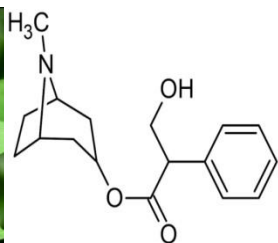
Le terme d'alcaloïde est dû au pharmacien MEISSMER (1792-1853), pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases (Salle, 1991). D'après Relouzat et Thiollot (2002), un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin, présentant une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont une activité pharmacologique significative.



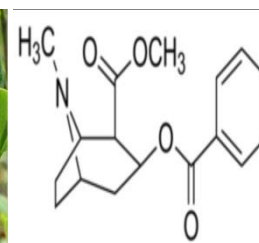
Selon Ngobum *et al* (2009), ils sont généralement insolubles ou très peu solubles dans l'eau, par contre ils sont solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires.

On peut classer les alcaloïdes en trois classes (Bruneton, 2009) :

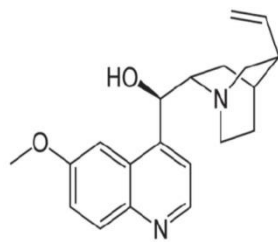
- **Les alcaloïdes vrais** : ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles doses. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, ou combinés avec tanins.
- **Les proto-alcaloïdes** : ce sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Ils dérivent aussi d'acides aminés.
- **Les pseudo-alcaloïdes** : ils ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs dérivés.



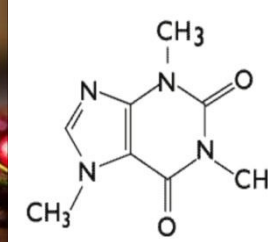
Atropine



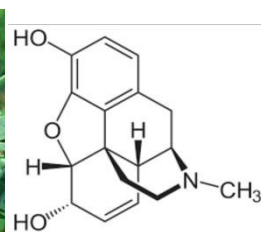
Cocaïne



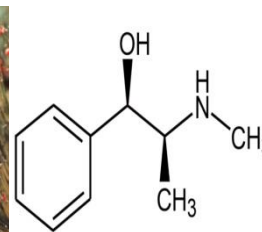
Quinine



Caféine



Morphine



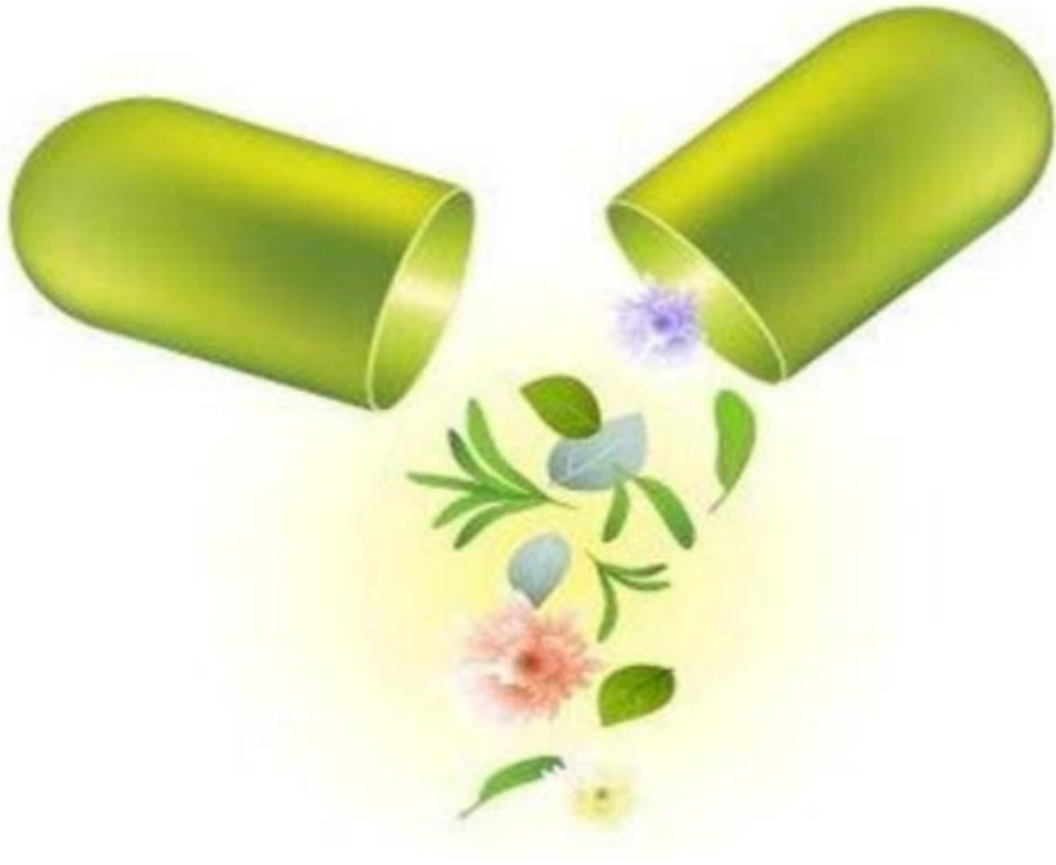
Ephédrine

**Figure 10:** Quelques exemples des alcaloïdes (Badiaga, 2011).**6 Activités biologiques des composés phénoliques**

Les principales activités biologiques des composés phénoliques sont représentées dans le tableau suivant (Tab.05) :

**Tableau 05 :** Les activités biologiques des composés phénoliques (Bahorun, 1997).

<b>Polyphénols</b>	<b>Activités</b>	<b>Exemple de plantes</b>
<b>Acides phénols (Cinnamiques et benzoïques)</b>	Antibactériennes	<i>Paronychia argentea</i> <b>(Bouanani et al., 2010)</b>
	Antifongiques	<i>Daphne gnidium</i> <b>(Cottiglia et al., 2008)</b>
	Antioxydantes	<i>Tamarix pauciovulata</i> <b>(Younos et al., 2005)</b>
<b>Coumarines</b>	Protectrices vasculaires antioedémateuses	<i>Calendula officinalis</i> <b>(Kabera et al., 2000)</b>
<b>Flavonoïdes</b>	Anti inflammatoires Anti tumoraux	<i>Haloxylon scoparium</i> <b>(El-Shazli et al., 2005)</b>
	Anti oxydantes	<i>Thymelaea hirsute</i> <b>(Dohou et al., 2003)</b>
	Hypotenseurs et diurétiques	<i>Malva parviflora</i> <b>(Boual et al., 2013)</b>
<b>Anthocyanes</b>	Protectrices capillaro-veineux	<i>Inula crithmoides</i> <b>(Belloum et al., 2013)</b>
<b>Tannins galliques et catéchiques</b>	Anti oxydantes	<i>Capparis Spinosa</i> <b>(Meddour et al., 2013)</b>



*CHAPITRE 3 : Quelques Activités Biologiques  
Des Métabolites Secondaires Des Plant*

# 1 Activité antibactérienne

## 1.1 Généralités

Les maladies infectieuses causées par les bactéries, champignons, virus et parasites demeurent à ce jour une menace pour la santé publique. Les substances antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiés du fait de leur importance en thérapie humaine. Depuis leur découverte par Fleming en 1928, les antibiotiques sont devenus indispensables aux systèmes de santé, aidant et complétant le fonctionnement du système immunitaire contre les microbes pathogènes. Depuis, l'humanité a connu un succès historique dans le contrôle de la morbidité due aux maladies infectieuses à travers l'antibiothérapie.

Les antibiotiques sont des substances d'origine biologique ou synthétique capable d'inhiber la multiplication des bactéries. Ce sont des médicaments d'usage courant qui constitue un arsenal thérapeutique important pour traiter les infections bactériennes. Leur évaluation se fait par le biais de méthode d'étude de trois sortes, *in-vitro*, *in-vivo* et clinique (**Benabdallah, 2012**).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une sources d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Billig et Sherman, 1998**), sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire (**Cowan, 1999**).

## 1.2 Les Bactéries

Les bactéries sont connues depuis 1676 (Leeuwenhoek), il s'agit des microorganismes Unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. De façon résumée, la cellule bactérienne se distingue de la cellule animale par sa petite taille, par la présence d'une paroi rigide contenant un polymère particulier, le peptidoglycane, par le caractère haploïde de son génome et par l'absence de mitochondries. La coloration de Gram permet de séparer les bactéries en deux catégories dont la paroi est de structure différente.

On peut classer les bactéries grâce à la coloration de gram, qui distingue deux types de bactéries :

**a) Les bactéries à gram positif :** Sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de gram. Les bactéries à gram positif apparaissent alors mauves au microscope.

**b) Les bactéries à gram négatif** : Sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de gram. Les bactéries à gram négatif apparaissent alors roses au microscope.

### 1.3 Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité d'un produit sur une souche bactérienne consiste à le mettre en contact tout en observant les conséquences sur le développement et la survie de la culture bactérienne. Beaucoup de techniques ont été mises en évidence aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide.

#### 1.3.1 Méthode par diffusion

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'évaluation du pouvoir antibactérien d'extraits de plantes, d'huiles essentielles ou de produits purs, parmi elles :

##### ➤ Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

C'est la plus simple, elle consiste àensemencer sur une surface d'une gélose par inondation de la souche à tester, puis à déposer des disques en papier buvard (filtre) comprenant le produit à une certaine concentration, c'est une méthode basée sur la diffusion des substances à tester selon un gradient de concentration.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, le résultat se traduit par l'apparition de zone d'inhibition de la croissance, à proximité de chaque disque.

La zone d'inhibition est mesurée par son diamètre en mm.

##### ➤ Méthode de diffusion à partir des puits

Le principe de cette méthode est similaire à celui de la méthode des disques, il consiste à réaliser des puits dans la gélose de 2,5 mm de profondeur, qui sont par la suite remplis d'extraits ou d'antibiotique à tester (**Carbonnelle, 1988 ; Colins et Lync, 1976 ; Vandepitte *et al.*, 1994**).

La lecture des zones d'inhibition se fait de la même manière que dans la méthode des disques.

#### 1.3.2 Méthode de dilution

Cette méthode a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Oussou *et al.*, 2008 ; Derwich *et al.*, 2010**).

### 1.4 La nature de l'activité antibactérienne

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets :

- une activité létale (bactéricide), c'est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.
- une inhibition de la croissance (bactériostatique), c'est l'inhibition momentanée de la multiplication d'une population. (**Hammer, 1999**)

L'activité biologique d'un extrait végétal est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques (**Dorman, 2000**).

### 1.5 Mode d'action contre les bactéries

Les extraits possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, ils sont efficaces contre un large spectre de microorganismes pathogènes et non pathogènes mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (**Dorman, 2000**) :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

## 2 Activité Antifongique

### 2.1 Les champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes sont des espèces de champignons parasites qui provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes. Ces champignons appartiennent au règne des eumycocètes, regroupant un large éventail de groupe des organismes pluricellulaires qui sont les moisissures.

Les champignons restent de potentiels producteurs de mycotoxines (**Quillien, 2002**) et elles sont moins sensibles que les bactéries aux conditions du milieu et résistent bien aux conditions acides du sol (**Delahaye et al., 2011**).

Plusieurs moisissures, notamment les genres *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* et *Fusarium* sont connus pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**).

## 2.2 La nature de l'activité antifongique

Pour déterminer la nature de l'activité antifongique (fongicide ou fongistatique), nous prélevons des spots au niveau de la zone d'inhibition. Ils sont ensuite déposés au niveau d'un milieu neuf. S'il y a sporulation, l'activité est fongistatique. S'il n'y a pas de sporulation, l'activité est de type fongicide.

## 2.3 Mécanismes de défense

La plante atteinte développe une série de barrières mécaniques et biochimiques pour lutter contre le parasite (**Beckman, 1988**).

### 2.3.1 Les barrières mécaniques

Quand le parasite pénètre par les racines, un brunissement de quelques cellules du parenchyme ligneux voisin de la partie du vaisseau infecté apparaît. Cette réaction est suivie par la formation de thylls, sécrétion gommeuse permettant à la plante d'isoler l'agent pathogène en obstruant le vaisseau envahi avant que le filament mycélien ne produise des conidies.

Si cette réaction tarde à venir, l'infection par les conidies se généralise et se propage à plusieurs vaisseaux entraînant la mort de la plante par gommose, thyllose, et hyperauxinie générale. Les symptômes externes de la maladie reflètent le degré de l'invasion des vaisseaux vasculaires par les filaments mycéliens (**El Mahjoub, 1984**).

### 2.3.2 Les barrières biochimiques

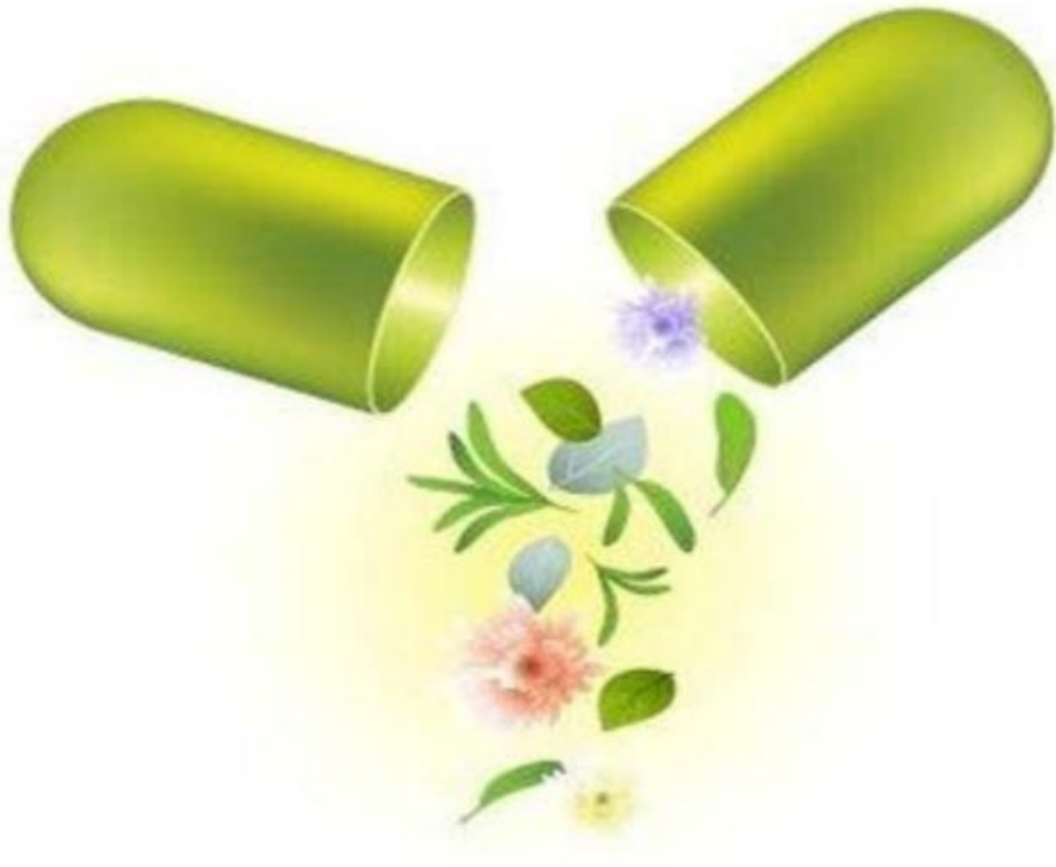
Deux substances biochimiques sont élaborées par la plante dès l'attaque du parasite (**Henni, 1998**).

#### ✓ Les polyphénoloxydases

Ce sont des enzymes à base de cuivre, elles sont activées en cas de blessures et interviennent dans l'oxydation des composés phénoliques de la plante et contribuent avec les cellules du parenchyme à la formation des thylls (**Messiaen, 1981**).

#### ✓ Les phytoalexines

Ce sont des métabolites antimicrobiens synthétisés et accumulés par des plantes en réponse à des infections fongiques, bactériennes, virales et à d'autres facteurs de stress (**André, 1979**). Leur rôle est de freiner la progression du parasite à l'intérieur des vaisseaux. Ride et Drysdale, 1971 indique que dans le cas d'infection d'une plante de tomate, une relation s'établit dès les premiers jours de l'agression entre la concentration de tomatine (substance inhibitrice) et le blocage de l'agent pathogène (**Henni, 1997**).



## *PARTIE EXPERIMENTALE*



# *CHAPITRE 1 : Matériel et Méthodes*

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Les travaux actuels ont consisté à étudier l'activité antibactérienne et antifongique des trois extraits de plants du genre *Centaurea*, en l'occurrence : *Centaurea papposa* et du genre *Punica*, en l'occurrence : *Punica granatum* L. Le but est de développer de nouveaux antibiotiques et antifongiques naturels qui n'ont pas d'effets nocifs sur l'homme par rapport à leurs homologues synthétiques.

Ces deux plants médicinaux ont été choisis parmi tous d'autres pour leur caractère médicinal, leur grande utilité dans la population et leurs vertus médicinales intéressantes.

## **1 Préparation du matériel végétal**

### **1.1 Séchage et broyage**

Une fois les plantes récoltées, leurs parties aériennes (feuilles) ont été séchées dans un endroit sec et bien ventilé, à l'abri de la lumière du soleil et de l'humidité pendant 15 jours.

Le matériel végétal a été ensuite broyé à l'aide d'un broyeur mécanique de type «Moulinex»

Après broyage la poudre obtenue a été soumise à une extraction afin de récupérer les différentes classes de composés chimiques contenus dans les feuilles de la plante pour des tests phytochimiques et biologiques.

### **1.2 Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.**

#### **1.2.1 Extraction par macération**

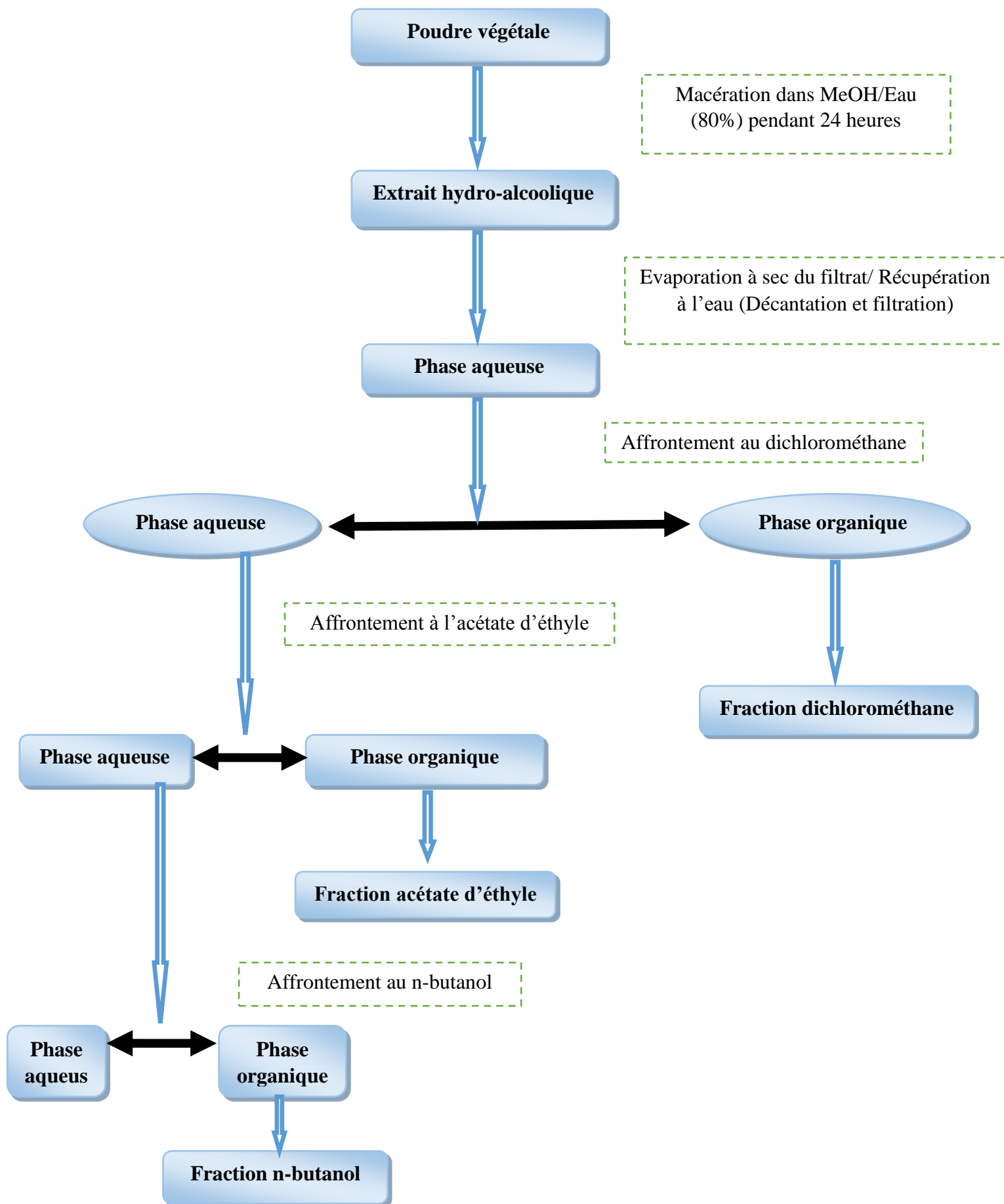
La poudre végétale a été soumise à une extraction solide/ liquide par macération. 50 grammes de la poudre ont été macérée dans 400 ml de méthanol 80 % à température ambiante et sous agitation continue pendant 24 heures. Ensuite le macérât a été filtré à l'aide d'un coton, puis le solvant d'extraction (méthanol) a été évaporé à sec sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Buchi R-215. Cette étape a été répétée plusieurs fois dans les mêmes conditions.

#### **1.2.2 Extraction par macération à l'eau (phase aqueuse)**

L'extrait brut (MEOH) obtenu a été introduit dans un erlenmeyer et macéré dans 500 ml d'eau distillée pendant 24h à température ambiante. Après la solution est soumise à une agitation mécanique jusqu'à ce qu'elle devienne homogène, puis elle est filtrée sur papier filtre, le filtrat est soumis à un fractionnement par des solvants organiques de différentes polarités (**Sanogote al., 2006**).

### 1.2.3 Fractionnement de la phase aqueuse

Le fractionnement de la phase aqueuse a été effectué en utilisant trois solvants à polarité croissante (dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le n-butanol). Premièrement la phase aqueuse a été mélangée avec le dichlorométhane (3V/V). Après séparation, la phase organique a été récupérée et la phase aqueuse est traitée avec l'acétate d'éthyle (3V/V). L'acétate d'éthyle est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc). La phase aqueuse est soumise à un autre fractionnement par le n-butanol en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'acétate d'éthyle, pour donner à la fin la fraction du Butanol (EBut). Les extraits sont conservés à 4°C (Fig.01) (**Zhang *et al.*, 2008**).



**Figure 01** : Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.

## 2 Activités biologiques

### 2.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans les boîtes de Mueller Hinton refroidies, nous avons inoculé les boîtes avec cinq souches bactériennes, 6 boîtes par souche (pour *Centaurea papposa*), et 4 boîtes par souche (pour *punica granatum* L) de façon à recouvrir toute la surface de la gélose. Après 20 minutes, nous avons déposé 04 disques stériles (considérés comme des répétitions), dans chaque boîte sur lesquels nous avons appliqué 10µl d'extrait à tester. Ensuite, nous avons amené les boîtes à l'incubation à 37 °C pendant 24h. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition avec une règle, qui a été obtenue par les différents extraits autour des disques.

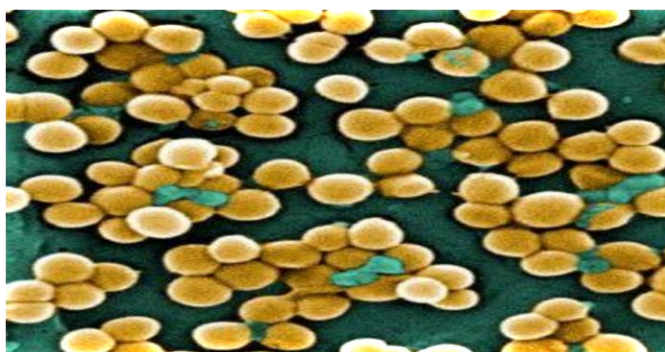
#### 2.1.1 Les souches bactériennes testées

Le choix des microorganismes a été porté sur cinq souches fréquentes en pathologie humaine, nous avons sélectionné deux groupes de bactéries : les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

##### A. Bactéries Gram (+) :

##### + *Staphylococcus aureus*

Appartient à la famille des Micrococcaceae. C'est un coccus à Gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulé, ubiquitaire présente dans tous les milieux naturels (air, poussière, sol, eau, égouts, vêtements) mais également chez les animaux et chez les hommes (**Clave, 2013**). Ce sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas, diamètre moyen 0,8 à 1µm (**Le Loir et Gantier, 2009**). La présence de *S. aureus* dans les aliments constitue un risque pour la santé humaine parce que certaines souches sont capables de produire des entérotoxines, dont l'ingestion provoque une intoxication. Les entérotoxines agissent au niveau des nerfs du tube digestif qui stimulent le centre des vomissements; douleurs abdominales; diarrhées; crampes (Fig.02) (**Green, 2012**).



**Figure 02 :** *Staphylococcus aureus*

### *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* est une bactérie Gram positif, que l'on trouve habituellement dans le sol, mais c'est surtout une espèce ubiquitaire. Elle a pour forme cellulaire des bâtonnets droits à bout arrondis, sporulée, aérobie stricte, constitue une coque protectrice dure (Michikoet *al.*, 1998), elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, Les bacilles sont en outre commune une source d'enzymes industrielles tell les amylases, utilisée dans l'industries du pain, ou encore des protéases et cellulases, dans l'industries des détergentes et dans l'industries agro-alimentaire (Fig.03) (Cui *et al.*, 2018).

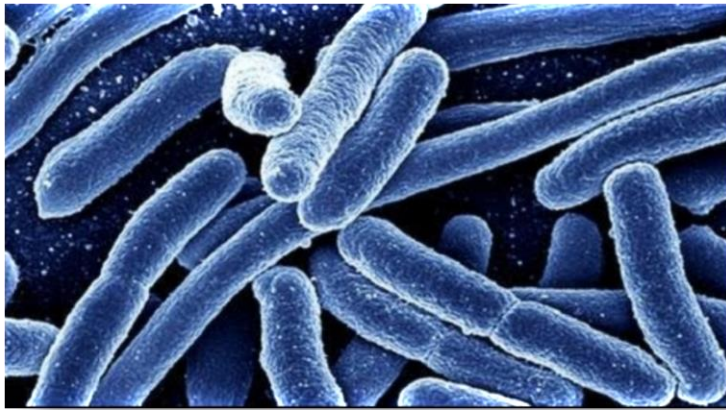


**Figure 03 :** *Bacillus sibtilis*

### **B. Bactéries Gram (-) :**

#### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (appelée également *E.coli*) est un bacille à coloration de Gram négative, mobile, aérobie qui appartient à la famille des *Entérobactéries*. Cette bactérie présente la caractéristique unique d'être à la fois un germe commensal de la flore intestinale présent chez tous les individus a des taux de  $10^6$  à  $10^9$  ufc/g de selles et le premier germe pathogène responsable d'infection communautaire. Cette bactérie est utile parce qu'elle favorise la production de certaines vitamines et dégrade certains aliments qui seraient autrement impossible à digérer. Certaines souches peuvent être pathogènes et à l'origine de gastroentérites, infection urinaires, méningites ou septicémies. Les souches non pathogènes constituent la flore bactérienne dominante des intestins de leur hôte (Fig.04) (Zeyons, 2008).



**Figure 04 :** *Escherichia coli*

#### ✚ *Proteus vulgaris*

*Proteus vulgaris* est une bactérie Gram négative en forme de bâtonnet qui habite le tractus intestinal des humains et des animaux. On peut la trouver dans le sol, l'eau et les matières fécales. Elle fait partie du groupe des entérobactéries et est un pathogène opportuniste de l'homme. Il est connu pour causer des infections des voies urinaires et des infections des plaies (Fig.05) (Lee *et al.*, 2017).



**Figure 05 :** *Proteus vulgaris*

#### ✚ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *P.aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries mesurent de 1,5 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de vol moucheron. *P.aeruginosa* ne forme ni des spores ni des sphéropastes. Elles sont responsables de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant

le 3<sup>ème</sup> rang après *E.coli* et *S.aureus*, mais le 1<sup>er</sup> rang pour les infections pulmonaires basses et le 3<sup>ème</sup> rang pour les infections urinaires (Fig.06) (Richard et Kiredjian, 1995).



**Figure 06:** *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.1.2 Méthode de diffusion sur disques

L'activité antibactérienne de nos extraits vis-à-vis les cinq souches a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé selon le protocole décrit par (Biondi *et al.*, 1993).

#### ❖ Principe

C'est une technique qui consiste à utiliser des disques de papier imprégné de l'extrait ou de l'antibiotique à différentes concentrations, puis déposé directement à la surface d'une gélose ensemencée au préalable avec une suspension de la bactérie à étudier. La croissance du germe est inhibée à une distance du disque par rapport à sa sensibilité à l'extrait ou à l'antibiotique diffusé. La limite de la zone d'inhibition est détectée à l'œil nu et s'accorde à l'endroit où la croissance bactérienne commence (Bauer *et al.*, 1966). Plus la zone d'inhibition est grande plus la sensibilité de la souche bactérienne testée est grande (Bektas *et al.*, 2003).

L'interprétation de la zone d'inhibition se fait soit par rapport au diagramme de références superposable à la zone d'inhibition, soit à l'aide d'une règle en fonction des diamètres donnée dans un tableau (Ericsson et Sherris, 1971). La souche ainsi qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Bouharb *et al.*, 2015).

Cette méthode est reconnue comme fiable et reproductible, en plus de ça, elle constitue surtout une étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Dima, 2016). Elle permet également de mettre en évidence l'effet



antimicrobien des composées phénoliques et de déduire la résistance et la sensibilité des souches microbiennes (Amara *et al.*, 2017).

- **Mode opératoire**

- 2.1.2.1 Préparation des disques**

On utilise dans cette méthode, le papier filtre découpé sous forme de disques circulaires environ de 6 mm de diamètre, afin d'obtenir une zone d'inhibition facile à mesurer.

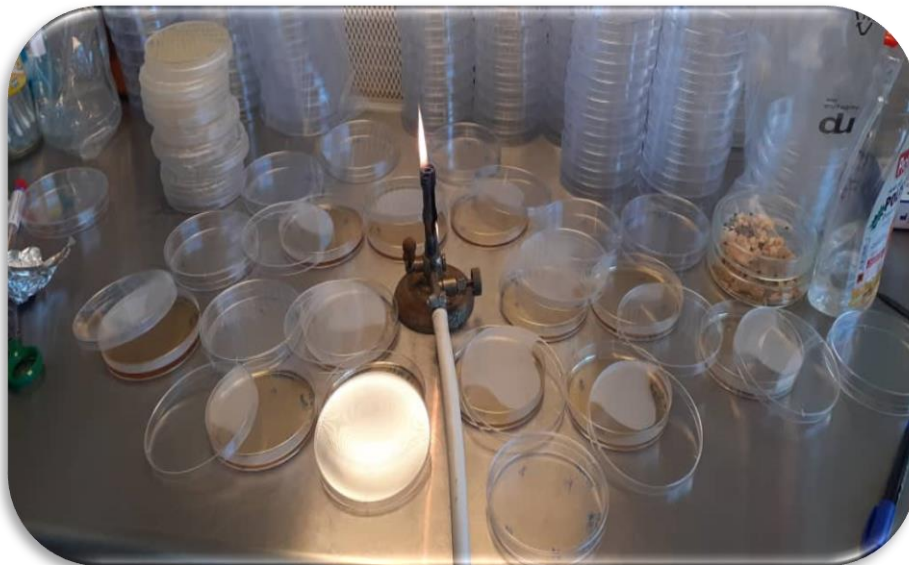
Les disques une fois préparés, sont placés dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave.

- 2.1.2.2 Stérilisation du matériel**

Les matériaux de travail ont été stérilisés en premier, nous avons donc placés des tubes à essai qui seraient utilisés pour la préparation des suspensions bactériennes, les disques de papier filtre (6 mm de diamètre), les Eppendorfs et la gélose dans un autoclave à 121°C pendant 15 min.

- 2.1.2.3 Préparation de milieu de culture**

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu : Muller-Hinton. Dans un bain marie, il faut faire bouillir la gélose jusqu'à dissolution totale. Puis une stérilisation à l'autoclave est nécessaire avant utilisation. Enfin couler le milieu dans les boîtes de pétri et laisser refroidir et solidifier à température ambiante pendant 10 à 15 min (Fig.07).



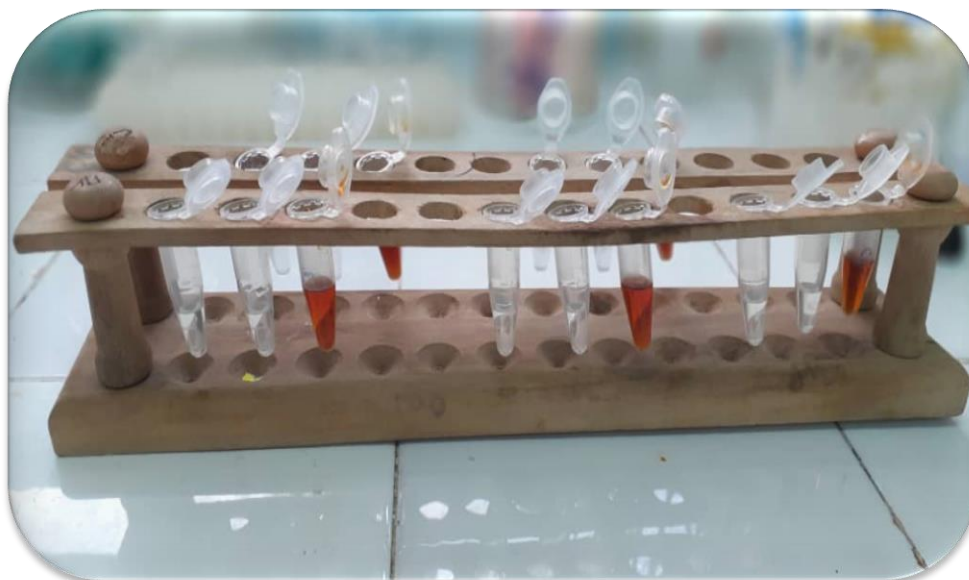
**Figure 07:** Préparation de milieux de culture.

Pour les solvants nous avons utilisé :

- L'eau physiologique stérile : NaCL (9g/L), pour préparer et diluer les suspensions bactériennes
- DMSO : pour solubiliser l'extrait de (n-butanol et acétate- dethyl et de dichlorométhane)
- L'eau distillée stérile.

#### 2.1.2.4 Préparation des dilutions d'extrait des plantes

Les extraits des plantes obtenus ont été dissouts dans le diméthyle-sulfoxyde (DMSO). Après l'agitation, ils ont été filtrés par des micro-filtres de 0,22  $\mu\text{m}$ , pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 100 mg/ml (Fig.08).



**Figure 08:** Préparation des délutions

#### 2.1.2.5 Préparation de l'inoculum

##### ✓ Préparation des pré-cultures

Les souches bactériennes à tester sont cultivées dans des boites de Pétri contenant de la GN et incubées pendant 24h à une température de 37C° afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées.

### ✓ Préparation de la suspension bactérienne

À partir d'une culture jeune de 24h sur GN, Cinq colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une anse de platine stérile qui ont été par la suite déchargées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

La suspension bactérienne ainsi préparée est homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm.

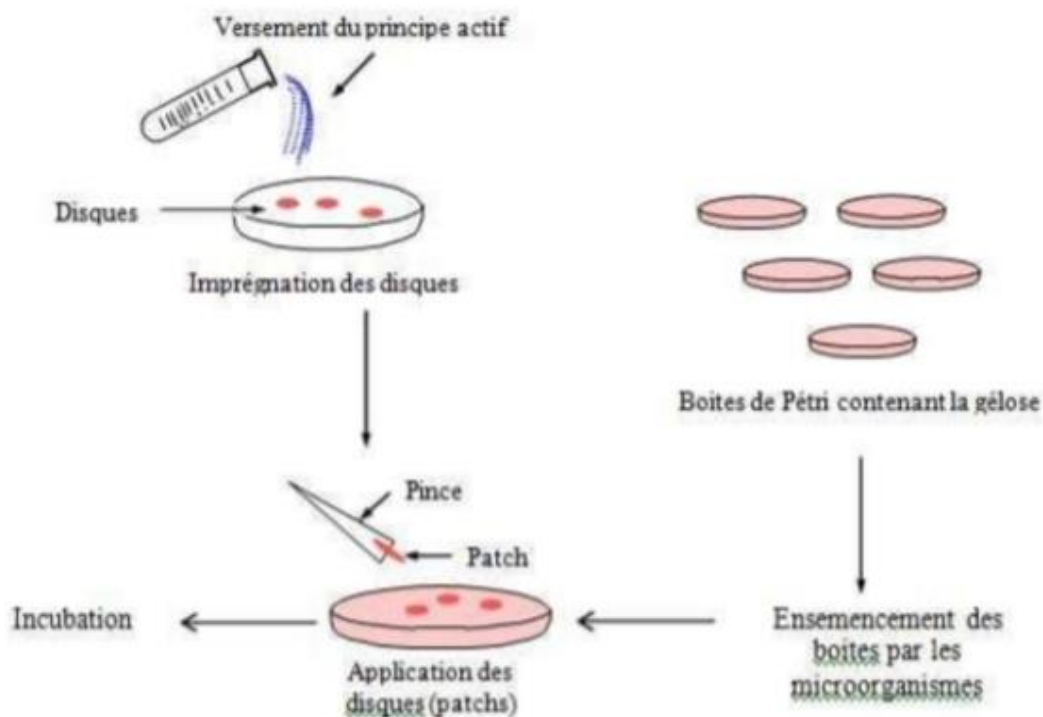
L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum (**Ericsson et sherris, 1971**).

#### 2.1.2.6 Ensemencement

Dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne. Puis On l'essor en le pressant fermement contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. L'écouvillon est frotté trois fois sur toute la surface gélosée, en tournant chaque fois la boîte de 60° de façon à assurer un ensemencement uniforme (**Ericsson et sherris, 1971**).

#### 2.1.2.7 Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, les disques sont imprégnés de 10ul d'extrait à tester et les disques de témoin négatif sont imprégnés des DMSO, Soigneusement prélevés, déposés sur la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne. Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et mises au frigo pendant 1h pour la diffusion de l'extrait, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h. L'expérience est répétée deux fois pour chaque extrait et pour chaque espèce bactérienne (Fig.09).



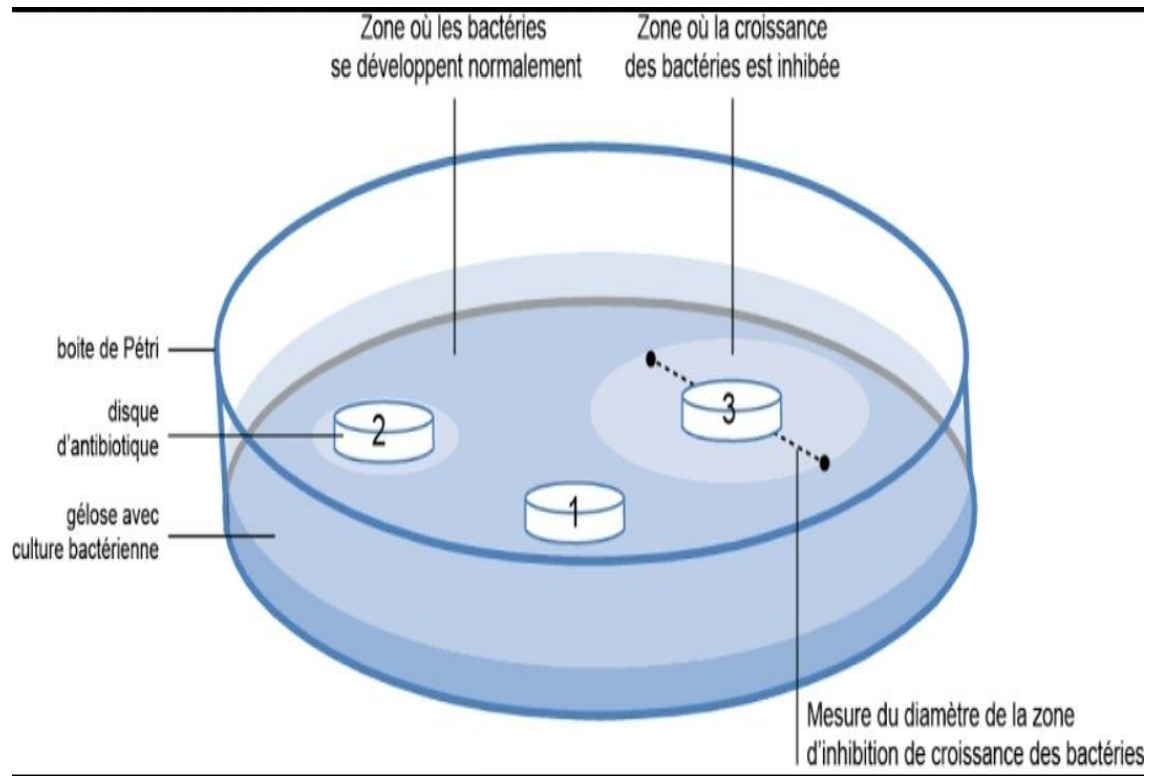
**Figure 09 :** Protocole du test de l'activité antimicrobienne des extraits.

### 2.1.2.8 La lecture

La lecture des résultats s'est faite 24 heures après l'incubation, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque (montré par la fig.10) à l'aide d'une règle en (mm). Le diamètre détermine l'efficacité de la matière active.

Après mesure de la zone d'inhibition, les souches sont classées en :

- Non sensible (–) ou résistante : diamètre moins de 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre plus de 20 mm. (**Ponce *et al.*, 2003**).



**Figure 10 :** Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques (Zaiki, 1988).

## 2.2 Evaluation de l'activité antifongique

Notre expérimentation a pour objectif d'évaluer l'activité fongicide de quatre (4) extraits à partir de deux plantes appartenant à deux familles botaniques différentes : *Centaurea papposa* (*Astéraceae*) et *Punica granatum* L (*Lythraceae*).

La technique utilisée afin de déterminer l'activité antifongique c'est la méthode de diffusion à partir des puits. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire de l'extrait à tester sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antifongique de l'extrait à tester sur les champignons, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces champignons vis-à-vis de cet extrait.

Cette méthode consiste à faire des puits remplis d'une quantité d'extrait à la surface de la géloseensemencée par l'inoculum fongiques à tester et de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) après incubation.

La lecture des zones d'inhibition se fait de la même manière que dans la méthode des disques.

### 2.2.1 Les souches fongiques utilisées

Dans le présent travail l'activité antifongique des différents extraits des plantes a été évalué sur la croissance de trois (3) espèces des champignons phytopathogènes appartiennent au genre *Fusarium* qui sont : *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*.

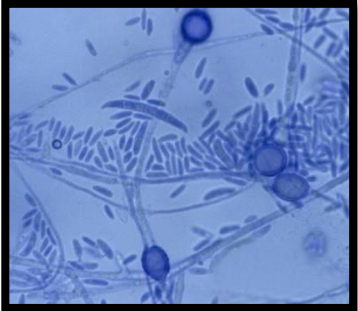


Les souches ont été isolées et fournies par Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Le choix des souches est basé sur plusieurs paramètres en particulier pour leur pathogénicité et leur résistance naturelle à divers agents antifongiques synthétiques actuels. La systématique des souches étudiées est représentée dans le Tableau 01.

- **Le Genre *Fusarium***

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (**Benhamou *et al.*, 1997**). Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Ils sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruit et dans la dégradation du système vasculaire. Ils sont responsables des fontes de semis et contaminent les sols (**Trenholm *et al.*, 1988**).

Tableau 01 : Souches utilisées et leur classification

Souches utilisées	Taxonomie	Photographies
<i>Fusarium oxysporum</i>	<b>Division:</b> <i>Thallophytes</i> <b>Classe :</b> <i>Deutéromycètes</i> <b>Ordre :</b> <i>Monodiales</i> <b>Famille :</b> <i>Tuberculariacées</i>	
<i>Fusarium culmorum</i>	<b>Division :</b> <i>Ascomycota</i> <b>Classe :</b> <i>Sordariomycetes</i> <b>Sous-classe :</b> <i>Hypocreomycetidae</i> <b>Ordre :</b> <i>Hypocreales</i> <b>Famille :</b> <i>Nectriaceae</i>	
<i>Fusarium cerealis</i>	<b>Division :</b> <i>Ascomycota</i> <b>Classe :</b> <i>Sordariomycetes</i> <b>Sous-classe :</b> <i>Hypocreomycetidae</i> <b>Ordre :</b> <i>Hypocreales</i> <b>Famille :</b> <i>Nectriaceae</i>	

- **Mode opératoire**

### 2.2.1.1 Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les eppendorfs, les tubes à essai, le réactif de DMSO, les embouts, ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

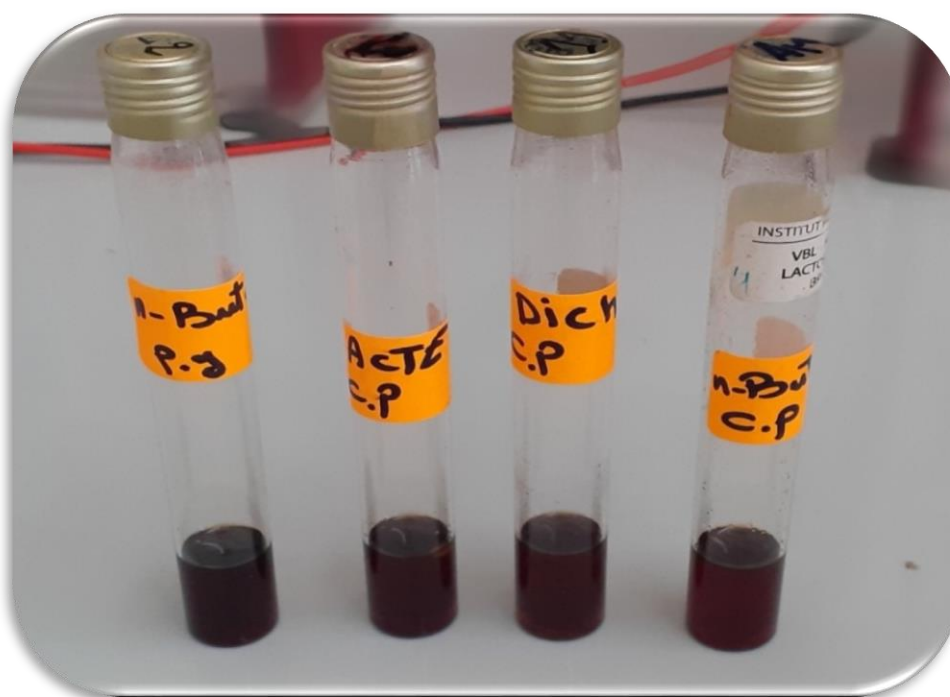
- **Contrôle négatif**

Le Diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant polaire organique (organosulfuré), aprotique, de formule brute C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS.

Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau. Cette solution est utilisée dans notre étude comme témoin négatif. Il n'a aucun pouvoir antifongique puissant.

### 2.2.1.2 Préparation des extraits

Dans cette étude, les solutions stock de nos échantillons sont obtenues par solubilisation de 160 mg de chaque extrait dans 1ml de diméthyle-sulfoxyde (DMSO). Puis le contenu a été agité pour être homogénéisé. Après l'agitation ils ont été filtrés par des micro-filtres de 0,22 µm (Fig.11).



**Figure 11** : Préparation des extraits



### 2.2.1.3 Préparation de champignon

Les isolats de *Fusarium* ont été cultivés sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour être réactivés et incubés durant 30 jours à 27°C à l'obscurité. Ils ont subi des repiquages successifs par la suite.

### 2.2.1.4 Préparation de la suspension fongique

La préparation de la suspension fongique se fait à partir des boîtes où on a repiqué nos souches. Dans le cas de *Fusarium*, on prélève des spores dans 10ml d'eau physiologique, on réalise ensuite un comptage des spores sur la cellule de Malassez. On standardise alors la suspension à  $10^7$  spores/ml.

### 2.2.1.5 Culture des souches fongiques

Le choix d'un milieu de culture adéquat est indispensable au bon développement du pathogène, dans notre expérimentation on a utilisé le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) car il assure de bonnes conditions de cultures pour le *Fusarium*.

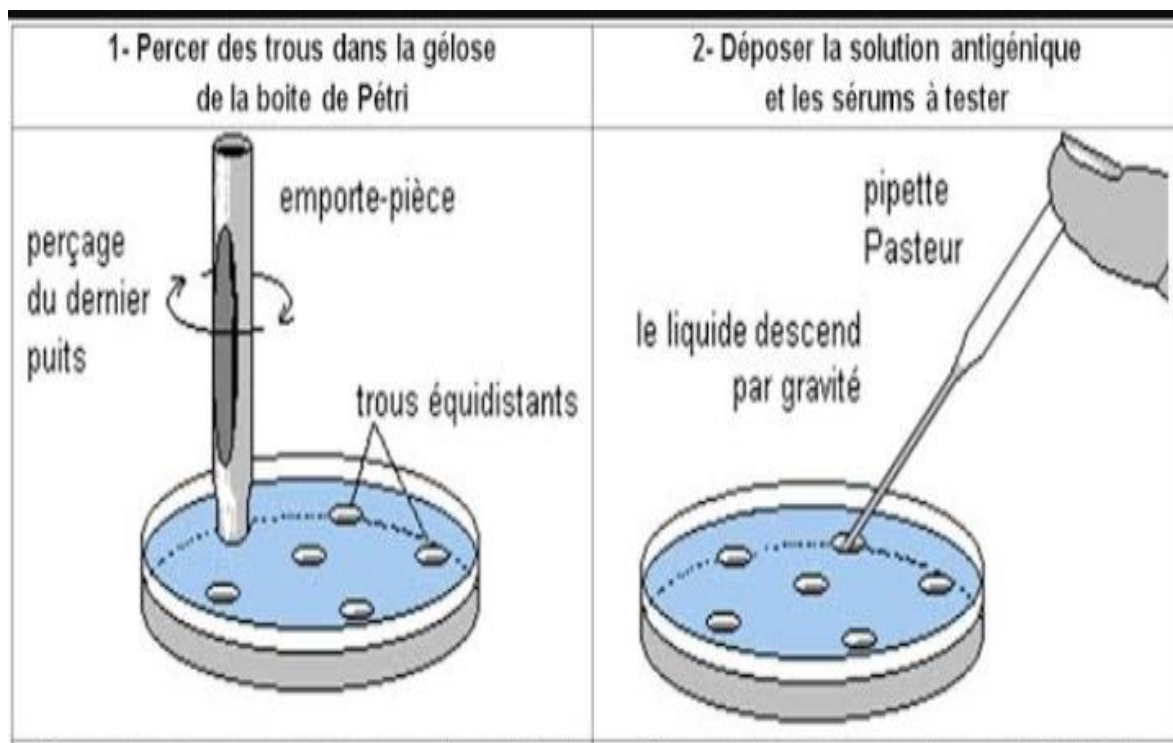
### 2.2.1.6 Mise en œuvre pratique

Couler aseptiquement le milieu de culture PDA dans les boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier, puis on rajoute 150µl de l'inoculum fongique (concentration est ajustée à  $10^7$  germes/ml avec le spectrophotomètre à l'UV-visible) qu'on fait répartir sur le milieu de culture à l'aide d'un râteau afin d'avoir une croissance homogène du champignon.

Creuser au centre de chaque boîte de Pétri 4 puits/boîte, de 8 mm de diamètre à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Dans le but d'éviter la surfusion des extraits sous la gélose, on remplit chaque puits avec 140µl, 70µl, 35µl d'extrait et 140µl pour le DMSO (comme témoin négatif).

L'expérience est répétée trois fois pour chaque espèce fongique et pour chaque extrait afin de minimiser l'erreur expérimentale et garantir un bon déroulement de la méthode.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et mises à l'étuve à la température de 28 °C pendant 48h.



**Figure 12** : Préparation des puits

#### 2.2.1.7 La lecture

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du puits, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis De l'extrait (**Ponce *et al.*, 2003**).

## *CHAPITRE 2 : Résultats et Discussions*

# 1 Activités biologiques in vitro des extraits de *Centaurea papposa* et *Punica granatum* L

## 1.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

Afin de réaliser cette expérience, nous avons évalué *in vitro* le pouvoir antibactérien de trois (3) extraits (n-butanol, dichlorométhane, acétate d'éthyle), de *Centaurea papposa* et *Punica granatum* L par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en terme de diamètre de zone d'inhibition (mm) autour des disques contenant l'extrait à tester contre cinq germes pathogènes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) après 18 à 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Les valeurs indiquées sont les moyennes des deux mesures de diamètres du même essai.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus sont représentés dans les tableaux suivants:

**Tableau 01** : Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea papposa* représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.

<b>Extrait Acéthate d'éthyle/ dilutions</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Esherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>SM</i>	8	11,5	10,5	10,5
$\frac{1}{2}$	7	7,5	7	8,5
$\frac{1}{4}$	6	7	6,5	6,5

**Tableau 02** : Activité antibactérienne d'extrait dichlorométhane de *Centaurea papposa* représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.

<b>Extrait Dichlorométhane/ dilutions</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Esherichera Coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SM	12	15	12	14,5
1/2	9	10	9,5	12,5
1/4	7	7	7	10,5

**Tableau 03** : Activité antibactérienne d'extrait n-butanol de *Centaurea papposa* représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.

<b>Extrait N-Butanol/ dilutions</b>	<i>Bacillus subtili</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Esherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SM	11	10	9,5	12,5	10,5
1/2	9	8	7	10,25	8
1/4	8	7,5	7	8,75	6,5

**Tableau 04 :** Activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane de *Punica granatum* L représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.

<b>Extrait Dichlorométhane/ dilutions</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Esherichia. Coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>SM</i>	11,5	7	14,5	6,5	13,5
$\frac{1}{2}$	10,5	6	12,5	6	10
$\frac{1}{4}$	8	6	10	6	7,5

**Tableau 05:** Activité antibactérienne d'extrait n-butanol de *Punica granatum* L représentée par les diamètres d'inhibition mesurés en mm.

<b>Extrait N-Butanol/ dilutions</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphyloccocu saureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Esherichia. Coli</i>	<i>Pseudomona saeruginosa</i>
<i>SM</i>	16	26,5	16	8,5	17
$\frac{1}{2}$	14,5	19,5	14,5	7,5	14,5
$\frac{1}{4}$	11,5	19	11	6	14,5

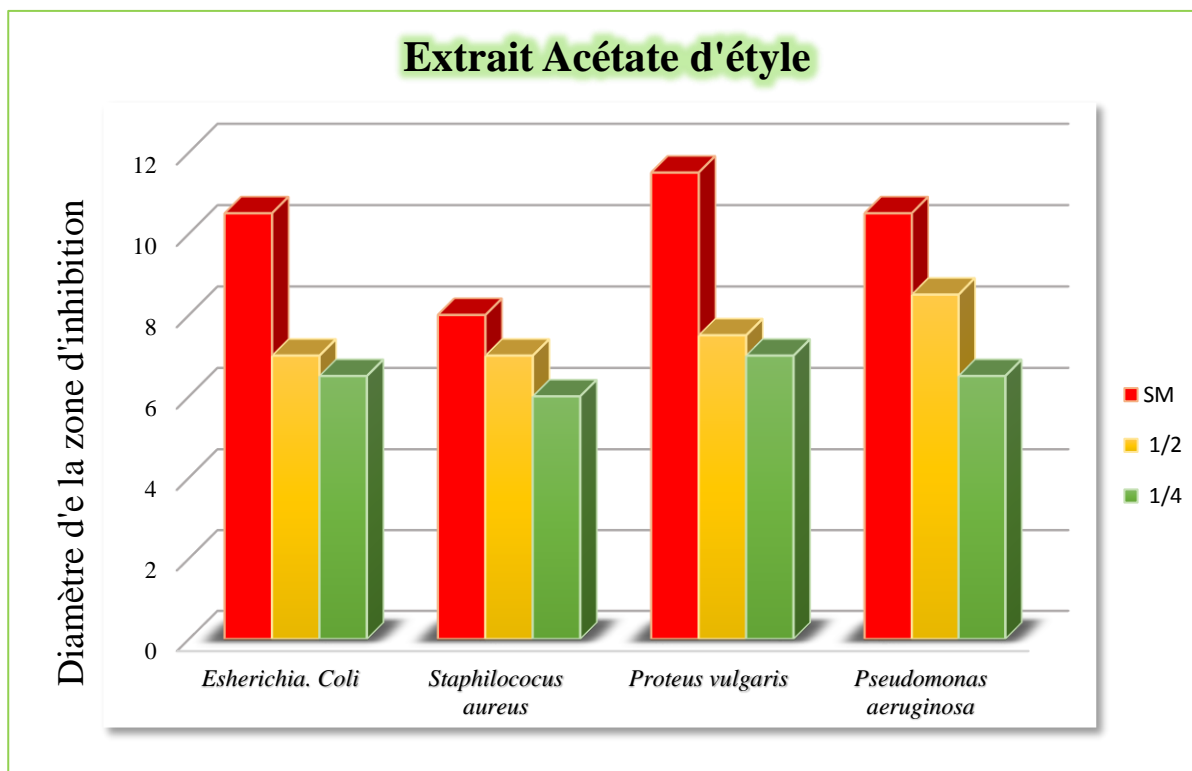
Concernant les extraits utilisés dans cette activité, des zones d'inhibition sont observées indiquant que tous les extraits obtenus par macération ont une activité antibactérienne.

Les diamètres d'inhibition obtenus se trouvent entre 6 à 15 mm pour *Centaurea papposa*, et entre 6 à 26.5 mm pour *Punica granatum* L. Les extraits sont actifs à différents degrés sur l'ensemble des bactéries testées.

- ✓ Pour la plante *Centaurea papposa* :
  - La plus grande zone d'inhibition est celle de l'extrait (dichlorométhane) avec 15 mm de diamètre envers la souche bactérienne (Gram -) *Proteus vulgaris*.
  - La plus petite zone d'inhibition est celle de l'extrait (acétate d'éthyle) avec 6 mm de diamètre envers la souche bactérienne (Gram +) *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Concernant la plante *Punica granatum* L
  - La plus grande zone d'inhibition est celle de l'extrait (n-butanol) avec 26.5 mm de diamètre envers la souche bactérienne (Gram +) *Staphylococcus aureus*.
  - La plus petite zone d'inhibition a été observée envers *Esherichia-coli* pour les deux extraits (n-butanol et dichloromithane), et envers *Staphylococcus aureus* pour l'extrait dichlorométhane.

#### ✚ Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle (*Centaurea papposa*)

L'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.01) suivante :



**Figure 01** : Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle (*Centaurea papposa*).

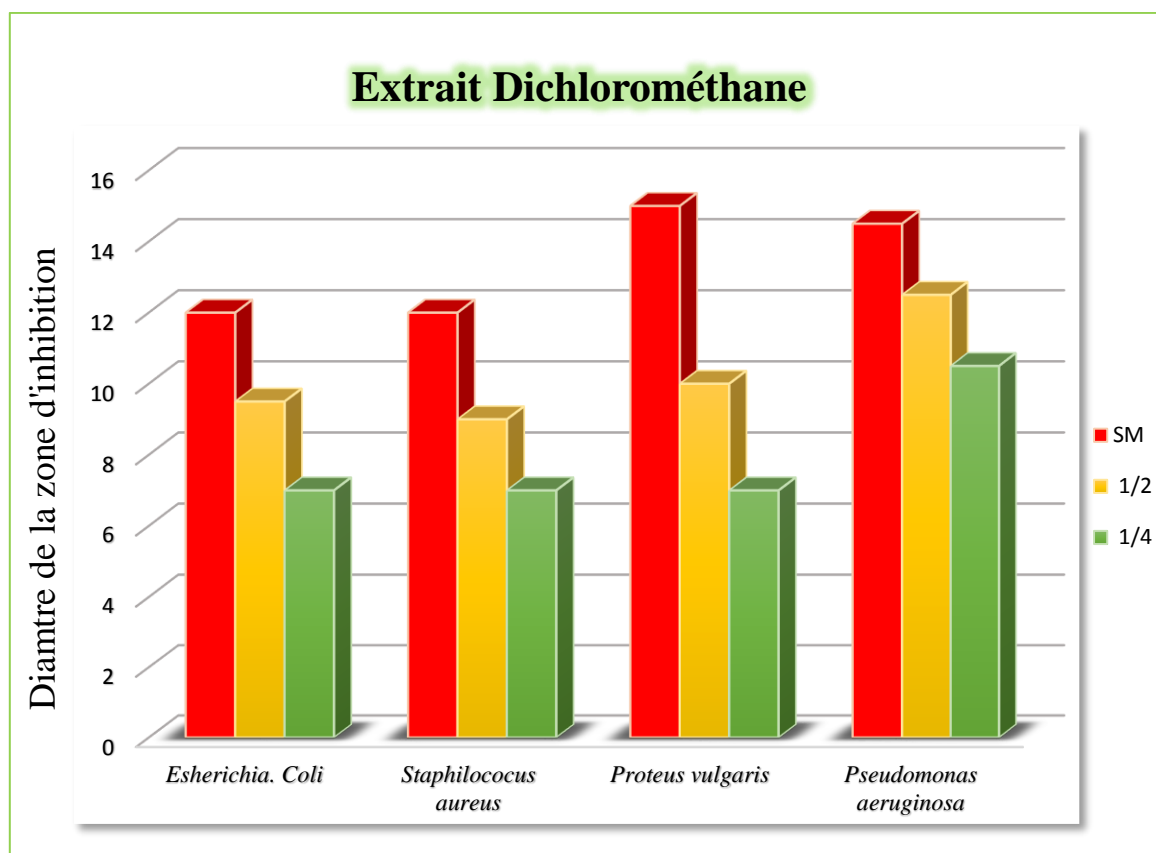
Au regard des résultats, l'extrait acétate d'éthyle a montré un faible effet inhibiteur contre les trois (3) souches bactériennes de Gram (-) à savoir *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition de (10.5 mm, 11 mm, 10.5mm) concernant la concentration initiale (SM). Aucune activité n'a été observée contre la bactérie de Gram (+) *Staphylococcus aureus*.

Les autres dilutions du même extrait pour les mêmes souches ne possèdent pas une activité antibactérienne, car les diamètres d'inhibition sont inférieurs à 8 mm ; seuil à partir duquel on peut parler d'une activité antibactérienne.

- ❖ En raison de la contamination nous n'avons pas pu suivre l'activité antibactérienne des extraits ; acétate d'éthyle et le dichlorométhane contre *Bacillus subtilis*.

#### 🚩 **Activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane (*Centaurea papposa*)**

L'activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.02) suivante :



**Figure 02 :** Activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane (*Centaurea papposa*).



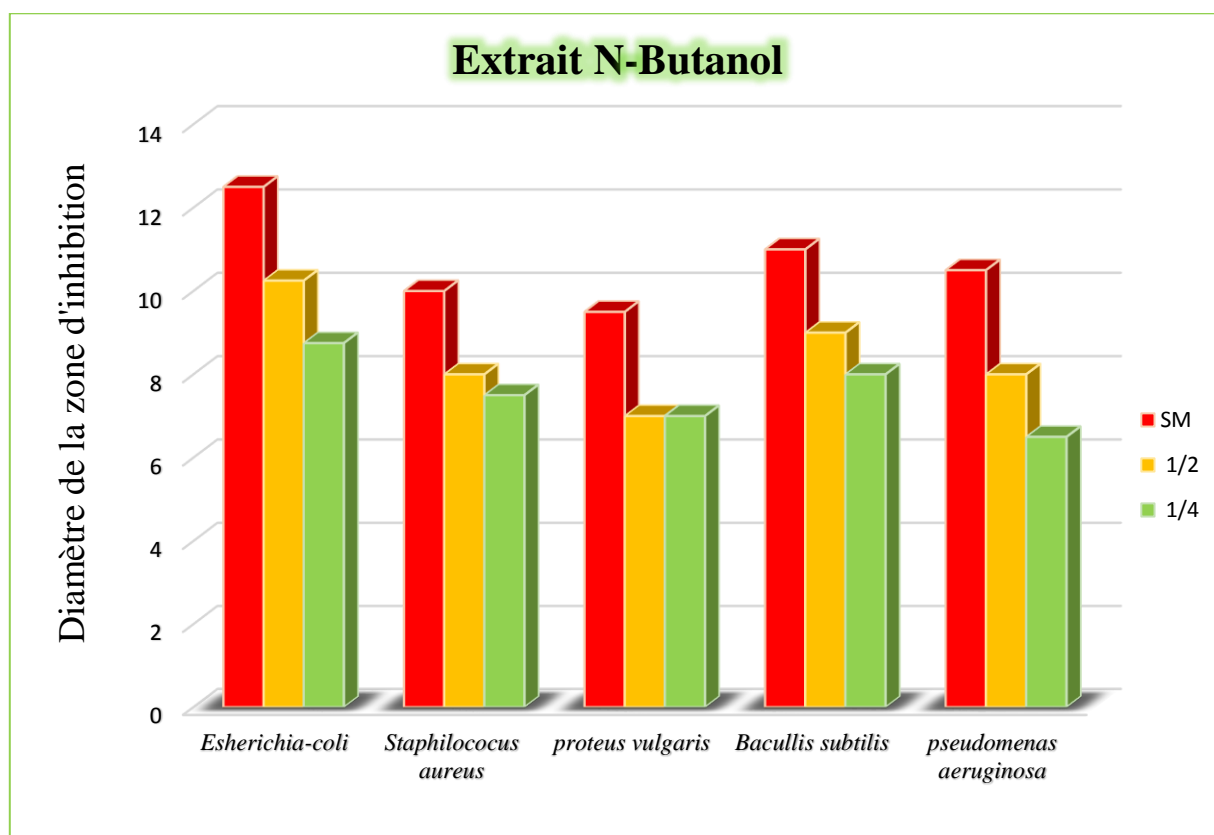
On observe un meilleur effet antibactérien envers les souches bactériennes testées (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli*), avec un diamètre maximal d'inhibition de la concentration initiale (SM) vis-à-vis de *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 15 mm et 14.5 mm respectivement.

*Esherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont aussi montrée sensibles à l'extrait dichlorométhane, avec un diamètre d'inhibition de 12 mm pour les deux souches.

Les autres dilutions du même extrait pour les mêmes souches présentent aussi une activité antibactérienne, sauf pour la concentration  $\frac{1}{4}$  qui ne montre pas cette activité chez les bacteries *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Esherichia coli* car le diamètre d'inhibition est inférieur à 8 mm.

#### ✚ Activité antibactérienne de l'extrait n-butanol (*Centaurea papposa*)

L'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.03) suivante :



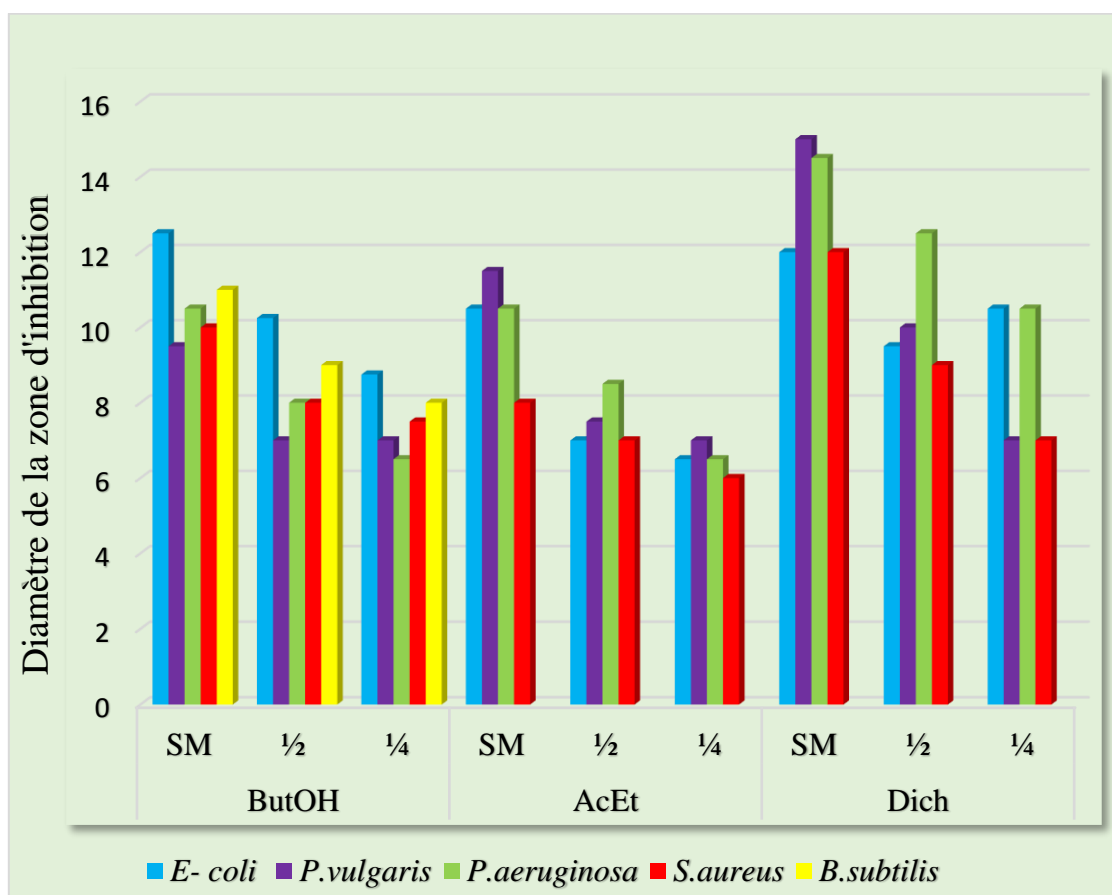
**Figure 03** : Activité antibactérienne de l'extrait n-butanol (*Centaurea papposa*).

D'après les résultats obtenus, on observe un faible effet antibactérien envers les cinq souches bactériennes testées (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli*) avec la concentration initiale (SM) de l'extrait, qui présente l'effet maximal d'inhibition. Les diamètres sont relativement proches : 11, 10, 9.5, 10.5, 12.5 (mm), respectivement.

Les autres dilutions du même extrait pour les mêmes souches ne possèdent pas une activité antibactérienne, sauf chez *Esherichia coli* qui montre une légère activité pour la concentration  $\frac{1}{2}$ , avec un diamètre de 10.25 mm.

### 1.1.1 Pouvoir antibactérien

Le pouvoir antibactérien des trois extraits (acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol) de l'espèce *Centaurea papposa* est représenté dans la (Fig.04) suivante :



**Figure 04** : Diamètres d'inhibition des bactéries testées par l'extrait acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol de *Centaurea papposa*.

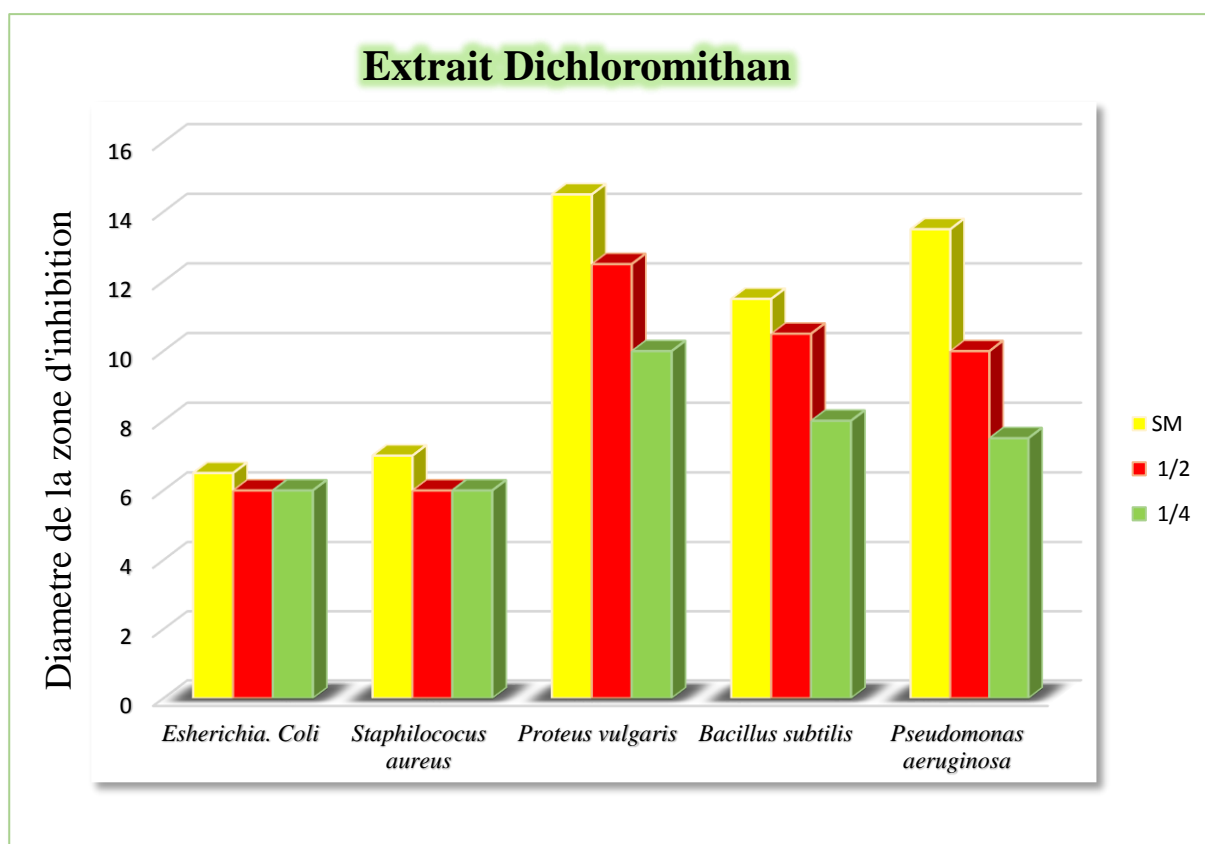
D'après les résultats exprimés dans les tableaux et les figures précédents, on peut déduire que la plante *Centaurea papposa* a une meilleure capacité antibactérienne pour la concentration (SM) avec l'extrait dichlorométhane tandis que l'extrait n-butanol a une capacité antibactérienne inférieure à celle-ci, par contre l'extrait acétate d'éthyle est le plus faible par rapport aux autres. Cette différence peut être due à l'origine de la composition chimique entre les trois extraits.

Les composés phénoliques sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluée *in vitro* a montré une action inhibitrice sur les microorganismes (Smith *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont révélé la relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien (Smith *et al.*, 2005).

#### 🚩 Activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane (*Punica granatum* L)

L'activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane de l'espèce *Punica granatum* L est représentée dans la (Fig.05) suivante :



**Figure 05** : Activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane (*Punica granatum* L).

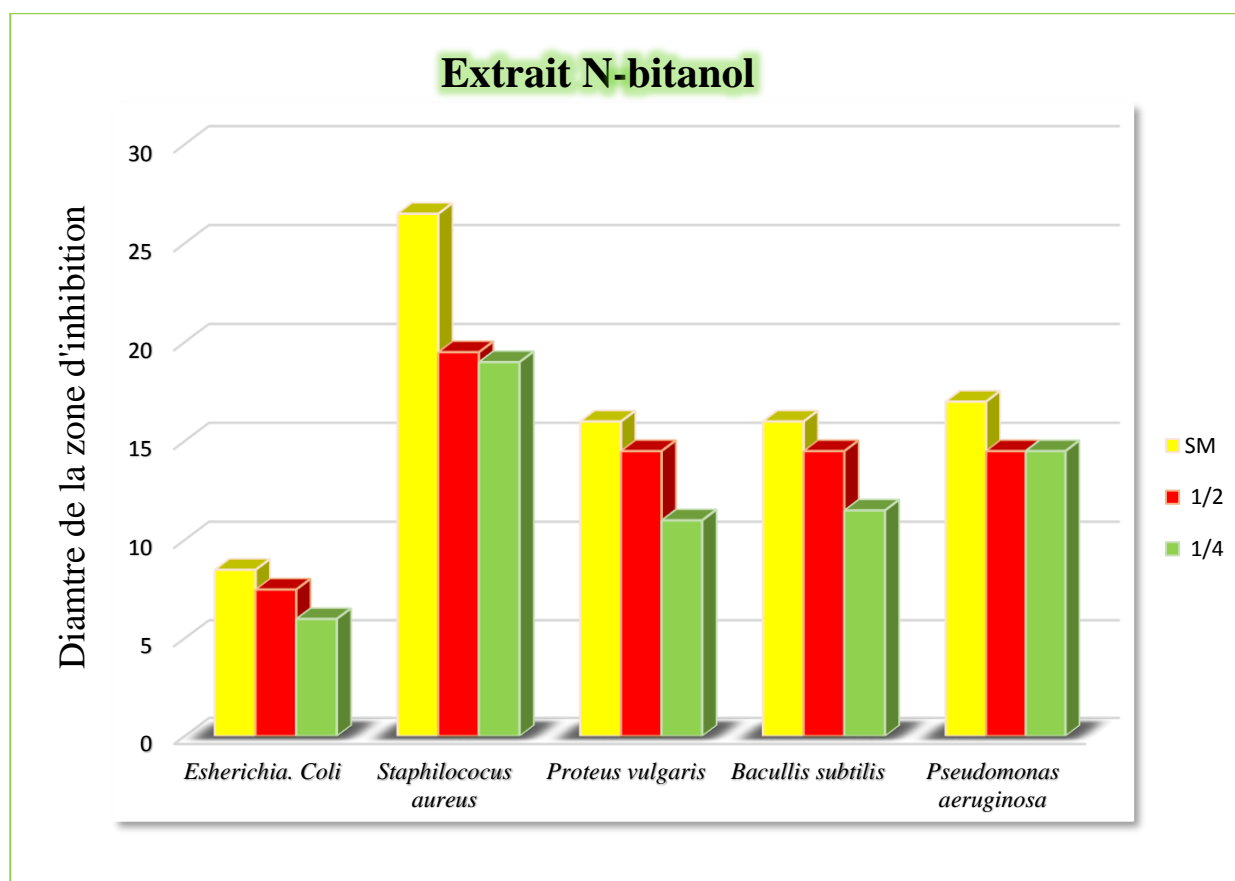
Au regard des résultats, l'extrait dichlorométhane a montré un effet inhibiteur contre trois souches qui sont apparues sensibles vis-à-vis de cet extrait, à savoir (*Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*), avec un diamètre d'inhibition pour la concentration initiale (SM) de 14.5 mm, 11.5 mm, 13.5 mm, respectivement.

Aucune activité n'a été observée contre les deux bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Concernant les autres dilutions pour les mêmes souches bactériennes, seul *Proteus vulgaris* a montré une faible sensibilité envers les concentrations ( $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$ ) avec 12.5 mm et 10 mm de diamètre.

#### 🚩 Activité antibactérienne de l'extrait n-butanol (*Punica granatum L*)

L'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol de l'espèce *Punica granatum L* est représentée dans la (Fig.06) suivante :



**Figure 06** : Activité antibactérienne de l'extrait n-butanol (*Punica granatum L*).

Selon le tableau et la figure ci-dessus, les souches bactériennes testées sont apparues de sensibles à très sensibles vis-à-vis de l'extrait butanolique de l'espèce *Punica granatum* L. Cela montre clairement que cet extrait exerce une activité antibactérienne à différents degrés sur l'ensemble des bactéries testées, avec un diamètre maximal d'inhibition vis-à-vis de la bactérie Gram (+) : *Staphylococcus aureus*, avec une zone d'inhibition pour la concentration initiale (SM) de 26.5 mm.

En revanche, aucune sensibilité n'a été montrée contre *Escherichia coli*.

Les souches *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une sensibilité très élevée envers l'extrait n-butanol, avec un diamètre d'inhibition de 16 mm, 16 mm, 17 mm respectivement.

Selon les résultats précédents, on peut déduire que l'extrait n-butanol présente une activité antibactérienne plus forte que celle du dichlorométhane, surtout pour la bactérie *Staphylococcus aureus*. Cela peut être expliqué par le fait que l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol de la plante *Punica granatum* L est due aux différents agents chimiques dans cet extrait y compris les flavonoïdes ; les tannins, les triterpènes les saponosides ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyles libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas *et al.*, 1992 ; Marjori, 1999).

L'hypersensibilité de la bactérie *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'extrait butanolique est probablement due à la sensibilité des bactéries Gram+ aux changements environnementaux externes tels que la température, le pH et les extraits naturels, dû à l'absence de la membrane externe (Balentine *et al.*, 2006). Alors que, *Escherichia coli* a montré une résistance contre les deux extraits.

D'autre part, Reguieg Ysaad et Hammadi, (2017) ont trouvé que tous les extraits de grenade (extrait aqueux, éthanolique et méthanolique) à une concentration de 0,1 g/ml, montrent une activité antibactérienne élevée sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité antibactérienne de ces extraits sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* corroborent nos résultats.

De plus, Bendjabeur, (2012), pour une concentration de 0,1 g/ml, l'extrait de la peau de la grenade n'a aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli*. Ce résultat a été trouvé aussi par Alhijna et Bourich, (2017). Idem pour nos extraits butanolique et dichlorométhane de cette plante.

D'autres chercheurs, **Benyagoub et al., 2016** ont montré que l'activité antibactérienne est due à la nature des bactéries Gram (+) ou Gram (-), qui est liée à la différenciation dans la structure membranaire de ces bactéries et aussi au mode d'extraction et la concentration du principe actif.

L'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié traduit l'action bactériostatique. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (**Sağdıç, 2003**).

En prenant en compte les résultats obtenus auparavant, on trouve que les extraits (acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol) des deux plantes, présentent plus au moins, la même capacité (ou activité) antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes : *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*.

La différence, apparaît dans l'action efficace de la plante *Centaurea papposa* contre la bactérie *Escherichia coli* des trois extraits, contrairement à la plante *Punica granatum* L qui ne montre aucune activité antibactérienne contre cette souche.

## 1.2 Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques. En effet, les composés antifongiques majeurs chez les végétaux peuvent appartenir à différentes classes de métabolites secondaires telles que : les acides phénols, les quinones, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les terpenoïdes, les alcaloïdes, les saponosides, les lectines ou encore les polypeptides.

Dans cette étude, on a tenté de comparer l'influence de 3 extraits (n-butanol, acétate d'éthyle, dichlorométhane), sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*. L'expérience a été réalisée par la méthode de diffusion à partir des puits sur un milieu gélosé solide (PDA), dans le but d'estimer l'évolution de l'activité antifongique, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm), après 48 heures d'incubation à une température adéquate de 28°C. Les valeurs indiquées sont les moyennes des trois mesures des diamètres du même essaie.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 06** : Activité antifongique de l'extrait n-butanol de *Centaurea papposa* représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.

<b>Extrait N-butanol</b>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium cerealis</i>
<b>SM</b>	14,6	16,3	19,6
$\frac{1}{2}$	9	11	11,3
$\frac{1}{4}$	8	8	9

**Tableau 07** : Activité antifongique d'extrait dichlorométhane de *Centaurea papposa* représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.

<b>Extrait Dichlorométhane</b>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium cerealis</i>
<b>SM</b>	26,6	23	31,3
1/2	19,6	15,6	24,3
1/4	9,3	8,6	17

**Tableau 08** : Activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea papposa* représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.

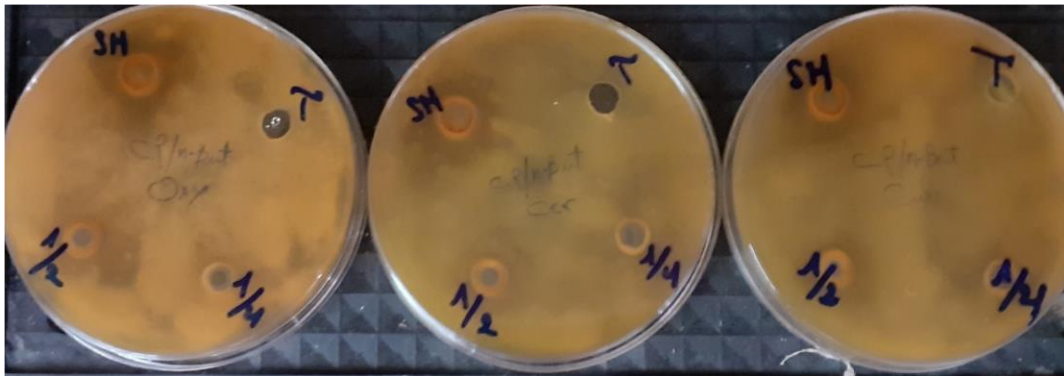
<b>Extrait Acétate d'éthyle</b>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium cerealis</i>
<b>SM</b>	22	22,6	22,3
1/2	15	15,6	17,3
1/4	8	8,6	13,3



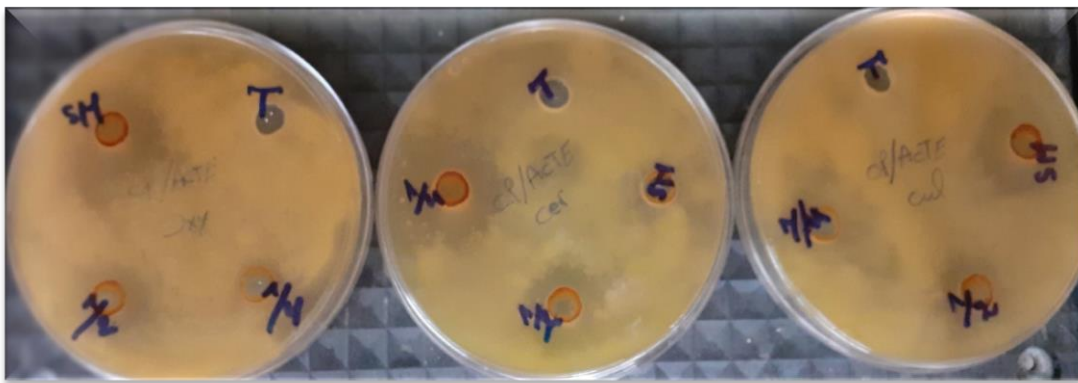
**Tableau 09** : Activité antifongique de l'extrait n-butanol de *Punica granatum* L représentée par les zones d'inhibition mesurées en mm.

<b>Etrait N-butanol</b>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium cerealis</i>
<b>SM</b>	15,3	14,3	20,3
$\frac{1}{2}$	14,3	11,6	15,6
$\frac{1}{4}$	12,6	8,3	13

- les résultats de l'activité antifongique des trois extraits de *Centaurea papposa*, sont apparus comme suit :



**Figure 07** : Activité de l'extrait n-butanol vis-à-vis des *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*.

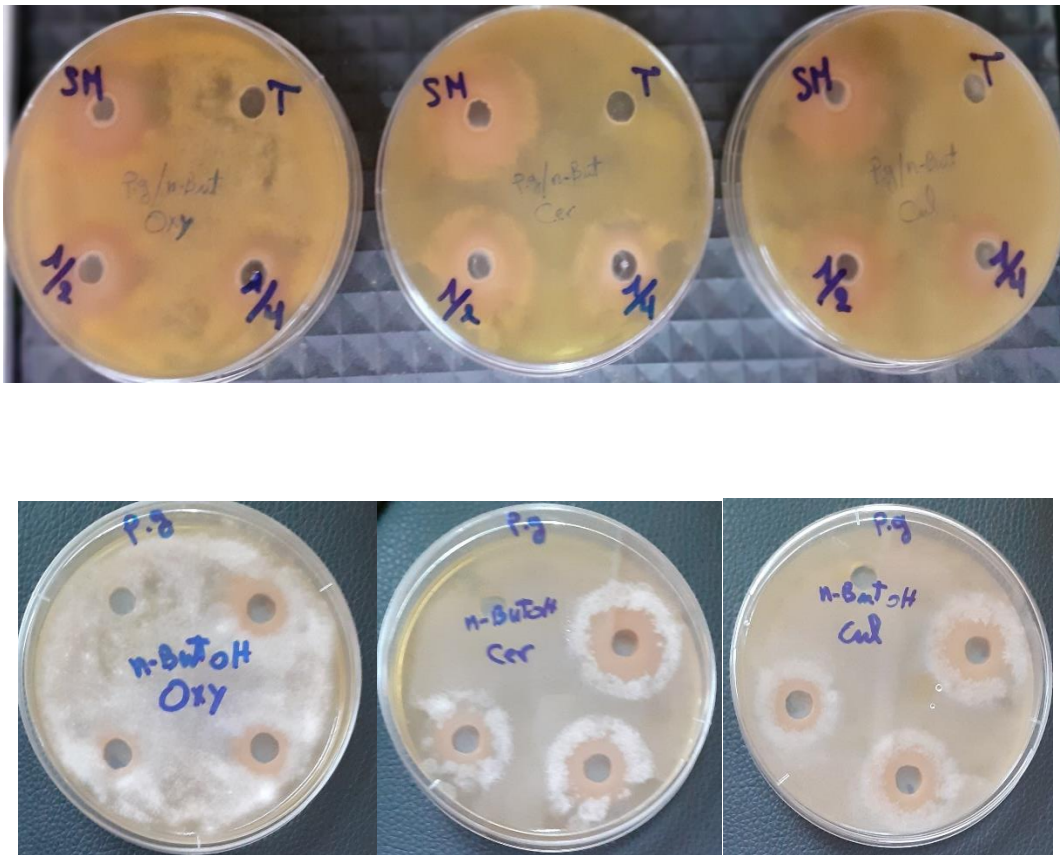


**Figure 08** : Activité de l'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis des *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*.



**Figure 09** : Activité de l'extrait dichlorométhane vis-à-vis des *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*.

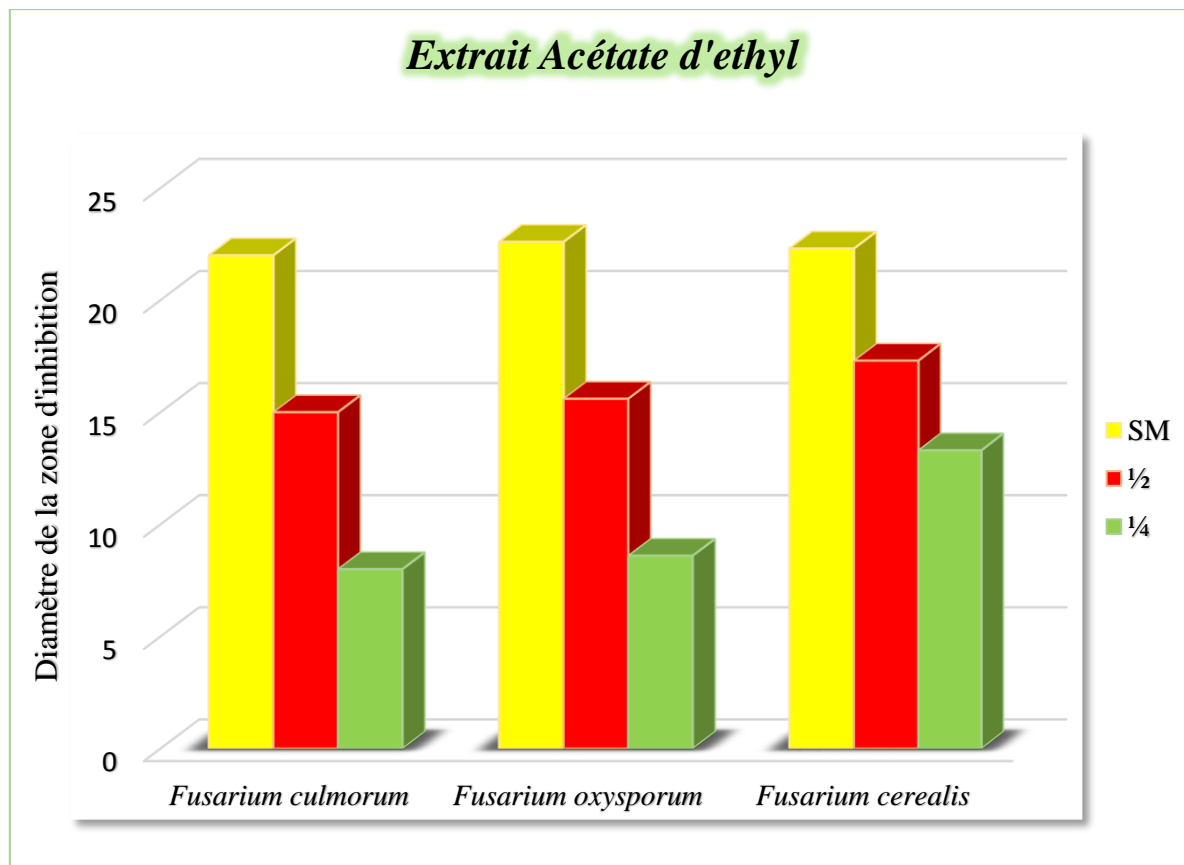
- ✿ Pour l'espèce *Punica granatum* L, les résultats de l'activité antifongique sur l'extrait n-butanol sont apparus comme suit :



**Figure 10** : Activité de l'extrait n-butanol vis-à-vis des *F. oxysporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*.

### ✚ En présence d'acétate d'éthyle (*Centaurea papposa*)

L'activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.11) suivante :



**Figure 11:** Activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea papposa* vis-à-vis de *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*.

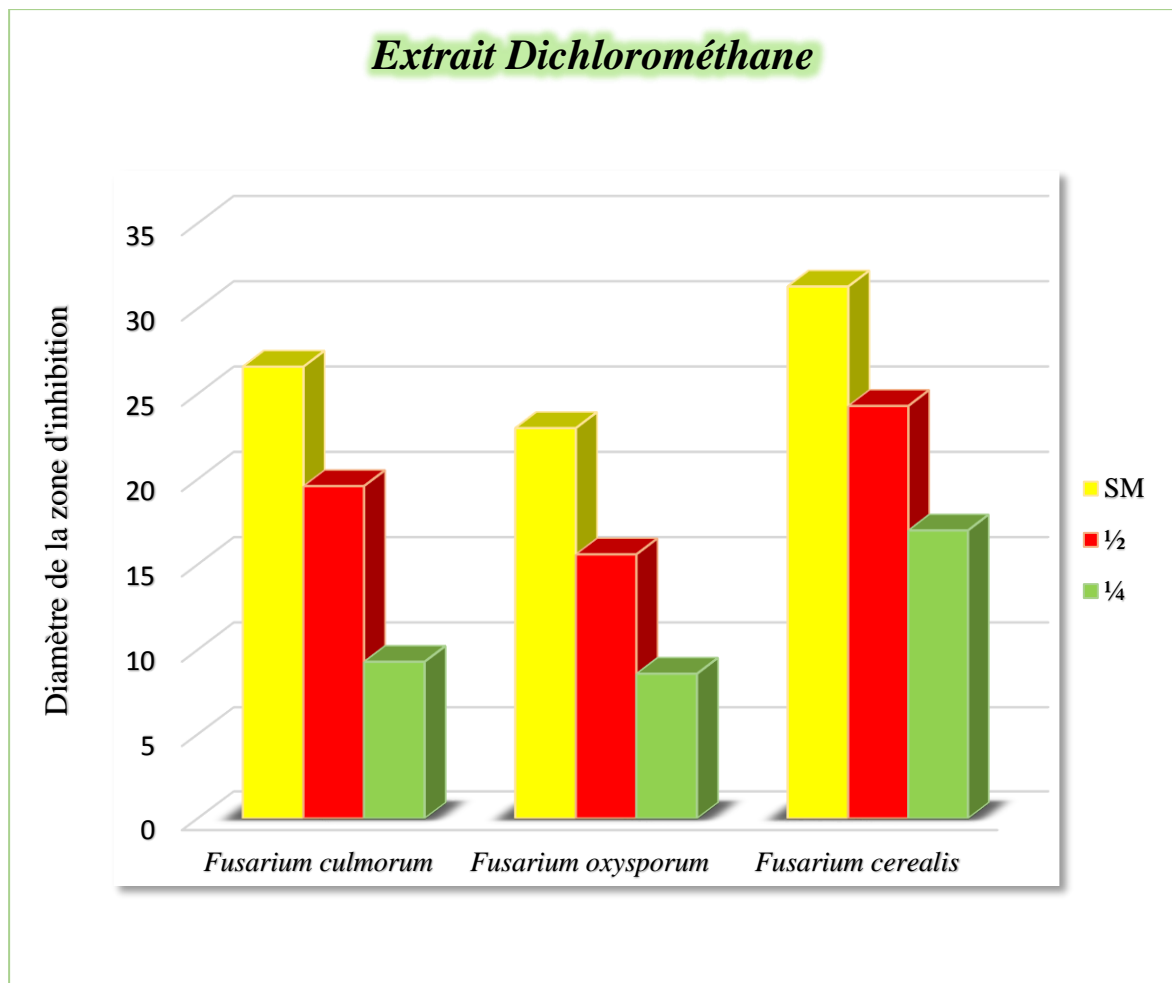
L'évaluation du diamètre de la zone d'inhibition des champignons est représentée dans la (Fig.1). Nous avons remarqué que le degré d'efficacité de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea papposa* sur l'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques testées augmente en fonction de la concentration (1/4, 1/2, SM).

D'après les résultats nous avons noté que la concentration (SM) donne les diamètres d'inhibitions les plus élevés sur la croissance des souches fongiques (*F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*) qui sont : 22 mm, 22.6 mm, 22.3 mm, respectivement.

Ce qui diffère avec la concentration  $\frac{1}{4}$ , c'est qu'elle n'a montré aucun effet sur la croissance mycélienne envers *F. culmorum* et *F. oxysporum*.

#### ✚ En présence de l'extrait dichlorométhane (*Centaurea papposa*)

L'activité antifongique de l'extrait dichlorométhane de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.12) suivante :



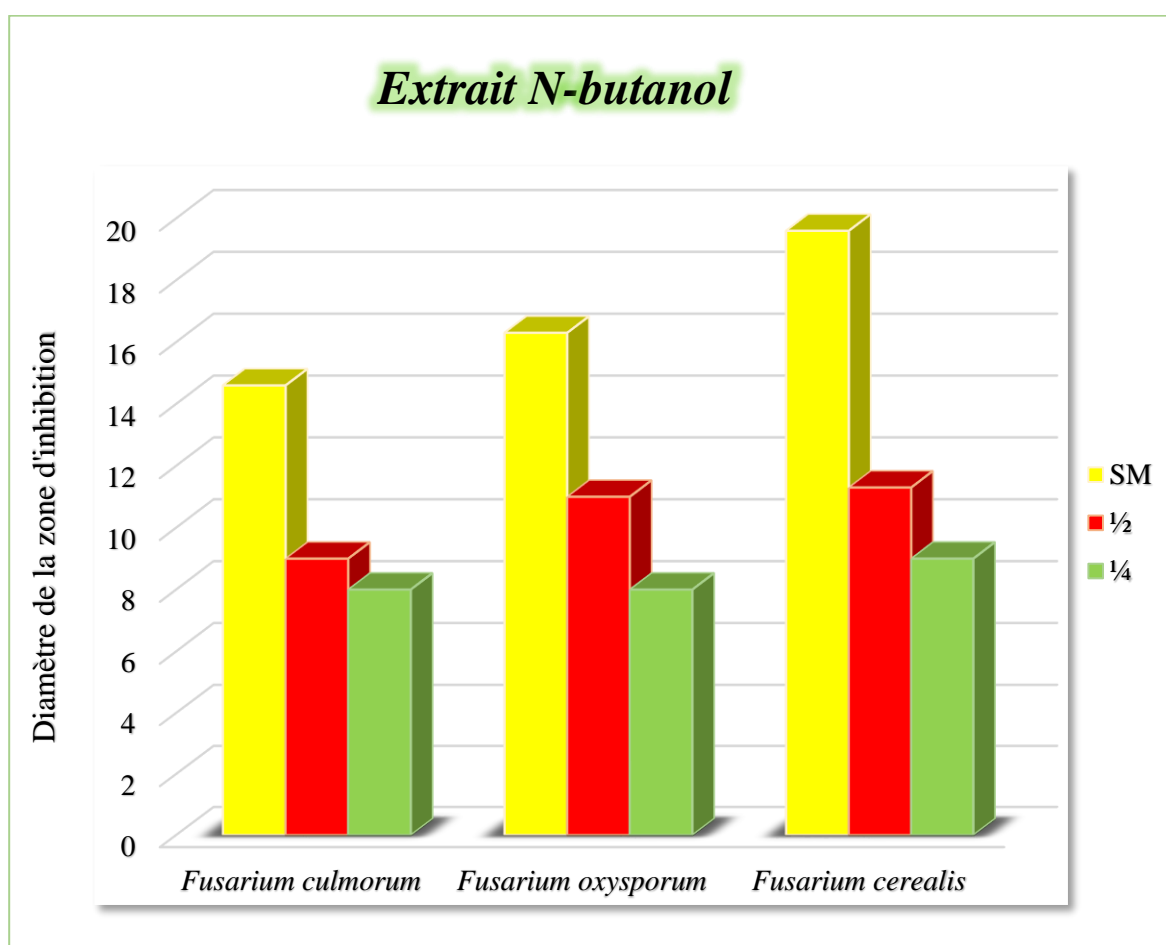
**Figure 12 :** Activité antifongique de l'extrait dichlorométhane de *Centaurea papposa*.

vis-à-vis des *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*.

On note que l'extrait dichlorométhane a un meilleur effet sur l'inhibition de l'activité des trois souches fongique testées à savoir *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*. L'action sur ce dernier (*Fusarium cerealis*) est notamment meilleure, il est considéré comme le plus sensible à cet extrait pour les trois concentrations ( $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , SM) avec les diamètres (17 mm, 24.3 mm, 31.3 mm), respectivement. (Fig.12).

#### ✚ En présence de l'extrait n-butanol (*Centaurea papposa*)

L'activité antifongique de l'extrait n-butanol de l'espèce *Centaurea papposa* est représentée dans la (Fig.13) suivante :



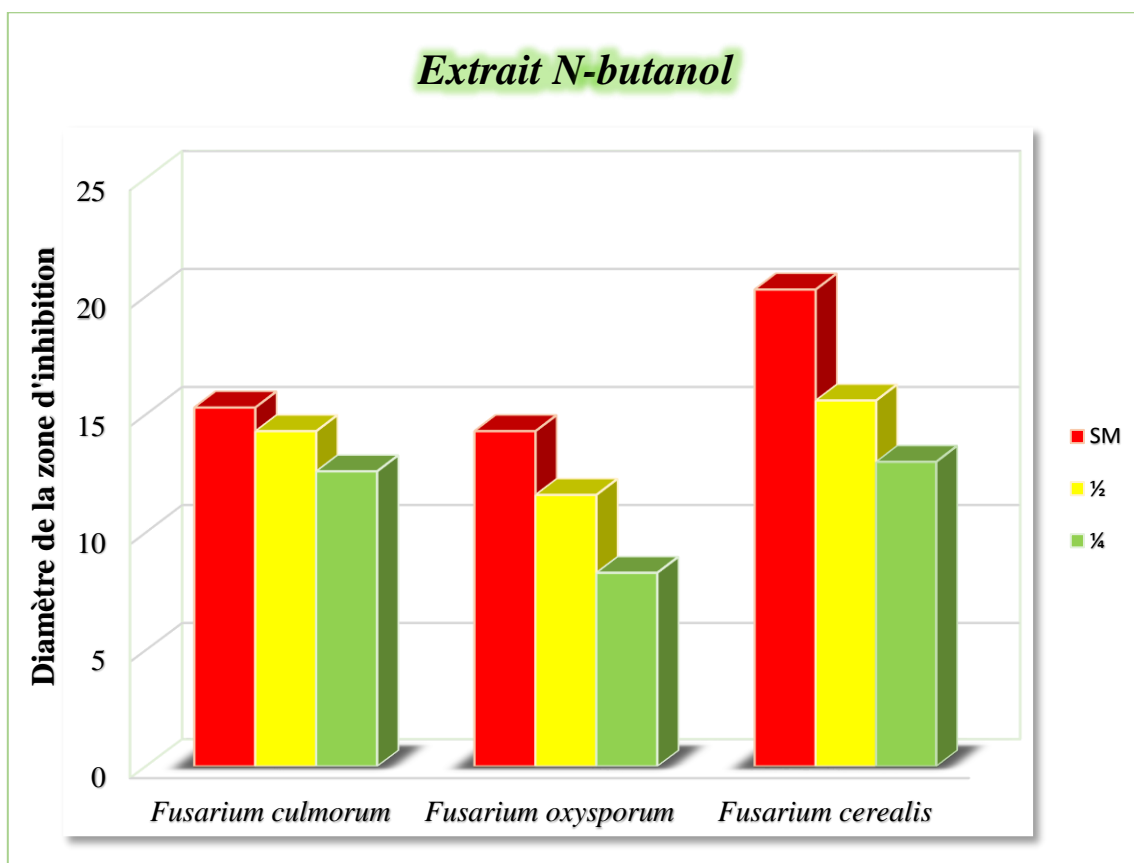
**Figure 13 :** Activité antifongique de l'extrait n-butanol de *Centaurea papposa*.

vis-à-vis des *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*.

En ce qui concerne l'effet de l'extrait n-butanol de *Centaurea papposa*, les résultats présentés dans la (Fig.3) montrent que cet extrait possède aussi un fort effet fongicide vis-à-vis des trois souches fongiques testées (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*), où il donne pour la concentration initiale (SM), une moyenne de diamètre de (14.6 mm, 16.3 mm, 19.6 mm), respectivement.

#### ✚ En présence de l'extrait n-butanol (*Punica granatum L*)

L'activité antifongique de l'extrait n-butanol de l'espèce *Punica granatum L* est représentée dans la (Fig.14) suivante :



**Figure 14 :** Activité antifongique de l'extrait n-butanol de *Punica granatum L*, vis-à-vis des *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. cerealis*.

Cet extrait montre un meilleur effet antifongique envers les trois souches fongiques testées (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*), avec un diamètre d'inhibition de la croissance mycélienne pour la concentration (SM) de 15.3 mm, 14.3 mm, 20.3 mm respectivement.

Il apparaît que le plus grand diamètre d'inhibition est pour le champignon *Fusarium cerealis* avec les trois concentrations ( $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , SM) (Fig.4).

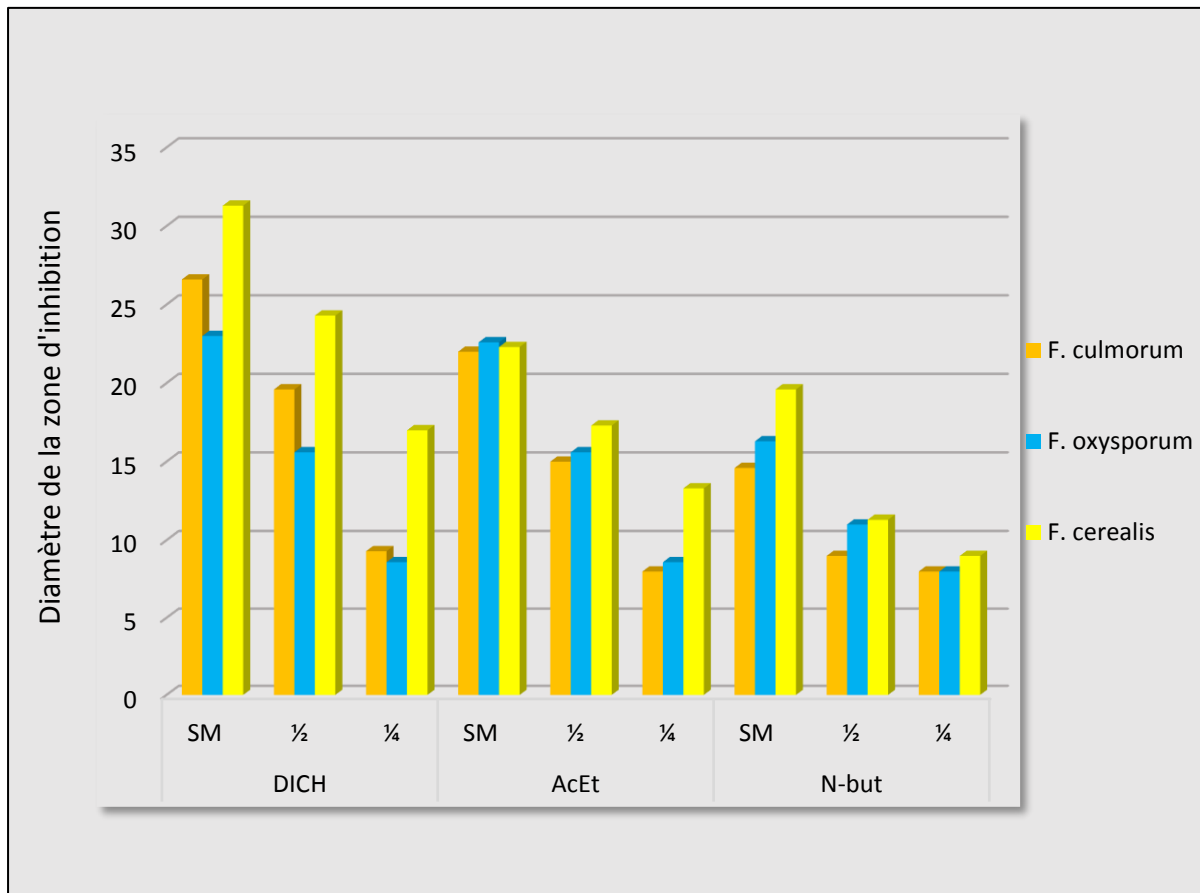
### 1.2.1 Pouvoir antifongique

Les résultats du diamètre d'inhibition de la croissance mycélienne des trois extraits (acétate d'éthyle, dichlorométhane et n-butanol) de *Centaurea papposa* (Fig.15), montrent que les trois extraits exercent une activité antifongique vis-à-vis des trois souches fongiques testées (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*) avec la concentration initiale (SM).

Mais nous avons remarqué clairement que l'extrait dichlorométhane est le plus actif pour inhiber la croissance du *Fusarium cerealis*, avec un diamètre d'inhibition pour la concentration (SM) de 31 mm. Cet extrait contient plus des substances antifongiques inhibitrices par rapport à tous les extraits utilisés dans cet essai antifongique. Suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec un diamètre de 22.3 mm, après le n-butanol avec un diamètre de 19.6 mm.

Et en ce qui concerne la plante *Punica granatum* L, les trois souches fongiques testées restent aussi très sensibles à l'extrait butanolique de cette plante et montrent des diamètres d'inhibition de la concentration (SM), proportionnellement similaire à ceux observés pour *Centaurea papposa*.





**Figure 15 :** Effet des différentes concentrations des extraits acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol de *Centaurea papposasa* sur la sensibilité des souches *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait dichlorométhane est plus actif que l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol. Cette différence peut être due à la composition chimique, qui diffère d'un extrait à un autre.

*Conclusion et perspective*

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie en cosmétologie, en agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part de fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Au terme de ce travail visant à étudier les activités antibactérienne et antifongique des trois extraits préparé par macération de deux plantes médicinales algériennes, appartenant à la famille des *Asteraceae* et au genre *centaurea*, et la famille des *Lythraceae* et au genre *Punica*, les familles les plus importantes de la flore Algérienne et les plus utilisées en médecine traditionnelle. Il ressort que ces plantes possèdent des vertus pouvant justifier leur utilisation en médecine traditionnelle.

Ce travail nous a permis d'une part de faire en premier temps une étude bibliographie menée sur les deux genres de plantes étudiées, ce qui nous a permis de révéler leur caractéristiques botaniques et biologiques et de montrer leur richesse en substances naturelles.

Le travail réalisé a débuté par une macération du matériel végétal pour obtenir une solution aqueuse, qui à son tour a subi des séparations liquide-liquide avec des solvants organiques de polarité croissante pour aboutir à trois extraits (acétate d'éthyle, dichlorométhane, n-butanol).

Nous avons également testé ces extraits sur l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion à partir des disques imprégnés et l'activité antifongique par la méthode de diffusion à partir des puits. Les résultats obtenus ont montré des zones d'inhibition remarquables contre les cinq souches bactériennes (*Bcillus subtilis*, *staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomenas aeruginosa*) et les trois souches fongiques (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*).

Pour la plante *Centaurea papposa*, la fraction dichlorométhane des feuilles, possède la capacité antibactérienne et antifongique la plus élevée et la meilleure par rapport aux autres extraits. Ce résultat peut être justifié par la richesse en composés phénoliques et flavoniques de cet extrait.

En parallèle l'activité antifongique des autres extraits obtenus (n-butanol, acétate d'éthyle) est assez significative et donne des résultats acceptables. Par contre l'activité antibactérienne est assez faible pour ces extraits.

Alors que dans la deuxième plante *Punica granatum* L, la meilleure capacité antibactérienne et antifongique a été observée sur l'extrait n-butanol. Cela peut être expliqué essentiellement par la nature des composés qu'il contient comme; les flavonoïdes, les tanines, les triterpènes les saponosides ainsi que d'autres composés de nature phénolique, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs.

Sachant que ces résultats se révèlent prometteurs et que chaque plante se caractérise par des molécules particulièrement intéressantes qui demandent d'être exploitées.

Il serait intéressant d'approfondir cette étude par :

- ❖ La réalisation d'une étude phytochimique de ces extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques des différentes plantes.
- ❖ Identification et caractérisation de la molécule responsable de l'effet par les méthodes d'analyse (RMN, Spectrophotomètre de masse).
- ❖ Evaluation de l'effet *in vivo*, sur un modèle animal.
- ❖ Elargir le panel des activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.
- ❖ Etude de la toxicité aiguë et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

*Références bibliographiques*

- A**dekenov, S. M., Aituganov, K. A., Kagarlitskii, A. D., Rakhimov, K. D., 177 Vermenichev, S. M. (1986). Grossshemin from *Chartolepis intermedia* and *Centaurea ruthenica*. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 20(8): 938-942.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, O., and Iwatsuki, K. (2001)**. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (4): 487-491.
- Alan Crozier, Michael, N., Clifford, Hiroshi Ashihara. (2006)**. By Blackwell Publishin Ltd (Livre).
- Albayrak, S., Atasagun, B., et Aksoy, A. (2017)**. «Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques, » *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 10(6), pp. 599-606.
- Alhijna, O.S.A et Bourich, E. H. (2017)**. Grenade de Beni Snous : Etude et Caractérisation Chimique des Extraits de Pépins, Evaluation de l'Activité Microbiologique. Diplôme de Docteur en Pharmacie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid Faculté de Médecine Tlemcen, 80 p.
- Ali-dellile, L. (2013)**. Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Edition Alger. 6-11.
- Allal, A. (2016)**. Etude phytochimique et activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen : *Psoralea bituminosa*. Mémoire de master. Chimie. Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid. Algérie. Page: 16.
- Al-Obaidi, D. M., Muhsin, S. A., & Ibrahim, A. A. (2017)**. In vivo antimicrobial inhibition of *Punica granatum* extracts as mouthwash. *Russian Open Medical Journal*. 6:1-5.
- Amara, N., Boughérara, Y. (2017)**. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du Cyprès vert (*Cupressus Sempervirens* L.). *Algerian Journal of Natural Products*. 5(2): 455-462.
- Amrani Joutei, K., et Yves Glories. (1994)**. «Étude En Conditions Modèles de l'extractibilité Des analysis of inoculative freezing in an insect. *Cryo. Lett.* 13: 355-362.
- Amrani Joutei, K., et Yves Glories. (1994)**. «Étude En Conditions Modèles de l'extractibilité Des Composés Phénoliques Des Pellicules et Des Pépins de Raisins Rouges.» *OENO One* 28 (4): 303.
- Anand, S., Rimoldi, J. M., Tukov, F. F., Matthew, s J. C. (2003)**. Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, March. 23-27.
- André, T. (1979)**. Les moyens de défense des plantes contre les microorganismes parasites, *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 126 :4, 103-110.

**AVREINOFF, V. A. (1957).** Contribution à l'Etude du Grenadier. Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée [en ligne]. Vol. 4, n° 3-4, pp. 124-138.

**Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako. 10 p.

**Baharfar, R., Khalilzadeh, M., Gheibi, S., Jazayeri, O., Azimi, R., et T. M. (2009).** «Antioxidant and antibacterial activities of the methanolic extract of *Centaurea zuvandica* Sosn. » Iranian Journal of Organic Chemistry, pp. 172-177.

**Bahmani, F., Esmaeili, S., Bashash, D., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P., et Gharehbaghian, A. & (2018).** «*Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis, » Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 99, p. 598–607.

**Bandyukova, V. A., Khalmatov, Kh. Kh. and Alimov, Kh. I. (1969).** *Khimiya Soedinenii*, 5(4), 324-325.

**Barkely, T.M., Brouillet, L., Strother, J. L. (2006).** *Flora of North America- Astéraceae* 19, 3-69.

**Bauer, A., (1966).** W. and others Antibiotic susceptibility testing by standardised single disc method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493.

**Beckman, C. H., Verdier, P. A., and Mueller, W. C. (1989).** A system of defense in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:227-239.

**Bekir, J., Mars, M., Vicendo, P., Ftterich, A., & Bouajila J. (2013).** Chemical composition and antioxidant, antiinflammatory, and antiproliferation activities of pomegranate (*Punica granatum*) flowers. *Journal of Medicinal Food*. 16: 544-50.

**Bektas, M., Malak, A. T., Yumer, A. S., Korkmaz, M., Ozkan, A. (2003).** Turkish University Students Nutritional Habits Regarding Cancer Prevention and Healthy Lifestyles. *Asian Pacific Journal of Preventio.* 11: 1347-1350.

**Belbache, H. (2003).** Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora* Desf, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. p 16-20.

**Belkacem, S., Belbache, H., Boubekril, C., Mosset, P., RachedMosbah, O., Marchioni, E., Benayache, S., et Benayache, F. (2014).** «Biological and Chemical Sciences Chemical Constituents from *Centaurea parviflora* Desf. » *Research Journal of Pharmaceutical.* pp. 0975-8585.

- Belloum, M., Bouheroum, F., Benayache, H., and Benayache, S. (2013).** Secondary metabolites from the aerial part of *Inula crithmoides*. *Chemistry of Natural Compounds*; 17(5): 54- 61.
- Ben Amor, B. (2008).** Maîtrise De L'aptitude Technologique De La Matière Végétale Dans Les Opérations D'extraction De Principes Actifs ; Texturation Par Détente Instantanée Contrôlée DIC. Thèse De Doctorat En Génie Des Procédés Industriels. Université De La Rochelle. France. Pp. 187.
- Benabdallah, M. (2012).** Préparation et étude de la réactivité de quelques dérivés de naphtoquinones en vue de leurs applications biologiques potentielles. Thèse de doctorat, université aboubekerbelkaid, Tlemcen, 224.
- Ben-aire, R., Segal, N., Guelfat-Reich, S. (1984).** The maturation and ripening of the “wonderful” pomegranate. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*109 (6). PP: 898-902.
- Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou, P., Drodz, B., Nowak, G. (1992).** Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata*. *Phytochemistry*. 31(12): 4359-4360.[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80477-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80477-V).
- 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. Diplôme de Magister en Sciences Agronomiques. Alger : Ecole Nationale Supérieur Agronomique ELHARRACH, 154 p.
- Benhammou, N. (2011).** Activité Antioxydante Des Extraits Des Composés Phénoliques De Dix Plantes Médicinales De L'Ouest Et Du Sud-Ouest Algérien. Thèse De Doctorat En Biologie. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen.Algérie. 113 P.
- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., Tirilly, Y. (1997).** Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis- lycopersici*. *Phytopathology* 87,108–121.
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., Shahimi, M. (2017).** Antiinflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A& B isolated from *Punica granatum*. *Complementary and Alternative Medicine*. 17: 17:47.
- Berrin, O., Ilhan, G., Taner, K., et Y. (2007).** Erdem, «Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis L.* » *Microbiol. Res*, pp. 1-8.
- Berthod, A., Billardello, B., and Geoffroy, S. (1999).** Polyphenols in countercurrent chromatography. An exemple of large scale separational analysis. *EDP sciences, Wiley-VCH*. 27, 750-75.
- Billing, J., Sherman, P. W. (1998).** Antimicrobial Functions of Spices: Why some like it hot. *Chicago journal* .73(1): 3-49.



**Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., & Piattelli, M. (1993).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*, 8(6), 331-337.

**Boual, Z., Kemassi, A., Oudjana, H.A., Michaud, P., and Didi, E. (2013).** Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de malva parviflora I. (malvaceae): activité prébiotique. Université Kasdi Merbah- Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semiarides, 41.

**Bouanani, S., Henchiri, C., Migianu-Griffoni, E., Aouf, N., and Lecouvey, M. (2010).** Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1), 38-45.

**Boudjellal khamssa thèse de magister (2008).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. 10-30p.

**Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., El amri J., Chakir S. et 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.

**Bouزيد, A., Chadli, R., Ouwid, K. (2017).** Etude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbès en Algérie occidentale. *Phytothérapie* 15, 373-378.

**Bremer, K., Anderberg Arne, A. (1994).** *Asteraceae, Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland, Oregon. 752 p.

**Bruneton, J. (1993).** *Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation*, p.266- 275- 2 ème édition. Lavoisier. Paris.

**Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie, Photochimie, Plantes médicinales*, 3ème Ed. Ed. Médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

**Brunton, J. (1999).** *Pharmacognosie. Phytochimie. Plante médicinales*. Lavoisier, 3ème édition. Tec & Doc, Paris : 125-130.

**Brunton, J. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4e éd, Tec&Doc, lavoisier. Paris.

**Cahagnier, B., Richard-Molard, D. (1998).** Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, Paris, 140-158.

**Carbonnelle, B. (1988).** *Bactériologie médicale, techniques usuelle*. Paris, 330.

- Celik, S., Rosselli, S., Maggio, A. M., Raccuglia, R. A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M. (2006).** Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*, *Biochemical Systematics and Ecology*. Pergamon. 34(4): 349- 352. Doi: 10.1016/j.bse.2005.10.007
- Charles Dorni, A. I., Amalraj, A., Gopi, S., Varma, K., Anjana, S. N. (2017).** Novel cosmeceuticals from plants- an industry guided review. *J. Appl. Res. Med. Aromat.Plants*, 7: 1-26.
- Chaudhri, M., Paronychia, C., and Murbeck, S. (1988).** *Chlorothyrsa* (Caryophyllaceae) in the Iberian Peninsula. *Anales Del Jardin Botanico de Madrid*: 45(1), 361.
- Clave, D. (2013).** Fiche technique: *Staphylococcus aureus*. Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie, Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Fiche technique bactériologique 131 : 1-4.
- Clifford, M., and Scalbert, A. (2000).** Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Sci. Food Agric*. 80: 1118-1125.
- Coffi, R., Philippe, E. T., Zannou Boukari, Et Glitho, I. (2012).** Efficacité Des Composés Métabolites Secondaires Extraits Des Folioles Du Palmier A Huile.
- Collins, Lync. (1976).** *Microbiological methods*. 4th édition, 234-247.
- Constanze, S., Winfried, R., Claudia, A., Rolf, G., et Dirk W, L. (2015)** «HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods.,» *food chem*, vol. 109(2), pp. 462-9.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Fions, C., Caus, M., Pompei, R., and Bonsignore, L. (2008).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*; 8, 302-305.
- Cowan, (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinicalmicrobioloyreviews*. 12(4): 564- 570.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.
- Crestini, C., Lange, H. (2015).** A novel and efficient immobilized tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. *Microchemical Journal*, volume 123, pp: 139– 147.
- Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z. (2018).** “Exploration of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond”. *World journal of Microbiology& Biotechnology*, 34:145. DOI 10.1007/s11274-018-2531-7.
- CYR, A. (2017).** Grenade (la petite histoire de la grenade) [en ligne]. In : Encyclopédie des aliments.[https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=grenade\\_nu](https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=grenade_nu) (consulté le : 05.05.2021).

- Delahaye, N. F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Ménard, C., Roux, S., Lyonnet, L., MinardColin, V. (2011).** Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine*, 17(6), 700.
- Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Xie, Y., Ye, T., Xiab, Y., & Yin, W. (2017).** The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells, *Biomed. Pharmacother.*93: 976–984.
- Derwish, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010).** Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic & Appl. Sci*, 3 (4):3818-3824.
- Dikmen, M., Ozturk, N., & Ozturk, Y. (2011).** The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *Journal of Medicinal Food*.14:1638–1646.
- Djeddi, A., karioti, M., Sokovic, C., et Koukoulitsa, e. H. S. (2008).** «A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties, » *Bioorg. Med. Chem*, vol. 16(7), pp. 3725- 3731.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L.M., BADOUC, A., and Gmira, N. (2003).** Phytochemical screening of an iberomoroccan endemic, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, 61-78.
- Dongdong, W., Cigdem, Ö., Ibrahim, M., Abu-Reidah, M., Sridevi, C., Jayanta, K. P., Jaroslaw, O., Horbanczuk, S., Artur, J., Nikolay, T., Tzvetkov., Pavel U., Atanas, G., & Atanasov, V. (2018).** Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Frontiers in Pharmacology*. 9:544.
- Dorman, H. J. D. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*. 88-308-316.
- Douaouri, N. (2018).** Contribution à une étude phytothérapeutique, antiinflammatoire ET antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo. Thèse doctorat. Université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem.
- Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C. (2009).** Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *Molecules*. 14(5):1808- 1817.

**E**l Mahjoub, M., Le Picard, D., and Moreau, M. (1984). Origin of tyloses in melon (*Cucumis melo*) in response to a vascular *Fusarium*. IAWA Bulletin n.s., Vol. 5(4). 307-311.

Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., & Ferchichi, A. (2011). Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds and Tocopherols from Tunisian Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits. *Journal of Food Science* .76(5): 707–713.

Elhassan Benyagoub, Amina Boulanouar, Meriem Souid Ahmed, Nouria Nebbou & Ahmed Bouloufa. (2016). Essai d'évaluation de l'activité antibactérienne de la gommearabique d'*Acacia tortilis* (Forssk) contre quelques souches bactériennes pathogènes, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 85: 237-252.

El-Shazli, A. M., Dora, G., and Wink, M. (2005). Alkaloid of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss. (Chenopodiaceae). *Pharmazie*; 60(12), 949-52.

Emerenciano, V. P., Barbosa, K. O., Scotti, M. T., and Ferreira, M. J. (2007) «FerrSelf-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data eira, » *J. Braz. Chem. Soc*, p. 18.

Ericsson, H.M., Sherris, J.C. (1971). Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl.*, 217, 1-90.

Espirade. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Paris, Lavoisier. PP 360.

Evreinoff, V. A. (1957). Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*, 4(3) : 124-1.

**F**ernandes, L., Pereira, J. A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranates (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*.39: 13–22.

Fernane, M., Ibn Tattou, M. (1999). Observation sur la flore vasculaire endémique, rare ou menacée du Maroc. - *Fl. Medil*. 9: I 113-124-ISSN 1120- 4052.

Fertout-Mouri, N. (2018). Étude phytoécologique de la flore adventice des agrosystèmes céréaliers de la région de Tessala (Algérie nord-occidentale) *Phytoecological study of the adventitious flora of cereal agrosystems in the Tessala region (North-western Algeria)*. 2018: 87. DOI: 10.25518/0037-9565.8051.

**Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix, J. J. (2005),** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes. 121-216.

**Gousiadou, C., Skaltsa, H. (2003).** Biochemical systematics and ecology. 31, 389-396.

**Green, K. (2012).** Mise à jour sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Toronto Invasive Bacterial Diseases Network*. Volume 4 (3): 1-4.

**Ganeshkumar, M., Sathishkumar, M., Ponrasu, T., Dinesh, M. G., & Suguna, L. (2013).** Spontaneous ultra-fast synthesis of gold nanoparticles using *Punica granatum* for cancer targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 106: 208–216.

**Grafakou, M. E., Djeddi, S., Hamel, T., Skaltsa, H. (2018).** Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Biochemical Systematics and Ecology*. 76, 15-22.

**Guignard, J. L. (1996).** *Biochimie Végétale*. Ed. Masson, Paris. France. 274 P.

**Guo, H., Zhang, D., & Fu, Q. (2016).** Inhibition of cervical cancer by promoting IGFBP7 expression using ellagic acid from pomegranate peel. *Medical Science Monitor Basic Research*. 22: 4881–48.

**Hammer, K. A. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86-985-990.

**Harbone, J. B. (1998).** *Phytochemical Methods A Guide To Moderns Techniques Of Plants Analysis*, 3rd Edition. P. 412.

**Harkati, B. (2011).** Valorisation et identification structurales des principes actifs de la famille Asteraceae. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.

**Haslam, E. (1994).** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* p11, 41-66.

**Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2012).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meatpaté at different temperatures. *Food Control*. 23: 66-72.

**Hellwig, F. H. (2004).** Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. *Plant Syst. Evol.* 246: 137-162.

**Henni, J. E. (1998).** Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran. 171 p.

**Holderness, J., Hedges, J.F., Daughenbaugh, K., Kimmel, E., Graff, J., Freedman, B., Jutila, and M.A. (2008).** Response of  $\gamma$   $\delta$  T Cells to Plant-Derived Tannins. *Critical Reviews in Immunology*. Pages 377-402.

**Hopkins, W. G. (2003).** *Physiologie végétale*. 2<sup>ème</sup> édition américaine, de Boeck et Lancier S.A, Paris : 514.

**INRAA, (2006).** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture.

**Isrin P. (2001).** *Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soin*. Ed : Larousse/ VUEF, 336 p.

**Judd, Walter S., Christopher S. Campbell, Elizabeth A. Kellogg, Peter F. Stevens, Michael J.**

**Donoghue (2008).** *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* (3<sup>e</sup> éd.). Sunderland, MA: Sinauer Associates. pp. 412–414. ISBN 978-0-87893-407-2.

**Jianjun, X., Yongxin, Z., & Haji, A. N. (2017).** Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 2095–2101.

**Jr, J. W. E., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., et Folts, J. (2005)** «Flavonoids and Heart Health, » *The Journal of Nutrition*, p. 719.

**Jackman and Smith. (1996).** Anthocyanins and betalains, in *Natural food colorants*. 2<sup>nd</sup> ed., eds., G.A.F. Hhendry and J.D. Houghton, Glasgow, UK: blackie Academic and Professional, pp. 244-309.

**Jain, P., et Himanshu, J. (2012)** «Coumarin: Chemical and pharmacological profile,» *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 2(6), pp. 236-240.

**K**abera, J. N., Kakana, P., Bigendako, M., and Tomani, J. C. (2000). Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie de l'IRST A la recherche des composés bioactifs à base de plantes : cas du RWANDJA. Lebanese Science Journal, Vol.14, No.2.

**Kaci, M. Z., Elothmani, D., & Boutekrabt L.B. (2015).** Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria Fruits. The international journal of tropical and subtropical horticulture. 71(1):17-26.

**Kanoun, K., Abbouni, B., BENIGNE, M.L., Benmahdi, F.Z., Marouf, B. (2014).** Étude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica Granatum* Linn sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr. Et *Fusarium Oxysporum* F.sp. *Radicis-Lycopersici*. European Scientific Journal, 10(12): 1-15.

**Karaali, A., Boyacioğlu, D., Güneş, G., et Ö. B. (2004)** «Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, » nutrition and health—STREP or CA European commission's the 6<sup>th</sup> framework programme for research.

**Karthikeyan, G., Vidya, A. K. (2019).** Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activity of pomegranate peel. 10-22.

**Khare, C. (2004).** Encyclopedia of Indian Medicinal Plants—Rational Western Therapy, Ayurvedic and other Traditional Usage. Springer, Germany, ISBN .3: 540-20033.

**Kilic, O. (2013).** «Essential oil compounds of three *Centaurea* L. taxa from Turkey and their chemotaxonomy, » J Med Plants Res, vol. 7(19), pp. 1344-1350.

**Koca, U., Süntar, T. P., Keles, H., Yesilada, E., et Akkol, E. K. (2009).** «In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. » ex Spreng. Journal of Ethnopharmacology, vol. 126(3), pp. 551-556.

**L**abed, F., Masullo, M., Mirra, V., Nazzaro, F., Benayache, F., Benayache, S., et Piacente, S. (2019). «Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity, » Fitoterapia, pp. 51- 55.

**Lansky, E. P., Newman, R.A. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology 109: 177 – 206.

**Larosa, M., Gonzalez-sarnes, A., Dolara, P. et Espina, J. C. (2001).** Anti inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nut Biochem.* 21(8):717–25.

**Le Loir, Y., et Gautier, M. (2010).** *Staphylococcus aureus*. Édition Tec & Doc. Edition Médical internationales. 300 p.

**Lee, K. H., Ibuka, T., Wu, R. Y., Geissman, T. A. (1977).** Structure antimicrobial activity relationship among the sesquiterpenes lactones and related compounds. *Phytochimistry.* 16: 1177.

**Lee, K. H., Park, S. J., Choi, S. J., & Park, J. Y. (2017).** *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* Decrease *Candida albicans* Biofilm Formation by Suppressing Morphological Transition to Its Hyphal Form. *Yonsei Medical Journal*, 58(6), 1135.

**Leonardi, M., Ivaldi, G., Santoro, L., Lazzari, R., Ferrari, A., Morra, A., Caldarella, P., Burgoa, L., Bassi F., et Sangalli, C. (2011).** «Long-term side effects and cosmetic outcome in a pool of breast cancer patients treated with intraoperative radiotherapy with electrons as sole treatment, » *Tumori*, vol. 98 (3), p. 324–330.

**LEVIN, G. M. (1985).** Dwarf fruiting forms of pomegranate. *Trudy Nauchno Issledovatel' skogo Instituta Sadovodstva, Vinogradarstva i Vinodeliya Imeni R R Shredera* 47: 23–25.

**Levin, G. M. (2006).** *Pomegranate roads: a Soviet botanist's exile from Eden.* pp. 15 183. B.L. Baer (ed.), Floreat Press, Forestville, CA.

**Li, Y., Ye, T., Yang, F., Hu, M., Liang, L., He, H., Li, Z., Zeng, A., Li, Y., Yao, Y., Xie, Y., Li, Z., & An, S. (2016).** *Punica granatum* (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and antimetastasis activity in thyroid cancer. *Royal Society of Chemistry.*6: 84523–84535.

**Liu, J. Y. (2003).** Duanzhihong, a spur type pomegranate variety. *China Fruits* 6:3–4.

**Lourenco PML.de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A., Domingos, A. (2002).** Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: Effect of nitrogen and sucrose *Enzyme and Microbial Technology.* 31(3): 242-249. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00117-5)

**Mabberley, David, J. (2008).** *Mabberley's Plant Book: Un dictionnaire portable des plantes, leur classification et leurs utilisations* (3e éd.). Cambridge: Cambridge University Press. p. 508. [ISBN 978-0-521-82071-4](https://doi.org/10.1017/9780521820714)

**Mabberley, D. J. (1987).** *The plant book* cambridge university pres. 110.



**Macheix, J. J., Christian, J.A., Allemand, J. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Collection biologique, press polytechniques et universitaires, Romandes pp.1-192.

**Mahmoudieh, M., Keleidari, B., Esfahani, F. N., Zolfaghari, B., Melali, H., Jazi, A. H., & Mokhtari, M. (2019).** The effect of *Punica granatum* L. flower extract on post-surgica peritoneal adhesions in a rat model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*.246: 113-116.

**Malešev, D., et Kuntić, V. (2007)** «Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions,» *Journal of the serbian chemical society*, vol. 72 (10), pp. 921-939.

**Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N. & Mukhtar, H. (2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.102: 14813–14818.

**Marjorie, M. C. (1999).** Plant products as antimicrobial agents.*Clin MicrobiolRev.* 12 (4): 564-582.

**Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S. (2016).** Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry Journal*. 202: 59–69.

**Massimo, A., Carmela, F., Roberta, D.B., Raffaella, G., Claudio, G., and Roberta, M. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 43: 348-361.

**Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima S., Yoshikawa, M. (2002).** Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 50(7): 972-975. DOI: 10.1248/cpb.50.972.

**Maurizid, B., et Werner, H. (1988).** *Phytochemistry*, vol.27, N°.6, 1871-1872, methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 397-402.

**Meddour, A., Yahial, M., Benkiki, N., Ayachi, A. (2013).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparid spinosa I. *Lebanese Science Journal* ; Vol. 14, No. 1, 49.

**Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., Aclinou, P. (1997).** Guaianolide from *Centaurea musimomum*, *Phytochemistry*. 45(7): 1449-1451. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00813-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00813-8).

**Medjroubi, K., Benayache, F., et Bermejo, J. (2005).** «Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. antiplasmodial and cytotoxic activities, » *Fitoterapia*, vol. 76, pp. 744-746.

**Meftah, T. (2003).** *Cosmétologie à la naturelle cosmétologie au naturel*. Programme UICN d'Afrique du Nord, Algérie, 12 P.

**Melgarejo, P., et Salazar D.M.S. (2003).** *Tratado de fruticultura para zonas aridas ysemiáridas* .Vol.2. : Algarr. 416p.

**Melgarejo, P., et Salazar, D. M .S. (2003).** *Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiáridas*. Vol. 2 : Algarr. 416 p. In : HMID I. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica Granatum L.*) : Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Maroc : Université de Béni Mellal, 2013,180 p.

**Melgarejo, P., Valero, D. (2012).** Series A: Mediterranean Seminars. International symposium on the pomegranate N° 103, Espagne.

**Messiaen, C. M. (1981).** Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes. Edition INRA. Paris. 374 p.

**Michico, M., Nakano et Peter Zuber. (1998).** « ANAEROBIC GROWTH OF A “STRICT AEROBE” (*BACILLUS SUBTILIS*) », *Annual Review of Microbiology*. 52: 165-190.

**Mishio, T., Houma, T., Iwashina, T. (2006).** Yellow flavonoids in *centaurea ruthencia* as flower pigments. *Biochemical systematics and ecology*.34:180-184.

**Mithun, S., Sreedam, C. D., Sajal, K. S., Zobaer, A. M., & Sitesh, C. B. (2012).** Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Flower Extracts of *Punica granatum Linn* (Punicaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2: 133–136.

**Moreira, H., Slezak, A., Szyjka, A., Oszmianski, J., & Gasiorowski, K. (2017).** Antioxidant and cancer chemopreventive activities of cistus and pomegranate polyphenols. *The international journal of the Polish Pharmaceutical Society* .74: 688– 698.

**Muanda, F. N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat université Paul Verlaine-Metz.

**Mustafa, S. M., Chua, L. S., El-Enshasy, H. A., Abd Majid, F. A., & Hanapi, S. Z. (2020).** Kinetic profile and anti-diabetic potential of fermented *Punica granatum* juice using *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*.102:14-20.

**N**arayana, K. R., Reddy, M. S., MR, C., et DR, K. (2001) «Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, » Indian journal of pharmacology, vol. 33, pp. 2-16.

**Nasri, I. (2016).** Etude phytochimique et activités biologiques de : diplotaxis sp. Application à l'étude des cellules souches coliques pathologiques. Thèse de doctorat.

**Newman, D. J., Cragg, G. M. (2012).** Natural Products As Sources Of New Drugs Over The 30 Years From 1981 To 2010. J. Nat. Prod. Vol. (75): 311-335.

**Ngobum, E., TaiweG, S., & Moto, F.C. (2009).** Anticonvulsant, anxiolytic and sedative properties of the root of Nauclea latifolia Smith in mice. Epilepsy and Behavior, 15: 434-440.

**Nijveldt, R.J., Nood, E.V., Hoorn, D., Boelens, P., Norren, K., and Leeuwen, P. (2001).** Flavonoids, a review of probable mechanisms of action and potential application. American Society for Clinical Nutrition. 74: 418-425.

**O**ussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessennd, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanovad, J. (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. European Journal of Scientific Research, 24(1): 94-103.

**P**andey, K. B et Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2(5): 270 – 278.

**Pizzi, A., and Cameron, F.A. (1986).** Flavonoid, tannins, structural wood components for drought-resistance mechanisms of plants. Wood Sci. Technol. 20, 119–124.

**Ponce, A. G., FRITZ, R., DELVALLE, C. & Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial Activity Of Essential Oils On The Native Microflora Of Organic Swiss Chard.

**Q**uezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle Flore D'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales, 4Tome II, CNRS, Paris.

**Quillien, J. F. (2002).** Les mycotoxine In “programme 5th Framework Programme under the Quality of Life and Management of Living Resources, key Action 1”. Paris: INRA. 24p.

**Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., and Yu, and O. (2005).** Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. *Plant Physiology*. 137(4): 1375-1388.

**Reed, J. D. (1995).** Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal and science*. 73: 1516-1528.

**Reguieg Yssaad, A et Hammadi, K. (2017).** *In Vitro* Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*). *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4 (6), 100-107.

**Reguieg, M., yssaad, A. (2019).** L’effet de punica granatum sur la flore gastrique .etude in vitro et in vivo chez le rat. Université abdelhamid ben badis de mostaganem.

**Relouzat R. & Thiollrt J.P. (2002).** Combattre la douleur, 1ère édition. , Anagramma.

**Richard, C. et Kiredjian, M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l’identification des bacilles à gram négatif aérobies strict : Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. Ed. Institut. Pasteur, Paris, 42-43 p.

**Rojas, R. R., Charlet, L. D., Leopold, R. A. (1992).** A differential scanning calorimetric method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493.

**Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., and Fujisawa, S. (2005).** Molecular requirements of lignin carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*. 66 (17): 2108-2120.

**Salle, J. L. (1991).** Le Totum en phytothérapie, 1ère édition. FrissonRoche, Paris: 33.

**Sánchez-Chávez, E., Rodríguez, A., Castro-Castro, A., Angel Pérez- Farrera, M., & Sosa, V. (2019).** Spatio-temporal evolution of climbing habit in the Dahlia-Hidalgoa group (Coreopsidae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135, 166–176.

**Sánchez-Monge, E. (1974).** Fitogenética (mejora de plantas). Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio d’Agricultura. Madrid, 456 pp.

- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A. (2000).** Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 80: 1094-1117.
- Sarker, M., Das, S. C., Saha, S. K., Al Mahmud, Z., & Bachar, S. C. (2012).** Analgesic and anti-inflammatory activities of flower extracts of *Punica granatum* Linn. (Punicaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2: 133.
- Sarni-manchado, P., & Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, 1ère édition. TEC et DOC, Paris: 1.
- Sarni-Manchado, P., et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. Vol. (130): 2073-2085.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., Brakhage, A. (2014).** Human and Plant Fungal Pathogens: The Role Of Secondary Metabolites. *Plos Pathog* 10:E1003859. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003859>.
- Schauenberg, P. (2006).** *Centaurea maroccana* Ball. Endémique d'Afrique du Nord.
- Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., and Nacro, M. (2010).** Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des sciences*, 10: 24.
- Sheete, M. D., Dubios, M. L., and Williamson, J. G. (2004).** *Pomegranate: Ancient Roots to Modern Medicine*. Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA. LEVIN, G. M. (1985). Dwarf fruiting forms of pomegranate. *Trudy Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Sadovodstva, Vinogradarstva i Vinodeliya Imeni R R Shredera* 47: 23–25.
- Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S., Celik, S., Nahar, L., Thoo-Lin, P., et Sarker, S. (2007).** «Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae),» *Journal of Natural Medicines*, vol. 61, pp. 164-169.
- Siban Mutahar, S., Al-Otaibi Mutlag, M., & Al-Zoreky Najeeb, S. (2012).** Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 3: 991–996.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., et Sokovic, M. (2000)** «lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity, » *Phytochemistry*, vol. 55(8), pp. 903-908.

**Smith, R. L., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Goodman, J. I., Marnet, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M. (2005).** A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food chem. toxicol.*, 43:345-363.

**Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., Jeanmonod, D. (2004).** *Botanique Systématique des plantes à fleurs*. 3ème édition, Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne, Suisse. pp. 348-349.

**Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., & Azeez, J. M. (2014).** Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International*. 1–12.

**Stevens, P. F. (2001-2011).** "[Site Web de phylogénie d'angiospermes](#)". Récupéré le 15 février 2011.

**Stover, E., et Mercure, E. W. (2007).** The Pomegranate .A New-look at the Fruit of Paradise *Hort Science*, 42 (5): 1088 – 1092.

**Tondi, G., Schnabel, T., Wieland, S., and Petutschnigg, A. (2013).** Surface properties of tannin treated wood during natural and artificial weathering. *Int. Wood Prod. J.* 4, 150–157.

**Toribio, M., Oriani, D., et Skliar, M. (2004).** «Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis*,» *Ars. Pharm*, vol. 45(4), pp. 335-341.

**Trenholm, H. L., Prelusky, D. B., Young, J. C. and Miller, J. D. (1988).** « Reducing Mycotoxins in Animal Feed », Publication 1827E, No. A63-1827/1988E, Agriculture Canada Ottawa, p 22.

**Turfan, Ö., Türkyılmaz, M., Yemiş, O. & Özkan, M. (2011).** Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. *Food Chemistry*.129 (4): 1644–1651.

**Vondopitte, J., Engbaek, E., Plot, P., Heuk, C. C. (1994).** *Bactériologie Clinique : techniques de base pour le laboratoire O.M.S. Genève*, 62-64.

**Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. B., Bouaziz, M., & Gdoura, R. (2017).** Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts

against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*.241:123–131.

**Wald, E. (2009).** Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy 1 : université HENRI POINCARÉ-Nancy 1, 158 pages.

**Walton, N. J., & Brown, D. E. (1999).** Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products, Edition. WORLD SCIENTIFIC: 1-14.

**Younos, C., Soulimani, R., Seddiqi, N., Baburi, O., and Dicko, A. (2005).** Etude ethnobotanique et historique des tamaris (*Tamarix* sp., tamaricaceae) et leurs usages actuels en Afghanistan. *Phytothérapie*, 6, 248-251.

**Zaika, L.L. (1988).** Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9: 97-117.

**Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Nedialkov, P., Mocan, A., Ćirić, A., et Mahomoodally, M. F. (2018)** «Identification of phenolic components via LC–MS analysis and biological activities of two *Centaurea* species: *C. drabifolia* subsp. *drabifolia* and *C. lycopifolia*, » *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 149, p. 436–441.

**Zeyons, O. (2008).** Études des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement .thèse doctorat, université de Paris VI - Pierre et Marie Curie, 71.

**Zhang, C., Rexrode, K.M., van Dam, R.M., Li, T.Y. and Hu, F. B. (2008).** Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality. *Circulation*, 117(13), pp.1658-1667.

## ملخص

وقد أدى ثرائها بمنتجات الايض الثانوية إلى المضي في استخلاصها من الأوراق باستعمال الميثانول ثم يتم تجزئة المستخلص الميثانولي باستخدام المذيبات ذات القطبية المتزايدة.

على أساس هذه البيانات كنا مهتمين بالدراسة البيولوجية و ذلك بتقييم نشاطيين بيولوجيين لهذه النباتين. أولاً، درسنا النشاط المضاد للبكتيريا على خمسة سلالات بكتيرية ( *Bcillus subtilis* ، *Staphylococcus aureus* ، *Esherichia coli* ، *Proteus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *vulgaris* ). تم تنفيذ هذا النشاط بطريقة الانتشار من أقراص مشربة بتاكيث مختلفة من المستخلصة. أظهرت النتائج ان مستخلص dichlorométhane لنبته *Centaurea papposa* هو الأكثر نشاطا على السلالات المختبرة بأقصى قطر تثبيط بلغ 15 ملم للتركيز الاولي (SM) ضد بكتيريا *Porteuse vulgaris*. في حين ان مستخلص n-butanol لنبته *Punica granatum L* كان له افضل قوة مضادة للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus* بقطر 26.5 ملم.

من ناحية أخرى، قمنا بتقييم النشاط المضاد للفطريات على ثلاث سلالات فطرية ( *Fusarium culmorum* ، *Fusarium* ، *Fusarium cerealis* ، *oxysporum* ) باستخدام طريقة الانتشار من الأبار و أظهرت النتائج ان هذه السلالات حساسة للغاية تجاه الثلاث مستخلصات مع مناطق تثبيط كبيرة.



## Abstract:

*Centaurea papposa* and *Punica granatum* L are plants belonging to the *Acteracea* and *Punicacea* family, respectively, their richness in secondary metabolites has led us to proceed to their extraction from leaves by methanol; then the methanolic extract is fractionated using solvents of increasing polarity.

On the basis of these data we were interested in the biological study and the evaluation of two biological activities of these plants. First, we studied the antibacterial activity on five bacterial strains (*Bacillus subtilis*, *staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomenas aeruginosa*). This activity is carried out by the diffusion method from discs impregnated with different concentrations of the extract. The results show that the dichloromethane extract of *Centaurea papposa* is the most active on the strains tested with a maximum diameter of inhibition of 15 mm for the initial concentration (MS) against *Proteus vulgaris*. Whereas, the n-butanol extract of *Punica granatum* L has the best antibacterial power against *staphylococcus aureus* with a diameter of 26.5 mm.

On the other hand, we evaluated the antifungal activity on three fungal strains (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*) by the method of diffusion from wells and the results show that the strains are very sensitive towards three extracts with significant areas of inhibition.

**Année universitaire : 2020/2021**

**Présenté par : Berdoudi asma  
Aouisset souha ihsen**

**Thème :** Evaluation des activités antifongique et antibactérienne des extraits de plantes des genres *Centaurea papposa* rouge et *Punica granatum* L. appartenant à la famille des Astéracées et Lythracées.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2 en Biochimie  
**Option :** Biochimie Appliquée

*Centaurea papposa* et *Punica granatum* L sont des plantes appartenant à la famille des *Acteracea* et *Lythraceae*, respectivement, leur richesse en métabolites secondaires nous a conduits à procéder à leur extraction à partir de feuilles par le méthanol ; puis l'extrait méthanolique est fractionné en utilisant des solvants à polarité croissante.

Partant de ces données nous nous sommes intéressés à l'étude biologique et l'évaluation de deux activités biologiques de ces plantes. Dans un premier temps nous avons étudié l'activité antibactérienne sur cinq souches bactériennes (*Bcillus subtilis*, *staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomenas aeruginosa*). Cette activité est réalisée par la méthode de diffusion à partir des disques imprégnés avec différentes concentrations de l'extrait. Les résultats montrent que l'extrait dichlorométhane de *Centaurea papposa* est le plus actif sur les souches testées avec un diamètre maximal d'inhibition de 15 mm pour la concentration initial (SM) vis-à-vis de *Proteus vulgaris*. Alors que l'extrait n-butanol de *Punica granatum* L a le meilleur pouvoir antibactérien contre *staphylococcus aureus* avec un diamètre de 26.5 mm.

D'autre part nous avons évalué l'activité antifongique sur trois souches fongiques (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium cerealis*) par la méthode de diffusion à partir des puits et les résultats montrent que les souches sont très sensibles vis-à-vis des trois extraits avec des zones d'inhibitions importantes.

**Mots clés :** *Centaurea papposa*, *Punica granatum* L, métabolites secondaires, activité antibactérienne, activité antifongique.

**Devant le jury :**

**Président du jury :** MOSBAH Asma (MCB) UPMC1.

**Encadrante :** BELLIL Inès (Maitre de Conférences- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** BENCHIHEUB Meriem (MCB) UPMC1.

**Date de sustenance :** 19 / 09 /2021

