



Master : Biotechnologie Microbienne

PROJET DE FIN D'ETUDES

***Activités antimicrobienne et antioxydante
d'extrait aqueux du fruit de Zizyphus lotus
et de l'écorce du fruit de Punica granatum***

Stage effectué à : Ecole supérieur de technologie Fes

Présenté par : Laila ELHANAFI

Encadré par :

- **Etablissement d'accueil :** Pr. LAIRINI Sanae
- **FST- Fès :** Pr. HAGGOURD Abdelatif

Soutenu le : 26 juin 2012

Jury :

Pr. HAGGOURD Abdelatif

Pr. LAIRINI Sanae

Pr. SQUALLI HOUSSAINI Hakima

Pr. AMRANI JOUTEI khalid

Année universitaire : 2011-2012



Je dédie ce travail :

A mes très chers parents

Source d'amour et d'agrément inépuisable

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma vive gratitude, mon intime attachement et ma profonde affection.

Je ne saurai et je ne pourrai vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent.

Qu'ALLAH vous protège.

A ma grande mère LHAJA CHAMA

Pour sa prière.

A mon cher KHALID.

A mes chers frères et chères sœurs.

Pour leurs soutiens

Qu'ALLAH vous assiste et vous réserve une vie pleine de succès et de bonheur.

A tous les membres d'OREMA et du club Espoir.

Je vous aime tous en ALLAH

*A ma **Patrimoine**....*



REMERCIEMENTS

Mes remerciements à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes reconnaissances et mes sincères remerciements à **Mr. HAGGOUD Abdelatif** responsable de Master biotechnologie microbienne pour son soutien, son assistance, et sa disponibilité.*

*Je remercie aussi profondément Professeur **Mme LAIRINI Sanae** pour son assistance et son encadrement tout au long du stage.*

*Je remercie le professeur **Mlle ELHAMOUMI Aayah** pour son aide, son encouragement indéfini.*

*Je tiens à remercier également **Mr A.FaRAH, Mr A.TAHRI JOUTEI, Mr A.AARAB, et Mr LCHGUER**, qui m'ont beaucoup orienté.*

*Je voudrais aussi bien exprimer mes sincères remerciements aux Professeur, **Mme SQUALI, Mr EL EMRANI** qui m'ont honoré en acceptant de juger ce travail et de l'enrichir par leurs critiques constructives.*

Mes remerciements vont aussi aux enseignants de la formation en cycle Master biotechnologie microbienne.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES.....	1
Departement de Biologie <i>Etudes bibliographiques</i>	
<i>I-Plantes médicinales</i>	3

SOMMAIRE



I-1 historique	3
I.2.Définition	3
1 .3. Domaine d'application	4
<i>II- Plantes sélectionnées</i>	4
<i>II-1 Zizyphus lotus</i>	5
II-1-1 Description botanique du <i>Zizyphus lotus</i>	5
II-1-2 Classification botanique.....	5
II-1-3 Composition biochimique du <i>Zizyphus lotus</i>	5
II-1-4 Activités biologiques et thérapeutiques du <i>Zizyphus lotus</i>	7
<i>II.2. Punica granatu</i>	8
II.2-1 Description botanique.....	8
II.2.2 Classification botanique	8
II.2.3. Composition biochimique du <i>Punica granatum</i>	8
II.2.4. Activités biologiques et thérapeutiques du <i>Punica granatum</i>	9
<i>III -Méthodes d'extraction</i>	12
III.1. Méthodes conventionnelles	12
III.2. Méthodes modernes	13
IV. Activité biologique	16
IV.1. Activité antimicrobienne	16
IV .1.1 Activité antibactérienne	16
VI .1.2. Activité antifongique	17
IV.2. activité Antioxydante.....	17
IV.2.1.Définition	17
VI.2.2. Mode d'action des antioxydants.....	17



VI .2.3. Types des antioxydants	18
V. Polyphenols.....	18
V.1. Définition	18
V.2. Rôles des polyphénols	19

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	21
II. microorganismes utilisés et milieux de culture	21
III. Méthodes	22
III.1. Teneur en eau	22
III.2. Préparation des extraits	22
IV. Analyse qualitative des extraits	23
V. Analyse quantitative	24
VI. analyse biologique.....	25
IV.1. Test d'activité antimicrobienne	25
IV.2 Test d'activité antioxydante	26

Résultats et discussion

I. Teneur en eau	29
II. Préparation des extraits	29
III. Analyse qualitative des extraits	29
IV. Analyse quantitative des extraits	31
V. Activités biologiques	30
V.1. Activité antimicrobienne des extraits.....	30
V.2. Effet antioxydant.....	40

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques



Liste des tableaux

Tableau1. Teneur du fruit de <i>Zizyphus lotus</i> frais en métabolites primaires.....	6
Tableau2. composition chimiques de différents organes végétaux.....	7
Taleau3. Composition biochimique de <i>Punica granatum</i>	10
Tableau4. Comparaison entre l'effet antioxydant du jus de grenadine et autre jus des fruits.....	11
Tableau5. Différentes méthodes d'extraction, leurs avantages et inconvénients.....	14
Tableau 6. Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	20
Tableau7. Microorganismes, leurs sources et milieux de culture	22
Tableau8. Gamme de concentration en extrait.....	23
Tableau9. Degré de sensibilité des germes en fonction du halo formé en mm.....	26
Tableau10. Aspect, couleur, odeur et pH des deux extraits.....	30
Tableau11. Taux de polyphénols des deux extraits.....	31
Tableau12. Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait de l'écorce du fruit de <i>Punica granatum</i>	33
Tableau13. Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait du fruit de <i>zizyphus lotus</i>	34
Tableau14. Zones d'inhibition des deux extraits selon différents germes.....	37

Liste des figures



Figure1. Fruit du <i>Zizyphus lotus</i>	5
Figure2. Fruit du <i>Punica granatum</i>	9
Figure3. Réduction du radical DPPH	28
Figure4. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	31
Figure5. CMI en mg/ml de l'extrait de l'écorce du fruit de <i>punica granatum</i> en fonction des germes testés.....	35
Figure6. CMI de l'extrait du fruit de <i>zizyphus lotus</i> en fonction des germes testés.....	35
Figure7. effet des deux extraits sur la pomme de terre.....	40
Figure 8. % d'activité antiradicalaire des deux extraits.....	40

Liste des abréviations

BAW: n-Butanol/Acide acétique/eau.

BM : biotechnologie microbienne.

CAIM: communiqué de l'académie internationale de médecine.

CCM: chromatographie sur couche mince.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

EMB: Eosine Bleu de Méthylène.

LASSA: laboratoire agroalimentaire sanitaire et sécurité des aliments.

MRS : Man, Rogosa, shrape .

IPM: Le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes.

PAM: plantes aromatiques médicinales.

RF: rapport frontal.

TSA: Tryptic Soy Agar.

UV: Ultra violet.



Introduction générale

L'histoire des plantes aromatiques est associée à l'évolution des civilisations. Ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Par sa position géographique et sa diversité climatique, le Maroc recèle d'un patrimoine végétal important. Parmi ces ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale.

Zizyphus, est largement utilisé dans le traitement traditionnel et d'ailleurs il possède plusieurs activités thérapeutiques: anti-inflammatoire, (Borgi *et al.*, 2006), antifongique (Lahlou *et al.*, 2002), antibactérienne (Ghédira *et al.*, 1995) et anti-ulcérogénique (Borgi *et al.*, 2008).

D'autre part, la grenade fait un retour en force dans les phytothérapies à la faveur de nombreuses études qui démontrent ses propriétés antioxydantes, (Afaq *et al.*, 2005) antidiabétiques (Jafri *et al.*, 2000), anti-microbiennes (Braga *et al.*, 2005) et anticancéreuses (Kim *et al.*, 2002)

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes et antioxydantes des différents extraits du fruit de *Zizyphus lotus* (Sedra), et de l'écorce du fruit de *Punica granatum* (grenadine), surtout que récemment le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit de chercher des substances naturelles à partir des plantes aromatiques dotées d'activité antimicrobienne et antioxydante.

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Analyse qualitative des polyphénols des différents extraits du fruit de *Zizyphus lotus* et de l'écorce du fruit de *Punica granatum* en utilisant la CCM.
- Analyse quantitative du contenu en polyphénols, des différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus* et écorce de *Punica granatum*.
- Etude de l'activité antimicrobienne des différents extraits du fruit de *Zizyphus lotus* et écorce du fruit de *Punica granatum*.
- Etude de l'activité antioxydante des différents extraits du fruit de *Zizyphus lotus* et écorce du fruit de *Punica granatum*.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Etude bibliographique



I. Plantes médicinales

I.1. Historique

A l'aube de l'humanité, nos lointains ancêtres, chasseurs et cueilleurs ramassaient déjà pour agrémenter leur quotidien, des herbes comme l'oseille et l'ail sauvage, la consoude, etc. Elles servaient à fabriquer des décoctions lors des rituels magiques.

Durant l'antiquité dans les civilisations chinoises, indiennes et aztèques, on trouve la trace d'utilisation des plantes médicinales très anciennes et les Romains qui appréciaient une cuisine sophistiquée et très fortement aromatisée, utilisaient les plantes indigènes typiques du pourtour méditerranéen.

Les arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Ibn Albaytar rédigea le très complet *Somme des Simples*: ce livre contenait une liste de 1400 plantes médicinales et leurs préparations (Fouché *et al.*, 2000).

A compter du XIX^{ème} siècle et du début de l'ère industrielle, le recours à une médecine moderne, l'amélioration de la conservation des aliments et de l'hygiène sont autant de facteurs qui ont entraîné une lente désaffection vis-à-vis des plantes aromatiques.

L'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de la santé a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effet secondaire et cout élevé (Nostro *et al.*, 2000).

I.2. Définition

Les plantes médicinales peuvent être définies comme toute plante ou partie employée à des fins thérapeutiques ou contenant des substances pouvant fournir des médicaments par voie de synthèse ou d'hémi-synthèse (CANM, 2006).

1.3. Domaines d'application

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans la médecine et l'industrie: en alimentation, en cosmétologie, et en pharmacie.



1.3.1. En médecine: Au moins 35000 espèces végétales sont utilisées dans le monde à des fins médicales. Alors que les médicaments industriels les plus importants sont produits à partir de 90 espèces environ. Selon des estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, elles représentent aussi environ 70% des matériaux de base des produits pharmaceutiques modernes.

➤ Urologie, dermatologie, ulcères d'estomac, toux (Svobado *et al.*, 1999).

➤ Cardiovasculaire (Nayarama *et al.*, 2001).

➤ Contre maladies de stress et effet anti-oxydant : d'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles des romaran sauge, origon, thym (Cuvelier *et al.*, 1996).

1.3.2. En alimentation : les épices et les herbes sont beaucoup utilisées dans l'alimentation. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimulations générés par une multitude des composés organiques dont certains sont volatils : les huiles essentielles; les autres non volatils sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur (Richard et Multen, 1992).

1.3.3. En agriculture : les huiles de certaines plantes ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de certains insectes et nématodes (Amjad *et al.*, 2005)

1.3.4. En cosmétique : des produits de beauté, parfums et articles de toilettes, produits d'hygiène (Porter, 2001).

1.3.5. Des suppléments diététiques (Smallfield, 2001).

II. Plantes étudiées

II.1 Zizyphus lotus

II.1.1 Description botanique du *Zizyphus lotus*

Zizyphus lotus (**jujubier**) est un arbuste fruitier, épineux appartenant à la famille des Rhamnacées. Communément appelé en Afrique du Nord "Sedra". Il forme des touffes de quelques mètres de diamètres pouvant atteindre 2m de haut (Borgi *et al.*, 2007).



F
i
g
u

re1. Fruit du
Zizyphus lotus

II.1.2. Classification botanique

Embranchement	<i>Spermatophyte.</i>
Sous embranchement	<i>Angiosperme</i>
Sous classe	<i>Dicotylédone.</i>
Ordre	<i>Celastrales</i>
Famille	<i>Rhamnacées.</i>
Genre	<i>Zizyphus.</i>
Espèce	<i>Zizyphus lotus</i> (Quezel <i>et al.</i> , 1962).

II.1.3 Composition biochimique du *Zizyphus lotus*

Les études phytochimiques menées sur le *Zizyphus lotus* montrent la présence des métabolites primaires et secondaires (Catoire *et al.*, 1994).



a) métabolites primaires

Le tableau ci-dessous indique le pourcentage des différents métabolites primaires dans le fruit du *Zizyphus lotus*.

Tableau1. Teneur du fruit de *Zizyphus lotus* frais en métabolites primaires (Catoire *et al.*, 1994).

La fraction de la pulpe du fruit	Le pourcentage
Sucres	20% à 32%
lipides	0,1% à 0,3%
protides	0,8% à 2,1%

b) métabolites secondaires

Le fruit de *Zizyphus lotus* est connu par son contenu en molécules biologiquement actives tels que les polyphénols et les triterpènes.

Tableau2. Composition chimiques de différents organes végétaux (Borgi *et al.*, 2007)

Organe végétal	Composition chimique	Références
Fruits	<ul style="list-style-type: none">flavonoides.Tannins.Saponines.	(Borgi <i>et al.</i> , 2007)
Feuilles	<ul style="list-style-type: none">flavonoides.tanins.alcaloïdes.	(Borgi <i>et al.</i> , 2007)
Ecorces de racines	<ul style="list-style-type: none">flavonoidestaninsAlcaloïde.	(Borgi <i>et al.</i> , 2007)



II.1.4 Activités biologiques et thérapeutiques du *Zizyphus lotus*

Les recherches actuelles sur les différentes activités pharmacologiques de *Zizyphus lotus* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine moderne. Parmi ces effets on souligne les plus importants :

a- Activités anti-inflammatoires

Les flavonoïdes et les saponines de l'écorce des racines du *Zizyphus lotus* ont montré une activité anti-inflammatoire significative (Borgi *et al.*, 2006).

b- Activités anti-ulcérogéniques

Zizyphus lotus (les feuilles, l'écorce des racines) possède une importante activité anti-ulcérogénique attribuée à la présence des tanins et des flavonoïdes connus par leur effets gastroprotecteur (Borgi *et al.*, 2006).

C -Activité antibactérienne

(Ghédira *et al.*, 1995) a montré qu'un alcaloïde de cette espèce présente une activité antibactérienne significative, sans négliger l'effet synergique des autres molécules à effet antimicrobien.

d- Activité antifongique

Plusieurs types de champignons sont inhibés par les tanins comme par exemple: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium cupreum*, *Collectotrichum graminicola* (Lahlou *et al.*, 2002).

e- Autres activités

Les fruits de *Zizyphus lotus* sont décrits comme adoucissant, et entrent dans le traitement de la gorge et les irritations broncho-pulmonaires. De même, la poudre des feuilles sèches et des fruits est appliquée dans le traitement des furoncles (Borgi *et al.*, 2007). D'ailleurs l'écorce des racines du *Zizyphus lotus* est utilisée dans la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète (Ghedira *et al.*, 1995).

II.2. *Punica granatum*

II.2.1. Description botanique

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée, Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée (Garnier *et al.*, 1961).



Figure2. Fruit du *Punica granatum*

II.2.2. Classification botanique

- Embranchement: *Spermaphytes*
- Sous-embranchement: *Angiospermes*
- Classe: *Magnoliopsida*
- Ordre: *Myrtales*
- Famille: *Punicaceae*
- Genre: *Punica*
- Espèce: *Punica granatum* (Spicheger *et al.*, 2004).

II.2.3. Composition biochimique du *Punica granatum*

Punica granatum est une bonne source de protéines, fibre, sucres simples, oligo-éléments et



minéraux et même des métabolites secondaires.

**Taleau3. Composition biochimique de *Punica granatum*
Fournier *et al.*, 1948)**

Organe végétal	Composition chimique	Références
Ecorce de fruit	<ul style="list-style-type: none">• flavonoïdes• Tannins• Acides polyphénoliques.	(Fournier <i>et al.</i> , 1948)
Feuilles	<ul style="list-style-type: none">• flavonoïdes• tannins	(Fournier <i>et al.</i> , 1948)
Graines	<ul style="list-style-type: none">• acides gras insaturés• acides gras saturés• tannins• Stérol	(Fournier <i>et al.</i> , 1948)

II.2.4. Activités biologiques et thérapeutiques du *Punica granatum*

- **Anticancérigène:** les extraits de jus de grenade semblent pouvoir ralentir le développement des cellules cancéreuses et la formation de tumeurs prostatiques (Malik *et al.*, 2005). D'autre part ils semblent présenter d'intéressantes et multiples propriétés contre le cancer du sein, aussi bien dans un but préventif que dans un but thérapeutique (Kim *et al.*, 2002)
- **Activité Antioxydante:** Des expériences ont été menées afin de comparer le pouvoir antioxydant du jus de grenade à celui d'autres jus de fruits. Les résultats de celle-ci sont répertoriés dans le tableau ci dessous.

Ces résultats conduisent le jus de grenade en tête des onze jus de fruits étudiés, en effet, il possède le plus fort pouvoir pour inhiber l'oxydation des LDL, et aussi la plus grande capacité à bloquer les radicaux libres (Afaq *et al.*, 2005).

**Tableau4. Comparaison entre l'effet antioxydant du jus de grenadine
et autre jus des fruits (Afaq *et al.*, 2005)**



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

- **Activité antidiabétique:** Les fleurs de grenadiers semblent donc posséder de réelles propriétés hypoglycémiantes. Néanmoins, le mode d'action exacte de cette fleur ne paraît pas encore être totalement élucidé (Jafri *et al.*, 2000).
- **Activité antimicrobienne:** l'extrait de grenadine permet d'améliorer l'action antibactérienne de certains antibiotiques, et de lutter contre l'apparition de souches bactériennes résistantes aux traitements (Barga *et al.*, 2005).

II. Méthodes d'extraction

Les techniques d'extraction sont nombreuses, certaines sont utilisées de longue date par l'homme, d'autres sont le résultat d'avancées récentes, et toutes ont pour but de récupérer un corps pur (arôme, médicament...) à partir d'un mélange. On peut distinguer :



III.1. Méthodes conventionnelles

- ❖ **Le pressage** (ou expression): Cette opération consiste à « faire sortir » un produit en exerçant une pression.
- ❖ **La décoction**: On place des plantes coupées en morceaux très fins dans de l'eau froide ou un autre solvant et on porte le tout à ébullition.
- ❖ **L'infusion**: On laisse tremper des végétaux coupés dans de l'eau bouillante ou dans tout autre solvant à chaud, de façon à y dissoudre les principes actifs.
- ❖ **L'enfleurage**: On étale des pétales de fleurs sur de la graisse ; Celle-ci extrait les parfums et les odeurs de la plante et, une fois saturée, elle est traitée à l'alcool. Celui-ci est ensuite évaporé sous vide. Il reste alors un résidu très parfumé, l'« absolue », qui servira à la fabrication des parfums.
- ❖ **Extraction par solvant**: L'extraction par solvant consiste à dissoudre le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer la phase organique contenant le composé à extraire de la phase aqueuse. Le choix du solvant obéit à trois critères et nécessite la connaissance d'un paramètre physique caractéristique de ce solvant.
 - L'Etat physique du solvant : Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction.
 - Miscibilité du solvant : Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
 - Solubilité: Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).
 - Densité du solvant: Il est nécessaire de connaître ce paramètre car c'est lui qui détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au dessus ou en dessous de la phase aqueuse (à éliminer) dans l'ampoule à décanter.
- ❖ **Soxlet**: Dans un système conventionnel de Soxlet; la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de



la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.

- ❖ **Hydro-distillation:** Les plantes sont placées dans un alambic, puis chauffées avec de l'eau. La chaleur intense fait exploser les petites poches qui contiennent les huiles, et celles-ci se répandent dans la vapeur d'eau. Elles sont ensuite canalisées dans un condensateur et réfrigérées pour se liquéfier à nouveau. A la sortie, un essencier ou «séparateur florentin» sépare l'huile qui flotte à la surface de l'eau de distillation, (ou hydrolat), à base de fleurs ou d'herbes aromatiques.

III.2. Méthodes modernes

- ❖ **Le CO₂ supercritique :** L'état supercritique est un état qui n'est ni liquide ni gaz. La pression est alors supérieure à 74 bars et la température supérieure à 31°C. A cet état, le CO₂ a des propriétés particulières. En effet, il possède un bon pouvoir extractant, Le procédé d'extraction par CO₂ supercritique fonctionne en circuit fermé. Ce circuit comporte des organes de mise en pression (pompes), et en température (échangeurs) afin d'amener le CO₂ au-dessus du point critique. Le produit à traiter en extraction est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO₂. Le fluide se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli à l'état liquide(ou pâteux) dans un séparateur
- ❖ **L'hydrodistillation assistée par ultrasons:** Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les microcavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées.
- ❖ **L'expression à froid :** Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle.

Les différentes méthodes d'extraction, conventionnelles et modernes peuvent être résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau5. Différentes méthodes d'extraction, leurs avantages et inconvénients.

	Méthodes	avantages	Inconvénients
M E T H O D E S T R A D I T I O N N E L L E S	➤ Décoction, infusion	<ul style="list-style-type: none"> • Totalement naturel • Facile à réaliser 	<ul style="list-style-type: none"> • Longue durée • La montée de température peut dégrader les principes actifs.
	➤ pression	<ul style="list-style-type: none"> • Faible consommation d'eau et d'énergie 	<ul style="list-style-type: none"> • risques de dégradation de la qualité • très longue durée
	➤ enfleurage	<ul style="list-style-type: none"> • Totalement naturel • Température faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxydation due à l'exposition à l'air • Tres longue durée
	➤ Extraction par solvant	<ul style="list-style-type: none"> • Température faible • Extraction des plantes fragiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvants peuvent être toxiques • Longue durée
	➤ Hydrodistillation Traditionnelle	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à réaliser 	<ul style="list-style-type: none"> • Température élevée • Longue durée • Réalisée sur faible quantité de plantes
	➤ Soxlet	<ul style="list-style-type: none"> • Installation simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Durée longue • Impossible d'accélérer l'opération par agitation



M E T H O D E S	➤ CO2 supercritique	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de solvant dangereux • Pas de dénaturation d'odeurs due aux produits chimiques • CO2 adaptable a tous les plantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Installation couteuse
M O D E R N E S	➤ Expression a froid	<ul style="list-style-type: none"> • Totalement naturel • Température faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisable seulement sur les agrumes • Oxydation due au contact à l'air • Très longue durée
	➤ Ultrasons	<ul style="list-style-type: none"> • Température faible • Rapidité • Pas de solvants chimiques polluants 	<ul style="list-style-type: none"> • Cout de l'installation

Cette description des procédés d'extraction montre la complexité des processus d'obtention des huiles essentielles ce qui entraine une présomption de coût élevé qui dépend du coût des matières premières, solvants, installations, et l'énergie utilisée.

IV. Activités biologiques

IV.1. Activité antimicrobienne

IV .1.1 Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des extraits des plantes médicinales contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Depuis, de nombreuses huiles ont été définies



comme antibactériennes. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail des bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Les extraits des plantes médicinales agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol) des alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes (Dorman et Deans, 2000).

Les alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (Dorman et Deans, 2000).

Les aldéhydes sont de puissants agents antimicrobiens. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (Dorman et Deans, 2000).

Les polyphénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide et bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (Lambert, Skandamis *et al.*, 2001). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichiae coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K⁺. Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino, *et al.*, 1999).

VI .1.2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreuses études contre les moisissures et les champignons pathogènes tels que l'étude de (Prudent *et al.*, 1995) qui a noté que l'huile essentielle de citrus montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, et d'autre moisissures.

IV.2. activité Antioxydante



IV.2.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent aussi inoffensifs (Vansant, 2004).

VI.2.2. Mode d'action des antioxydants

D'une manière générale un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapide que celui. Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électron souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de position appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants en fait bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène ou des agents de terminaison capables de dériver ou piéger les radicaux libres en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant les réactions en chaîne de peroxydation, en réagissant avec un radical d'acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Vansant, 2004).

VI.2.3. Types des antioxydants

Antioxydant de type I : il s'agit de substance capable d'interrompre la chaîne radicalaire en cédant un hydrogène à un radical libre lipidique. Les radicaux qui se forment sont relativement stables et ne possèdent pas d'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides. Ils subissent une réaction d'arrêt aboutissant à la formation de produit non radicalaire.

Antioxydant de type II : les antiradicaux de cette catégorie sont les composés qui agissent en empêchant ou en diminuant la formation des radicaux libres; les plus utilisés sont les agents complexant des ions métalliques réduisant l'effet pro-oxydant des ions (exp : acide phosphorique)



Antioxydant de type III : ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydant, en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression de l'oxygène, la lumière, l'emballage des produits aussi permet de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière.

V. Polyphénols

V.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production.

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

V.2. Rôles des polyphénols

➤ Chez les plantes

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions:

- assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs.
- représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes.
- protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées.
- interviendraient dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Stalikas, 2007)

➤ Chez l'homme

Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées aux polyphénols:

- Anticancérigènes: (Li *et al.*, 2008)
- anti-ulcéreuses: Martin *et al.*, 1993



- anti-inflammatoire : (Nowakowska, 2007)
- Analgésiques: (Borsato *et al.*, 2000)

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999).

Matériel et méthodes



I. Echantillonnage

Nous avons travaillé sur deux plantes :

- fruit de *Zizyphus lotus*.
- écorce de *Punica granatum* ou *malicorium*.

Les échantillons, ont été récupérés de chez un herboriste, ensuite ils sont broyés à l'aide d'un broyeur pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant et faciliter l'extraction, la poudre ensuite est conservée à l'abri de la lumière.

II. Microorganismes utilisés et milieux de culture

Les microorganismes, leur origine, et les milieux de culture sélectionnés (voir annexe) pour la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau ci dessous.

Tableau7. Microorganismes, leurs sources et milieux de culture

Souches microbiennes	Source	Milieux
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram+	Laboratoire BM de FST	milieu Chapman
<i>Escherichiae coli</i> Gram-	Laboratoire BM de FST	milieu EMB
Bacteria lactiques Gram+	Laboratoire LASSA de EST	Milieu MRS
<i>Listeria monocytogenes</i> Gram+	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital ELGHASSANI	Milieu TSA
<i>Penicillium expansum</i>	Laboratoire BM de FST	Milieu sabouraud
<i>Geotrichum candidum</i>	Laboratoire LASSA de EST	Milieu sabouraud

III. Méthodes

III.1. Teneur en eau

Pour déterminer la teneur en eau, on fait une dessiccation de la matière fraîche à la



température de 103°C dans une étuve isotherme ventilée pendant 24h. La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation lorsque leur poids soit constant (Audigie *et al.*, 1987)

$$H\% = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) * 100$$

- **H%** : taux d'humidité ou teneur en eau.
- **M₀** : la masse de la capsule vide en (g)
- **M₁** : la masse de la capsule contenant la prise d'essai avant séchage (en g)
- **M₂** : la massa de la capsule contenant la prise d'essai après séchage (en g)

III.2. Préparation des extraits

L'extraction des deux échantillons est effectuée par la méthode d'infusion, en effet, plusieurs concentrations des deux échantillons ont été préparés avec de l'eau bouillante (32ml) et restées macérées pendant 2h sous agitation, les échantillons obtenus ont été filtrés et conservés à 4°C.

Tableau8. Gamme de concentration en extrait

Quantité d'échantillon (g)	Concentration (g/ml)
0.1	0,0312
0.2	0,0625
0.3	0,09
0.4	0,125
0.5	0,15
1	0,31
1.5	0,46
2	0,62
4	1,25

IV. Analyse qualitative des composés polyphénoliques

➤ Chromatographie sur couche mince

Pour une détermination de présence ou non des polyphénols dans les différents extraits du fruit de *Zizyphus lotus* et l'écorce du fruit de *Punica granatum*, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée. Cette technique de séparation est basée sur l'utilisation d'une phase



mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), dont la séparation dépend des phénomènes d'adsorption et de partage.

L'analyse des extraits est effectuée par un système de séparation BAW (butanol/acide acétique/eau) avec des proportions (60/15/35). L'acide gallique est un acide phénolique utilisé comme un standard.

5 μ l de chaque extrait et de standard (20mg d'acide gallique/100ml), sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par un système de révélation physique sous UV à 254nm (Diallo *et al.*, 2005).

V. Analyse quantitative

➤ Dosage des polyphénols

Afin de caractériser les différents extraits préparés à partir du fruit du *Zizyphus lotus* et écorce du fruit de *Punica granatum*, un dosage des polyphénols totaux a été effectué. Le choix du dosage de cette substance réside dans le fait que la majorité des propriétés biologiques des plantes leur sont attribués. Ce dosage repose sur le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit le réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés (Boizot *et al.*, 2006).

➤ Préparation de la gamme d'étalonnage

On prépare une solution mère de l'acide gallique (2mg) qu'on dissout dans 100ml d'eau distillée (S1), on dilue la solution en prélevant 5ml de la solution mère puis on ajoute 5ml d'eau distillée et on obtient la dilution (S2), on prélève 5ml de la (S2) et on ajoute 5ml d'eau distillée pour avoir dilution (S4), on refait la même procédure pour les autres dilutions (voir annexe)

➤ Détermination de la teneur en polyphénols



0.5ml de chaque extrait est ajouté à 0.5ml de l'eau distillée et 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu, après 3 mn, on ajoute 0.5 ml de carbonate de sodium à 20 % et on laisse incuber pendant une heure à température ambiante à l'abri de la lumière.

Le blanc est représenté par 0,5 ml d'eau distillée additionnée de 0.5 ml de Folin-Ciocalteu et 0.5 ml de carbonate de sodium à 20 %.

La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (Boizot et Charpentier, 2006).

Ce dosage a été effectué au laboratoire de biotechnologie de la faculté de médecine de Fès.

VI. Analyses biologiques

VI.1. Test d'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits obtenus, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (Choi *et al.*, 2006).

- **Repiquage des microorganismes:** les différents germes ont été repiqués par la méthode des stries, puis incubés à 37 °C pour les bactéries et 30 °C pour les champignons afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
- **Préparation de l'inoculum:** des colonies bien séparées des espèces microbiennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C pour les bactéries et pendant 48h à 30 °C pour les champignons.
- **Ensemencement:** des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des microorganismes. Ensuite on dépose un disque stérile de papier Wattman de 6mm, à l'aide d'une pince stérile, sur les germes au tout début de leur croissance. 10µl de l'extrait y est ajouté ensuite, et le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne, est ainsi déterminé après incubation.
- **Lecture:** Il est à rappeler que la lecture s'effectue toujours en comparaison avec une boîte témoin qui ne contient que le milieu de culture et le germe à tester. Cette boîte est toujours ensemencée en même temps que les autres boîtes et dans les mêmes conditions. La croissance au niveau des boîtes témoins est totale et complète après incubation.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Selon (Sanchez *et al.*, 2002) on a utilisé la méthode suivante :

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 5 mg de DPPH dans 25ml d'éthanol absolu. Séparément et dans 3 tubes, on prépare :

- Echantillon : 0,4 ml DPPH + 100µl d'extrait + 1.5ml éthanol absolu
- Contrôle négatif : 0,4ml DPPH + 1,6ml Ethanol
- Contrôle Blanc : 100µl d'échantillon + 1.9 d'éthanol absolu

Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(AbsC - Abs \text{ éch}) / Abs C] \times 100$$

Où :

Abs éch: absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle : absorbance du contrôle.



Résultats et discussion

I. Teneur en eau

D'après la formule: $H\% = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) * 100$

Les valeurs de la teneur en eau de l'extrait du fruit de *zizyphus lotus* et l'écorce du fruit de *Punica granatum* sont respectivement 3,33% et 7,33%

Les résultats ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10% pour les deux plantes étudiées. Ceci s'explique par la conservation pendant de longues durées, et même la répartition géographique des deux plantes qui sont répartis surtout dans les climats chauds.

II. Préparation des extraits

La couleur, l'aspect, l'odeur ainsi que le pH de chaque extrait sont représentés dans le tableau ci-dessous.



Tableau10. Aspect, couleur, odeur et pH des deux extraits

	Aspect	Couleur	Odeur	pH
<i>Zizyphus lotus</i>	pâteux	Marron foncé	Piquante rappelant l'odeur de zizyphus lotus	6
<i>Punica granatum</i>	pâteux	Jaune foncé	Piquante rappelant l'odeur de grenadine	6

III. Analyse qualitative des composés polyphénoliques

➤ Chromatographie sur couche mince

Le résultat de la CCM a été obtenu après 20mm de migration des extraits sur la plaque de silice, les tâches formées par les deux extraits de l'écorce du fruit de *Punica granatum* et *Zizyphus lotus* ont le même niveau de migration que celui formé par l'acide gallique (RF = 0,66) ce qui suggère la présence des polyphénols.

Cela est confirmé par l'étude de (Kriventsov *et al.*, 1970) et (Fournier *et al.*, 1948) qui ont montré, respectivement, la présence des polyphénols dans les fruits du *Zizyphus lotus* et dans l'écorce du fruit de *Punica granatum*.

IV. Analyse quantitative des extraits

➤ Dosage des polyphénols

Une courbe d'étalonnage s'avère nécessaire pour connaître la quantité trouvée en polyphénols dans nos extraits, cette courbe est représentée ci-dessous :

DO

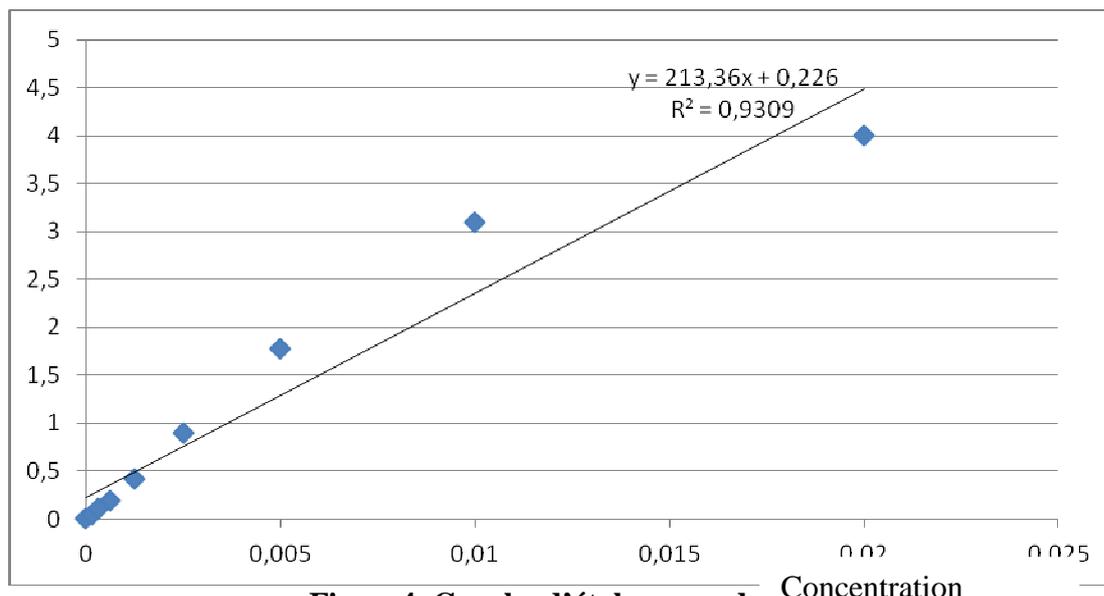


Figure4. Courbe d'étalonnage de Concentration

En se référant sur cette courbe d'étalonnage de l'acide gallique, on a pu déterminer les valeurs de polyphénols représentées sur le tableau ci-dessous.

Tableau11. Taux de polyphénols des deux extraits

	Taux de polyphénols
<i>Punica granatum</i>	18 ^(a)
<i>Zyziphus lotus</i>	15 ^(a)

(a) : μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que les extraits du fruit *zyziphus lotus* et de l'écorce du fruit de *Punica granatum* sont riches en polyphénols.

V. Activités biologiques

V.1. Activité antimicrobienne des extraits

Les zones d'inhibition (en mm) des différentes concentrations (mg/ml) étudiées des deux extraits sont représentées dans les deux tableaux suivants.

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne de 4 répétitions.

1- Ecorce du fruit de *Punica granatum*

Tableau12. Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait de l'écorce du fruit de *Punica granatum*.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

	$3,12 \cdot 10^{-2}$	$6,2 \cdot 10^{-2}$	$9 \cdot 10^{-2}$	0,12	0,15	0,31	0,46	$\frac{0,6}{2}$	1,25
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	10	12	16	18
<i>S.aureus</i>	0	0	0	9	10	10	11	13	16
<i>L.monocytogenes</i>	0	0	0	9	11	13	15	17	17
B.lactiques	0	0	0	7	10	12	13	13	12
<i>G.candidum</i>	0	0	0	3	11	14	16	17	21
<i>P.expansum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	10

2 – Fruit de *Zizyphus lotus*

Tableau13. Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait du fruit de *zizyphus lotus*

	$\frac{3,12 \cdot 10^{-2}}{2}$	$\frac{6,2 \cdot 10^{-2}}{2}$	$\frac{9 \cdot 10^{-2}}{2}$	0,12	0,15	0,31	0,46	0,62	1,25
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	0	9	10	12
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	7	8	9	10



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

<i>L.monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	8	8	9	11
B.lactiques	0	0	0	0	0	7	7	9	10
<i>G.candidum</i>	0	0	0	0	0	0	0	6	8
<i>P.expansum</i>	0	0	0	0	0	0	0	5	9

Les deux tableaux montrent l'augmentation du diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration, en effet ; on observe de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenues, allant de 2 mm à 21 mm pour l'extrait de l'écorce du fruit *Punica granatum* et de 5mm à 12mm pour l'extrait de fruit de *zizyphus lotus*.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que toutes les souches microbiennes testées sont très sensibles vis-à-vis des deux extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne du fruit de *zizyphus lotus* et écorce du fruit de *Punica granatum*, même si Le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI diffèrent d'un microorganisme à un autre

Les CMI des deux extraits sont représentés par la figure5 et 6 ci-dessous :

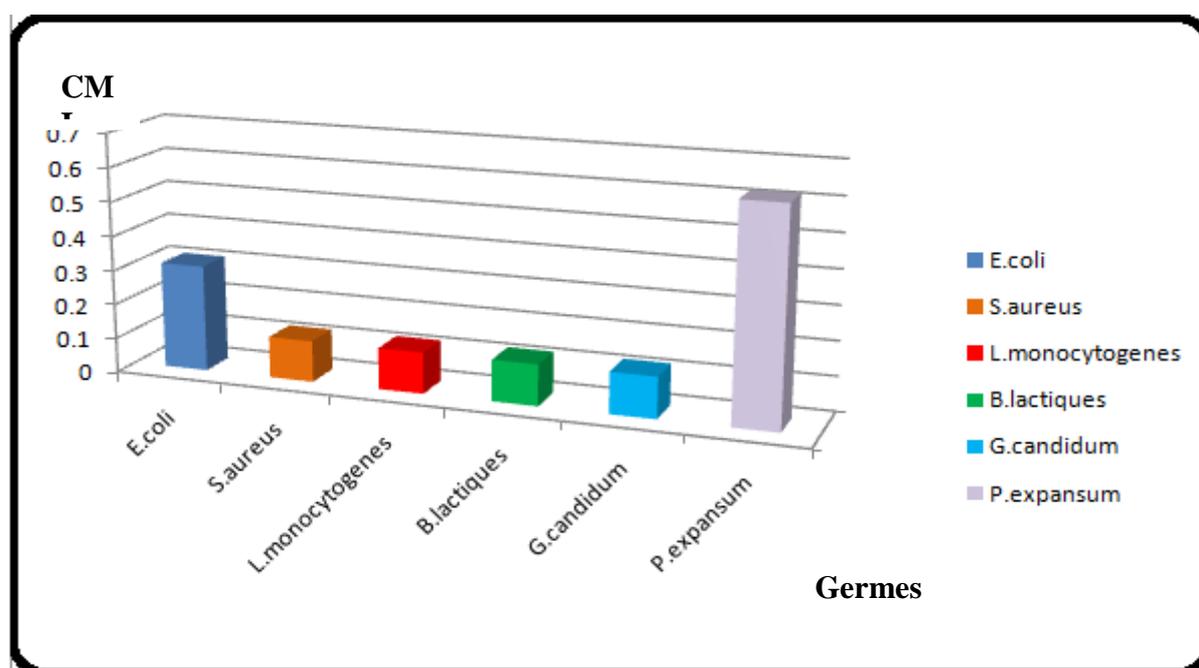


Figure5. CMI en mg/ml de l'extrait de l'écorce du fruit de *punica granatum* en fonction des germes testés

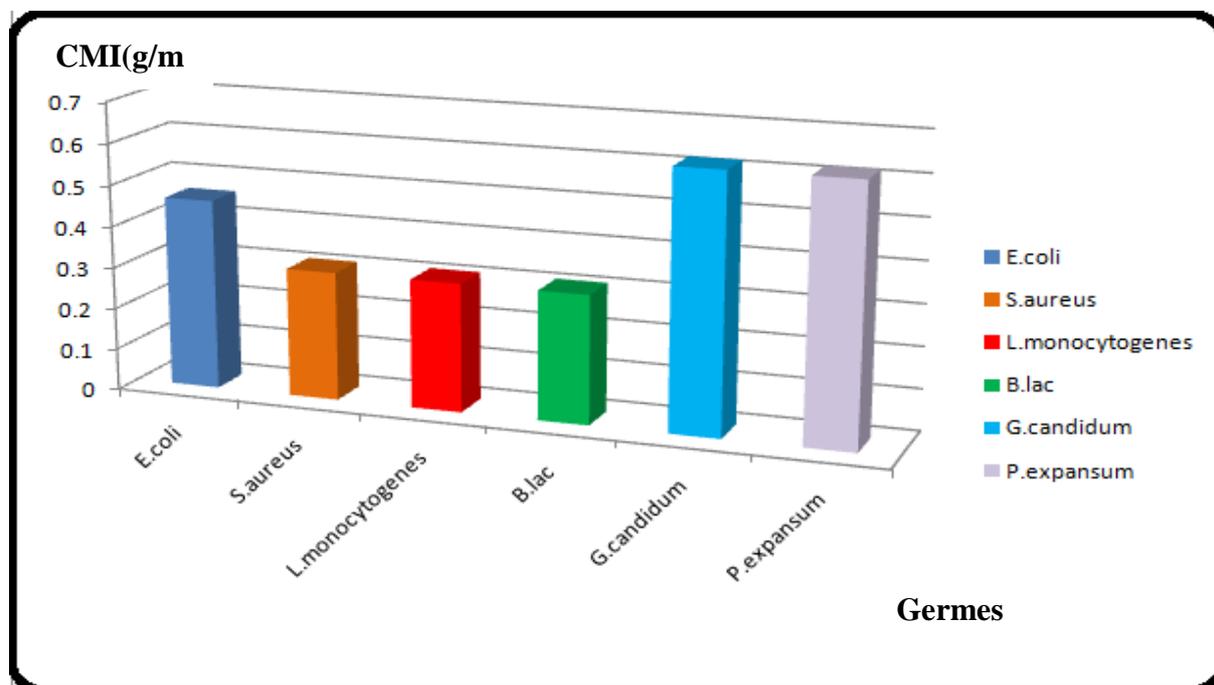


Figure6. CMI de l'extrait du fruit de *zizyphus lotus* en fonction des germes testés.

D'après les résultats, l'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* est montré très actif envers toutes les bactéries (avec des CMI: 0,31mg/ml pour *E.coli*, 0,12mg/ml pour *S.aureus*, *L.monocitogenes* et bactéries lactiques, par rapport à l'extrait de *zizyphus lotus* (où les CMI sont 0,46mg/ml pour *E.coli*, 0,31mg/ml pour *S.aureus*, *L.monocytogenes* et les bactéries lactiques).

Pour l'effet antifongique, l'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* est montré actif envers *G.candidum* et *P.expansum* qui sont inhibés respectivement à partir de CMI : 0,12mg/ml et 0,62mg /ml, par rapport à l'extrait du fruit de *zizyphus lotus* qui les a inhibés à partir 0,62mg/ml.

Il apparaît que les souches de *S.aureus*, *L.monocytogenes* et des bactéries lactiques (G+) sont les plus susceptibles par comparaison avec les souches de *E.coli* (G-); ceci peut être expliqué par la différence de la structure de la paroi entre les bactéries gram positives et les bactéries (G-) (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Globalement, nos extraits sont révélés riches en polyphénols, on peut dire alors que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols, cela est confirmé par l'étude de (king *et al.*, 1999) qui a attribué l'activité antibacterienne à la présence des polyphenols.

Les teneurs en polyphénols dans les extraits des deux plantes étudiées sont très proches, cependant, l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce du fruit de *Punica granatum* est plus importante. Cela peut être expliqué par le fait que cet extrait peut contenir en plus des polyphénols d'autres composés qui réagissent en synergie.

Le tableau14 montre les différentes zones d'inhibition engendrées par les deux extraits.

Tableau14Zones d'inhibition des deux extraits selon différents germes

• *Punica granatum*

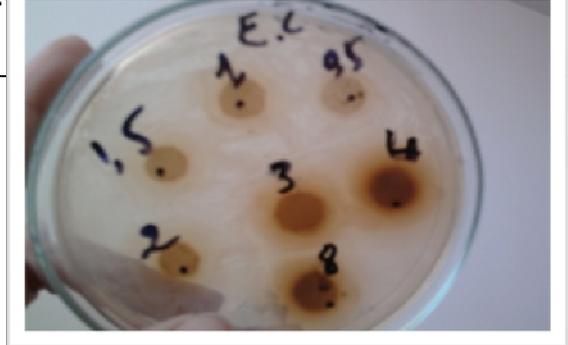
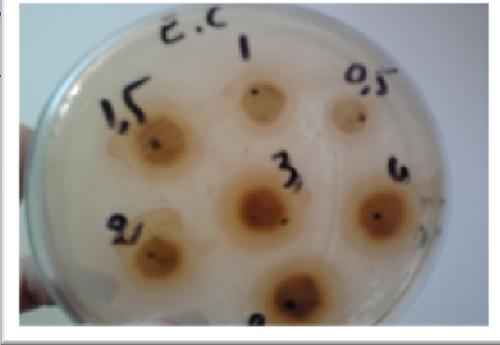
• *Zizyphus lotus*

➤ *Escherichia coli*

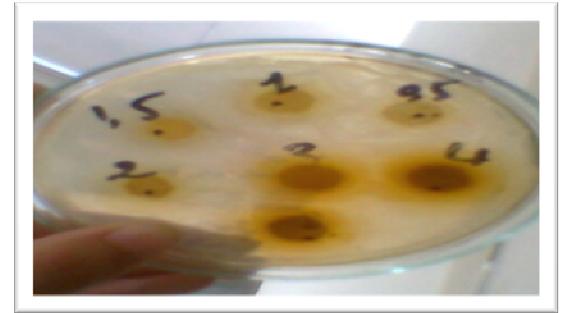
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

de Bi



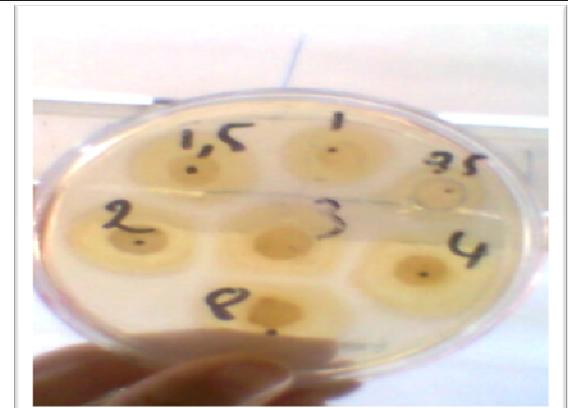
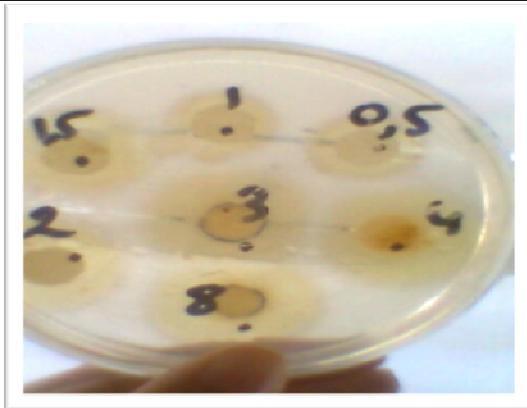
➤ *Listeria monocytogenes*



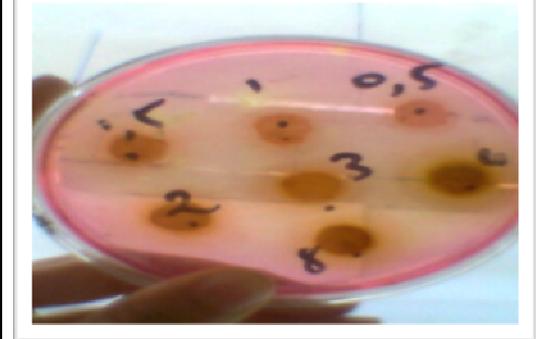
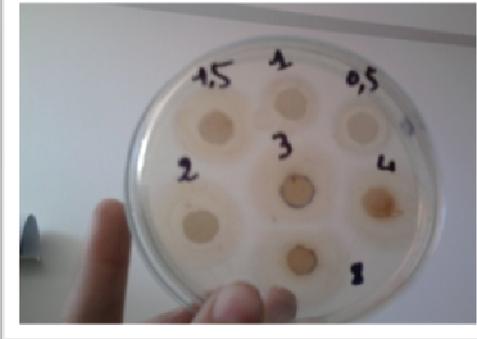
➤ Bactéries lactiques



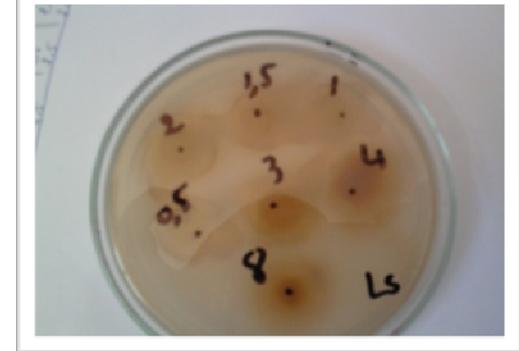
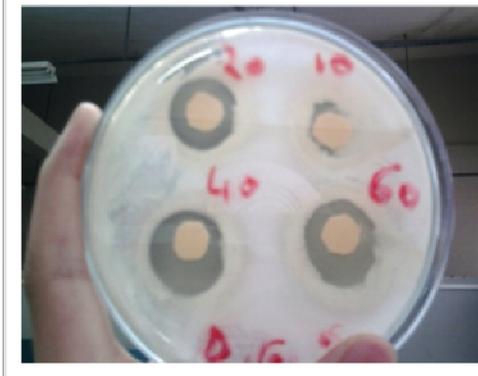
➤ *Geotrichum candidum*



➤ *Staphylococcus aureus*



➤ *Penicillium expansum*



V.2. Effet antioxydant

➤ Test préliminaire

On remarque que le témoin est devenu brun par contre l'extrait aqueux a permis aux pommes de terre de garder sa couleur naturelle.

Cela peut être expliqué par l'effet antioxydant des extraits qu'on va confirmer par le test DPPH.

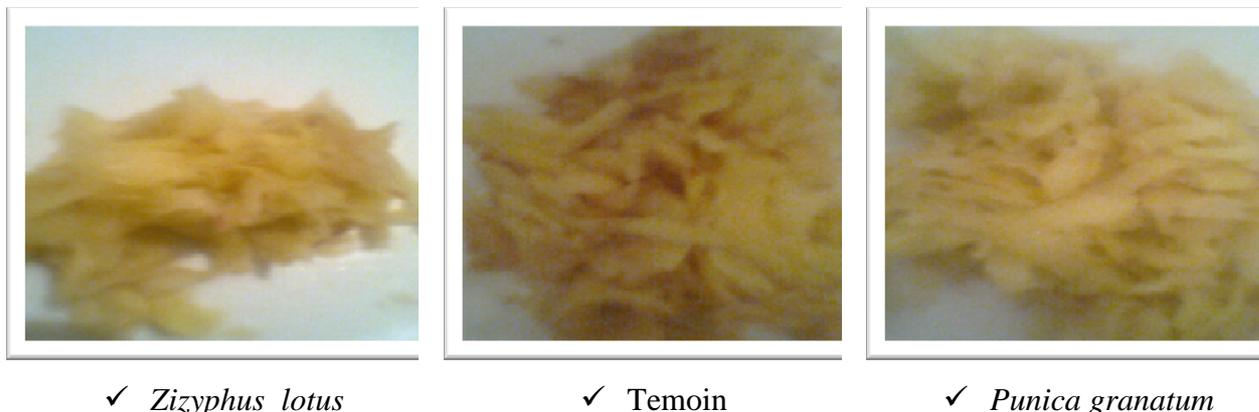


Figure7. Effet des deux extraits sur la pomme de terre

➤ **Test du radical DPPH**

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits du *Zizyphus lotus* possèdent une activité antiradicalaire de l'ordre de 85,79% et l'extrait de *Punica granatum* de l'ordre de 87,43%.

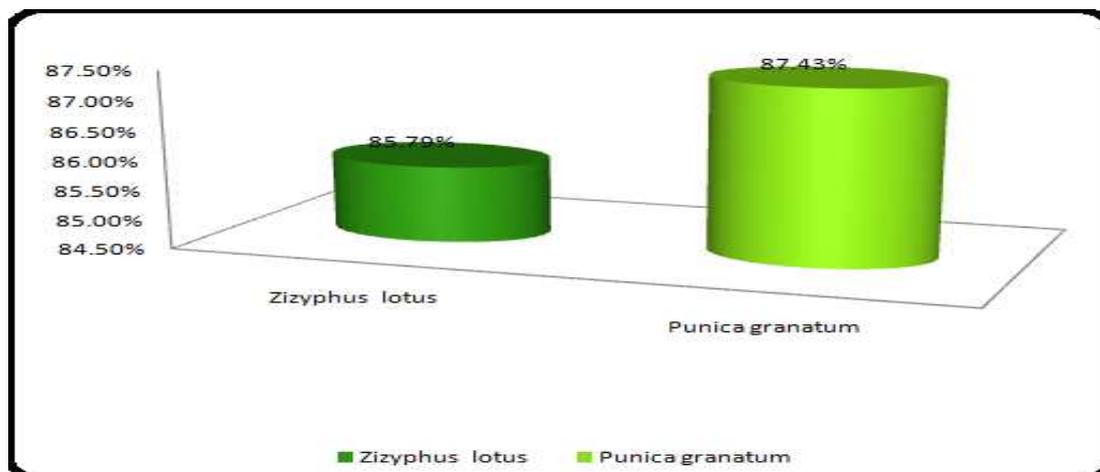


Figure 8. % d'activité antiradicalaire des deux extraits

Ce résultat est confirmé par la recherche de (Li *et al.*, 2005), qui a montré que le fruit du *Zizyphus lotus* a un effet antiradicalaire important 83,56% .

(Seeram *et al.*, 2006) a montré également que l'écorce du fruit de grenadine démontre des propriétés antioxydante très importante.

Comme la littérature suggère que l'activité antioxydante des extraits végétaux est due à la présence des molécules polyphénoliques (kang *et al.*, 2003) , on peut contribuer cette forte activité des deux extraits à leur richesse aux composés phénoliques dont l'extrait de l'écorce



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

du fruit de *Punica granatum* possède la plus forte teneur en polyphénols dosés.



Conclusion et perspectives

- L'étude de l'activité biologique des extraits du fruit du *Zizyphus lotus* et l'écorce du fruit de *Punica granatum* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.
- l'analyse qualitative des extraits par chromatographie sur couche mince a montré sous UV, la présence des polyphénols totaux.



- L'analyse quantitative des extraits par un dosage des polyphénols a montré une teneur considérable en polyphénols pour les deux extraits aqueux.
- Le test de l'activité antimicrobienne des extraits, par la méthode de diffusion en milieu gélosé, a montré que les deux extraits testés sont actifs. D'ailleurs toutes les souches microbiennes testées (bactéries et champignons) sont inhibées, avec des zones d'inhibition et CMI différentes.
- La méthode de DPPH a révélé que ces deux extraits sont actifs comme piègeurs du radical DPPH .
- En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et sources naturelles biologiquement actives, nous envisageons comme perspective d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs, et de valoriser leur présence par des techniques précises comme la CPG-SM et la RMN.

Références bibliographiques



- **Afaq F., Malik A ; 2005.**
 - Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer.
 - Proceeding of the national academy of sciences. Pages 1813-1818
- **Ali Shtayeh M-S., Yaghmour R-M-R., Faidi Y-R., Salem K., Al Nuri M-a ; 1998.**
 - Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area.
 - Journal of Ethno Pharmacology, 265-271
- **Amjad Hossain M ; 2005.**
 - Example of the development of pharmaceutical products from medicinal plants.
 - Bangladesch council of scientific reserch, 59-63.
- **Audigie C ., Figarella J ., Zonszaain F ; 1978.**
 - Manipulation d'analyse biochimique .
 - Doin (Ed), 274
- **Boizot N et Charpentier J-P ; 2006.**
 - Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.
 - Le cahier des Techniques de l'Inra, 79-82
- **Borgi W et Chouchane N ; 2006.**
 - Activité anti-inflammatoire des saponosides des écorces de racines de Zizyphus lotus
 - Revue des Régions Arides , 283-286.
- **Borgi W., Ghedira K., Chouchane N ; 2007.**
 - Antiinflammatory and analgesic activities of Zizyphus lotus
 - Fitotherapie, 16-19
- **Borgi W ., Recio M-C ., Rios J-L ., Chouchane N ; 2008.**
 - Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions -- from Zizyphus lotus (L.).
 - South African Journal of Botany, 320-324



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- **Borsato M-L-C., Souza G. E.P ; 2000.**
-Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*
-Lopes, N.P, 809 – 813
- **Braga L-C., Leite A-A-M ; 2005.**
- Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*.
- Canadian journal of microbiology, 541-547
- **Burt S ; 2004**
- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review.
-Int. J. Food Microbiol, 223-253
- **Catoire C., Zwang H., Bouet C ; 1999.**
-Les jujubiers ou le *Zizyphus* fruits oubliés .article du n1.
- **Choi Y-M., Noh D-O., Cho S-Y., Suh H-J., Kim K-M., Kim J-M. ; 2006 .**
-Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 756-761.
- **Cosentino ; 1999.**
- In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils
-Lett Appl Microbiol, 130-135
- **Cuvelier M-E., Richard H ; 1996.**
- Antioxydative activity and phenolic composition pilot-plant and commercial extracts of sage.
-Oil chem, 645.
- **Djemai Zoughlache Soumia ; 2008.**
-Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus*.
-Thèse de Doctorat. Université d'Annaba, 45.
- **Dorman H-J, Deans S-G ; 2000**
-Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J.*
-Appl. Microbiol, 308-316
- **Diallo A-M ; 2005**
-Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) *Phytochimie et pharmacologie de Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée).
-Thèse de Doctorat. Université de Bamako, 125.
- **Fouche J-G., Marquet A., Hambuchers A ; 2002.**
-Les plantes medicinales, de la plante au medicament.
-Sart-Tiliman, 208.
- **Fournier P ; 1948.**
- Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France.
- Editeur Paul Lechevalier, 286 à 291.
- **Ghedira K., Chemli R., Caron C., Nuzillard J-M., Zeches M; 1995**
-Four cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- Phytochemistry , 767 772
- **GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L ; 2006**
 - Ressources médicinales de la flore française.
 - Editions Vigot Frères, 838-842.
 - **(Giordani R.,Kaloustian J ; 2006.**
 - Action anticandidosique des huiles es sentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques.
 - *Phytotherapie*, 121-124
 - **Jafri M-A., Aslam M ; 2000.**
 - Effect of *Punica granatum*.
 - Journal of ethnopharmacology, 309-314.
 - **King A., Young G ; 1999**
 - Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals .
 - Journal of the American dietetic association, 213-218.
 - Kim N-D., Mehta R ; 2002
 - Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer.
 - Breast cancer research and treatment, 203-217
 - **Kriventsov V-I., Karakhanova S-V ; 1970.**
 - the rutin content of jujube fruits [In Russian].
 - Byulleten Gosudars to vennogo nikitskogo botanickog o Soda, 57-69.
 - **Lahlou M., El Mahi M ., Hamamouchi J ; 2002**
 - Evaluation des activités antifongiques et molluscide de *Zizyphus lotus*
 - Journal des annales pharmaceutiques française, 410-414
 - **Lansky-P., Newman R- A ; 2007**
 - *Punica granatum* and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer.
 - Journal of ethnopharmacology, 177-206.
 - **Li J-W., Ding S-D., Ding X-L ; 2005.**
 - Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube.
 - Process Biochemistry, 3607-3613
 - **Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S ; 2008.**
 - Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5434–5440
 - **Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J ; 2001.**
 - A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J.*
 - Appl. Microbiol, 453-462



- **Martin M-J., Motilva B., Lastra C. A ; 2007.**
 - Quercetin and Naringenin; Effects on Ulcer .
 - Phytotherapy Research, 150-153
 - **Nayarama K-R., Reddy M-S., Krishna D-R ; 2001.**
 - Bioflavonoïde classification, pharmacological, Biochimical effects and therapeutic potential.
 - Indien journal of pharmacology, 2-16.
 - **Nowakowska, Z ; 1962.**
 - A review of anti-infective and anti inflammatory chalcones.
 - European Journal of Medicinal Chemistry, 125 -137.
 - **Prasnanth D., Asha M-K ; 2001.**
 - Antibacterial activity of Punica granatum.
 - Fitoterapia, 171-173.
 - **Richard H., Multon J-L ; 1992.**
 - Les aromes alimentaires.
 - Tec et Doc Lavoisier, 438.
 - **Sanchez-Moreno C ; 2002.**
 - Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.
 - International Journal of Foods Science and Technology, 121-137
 - **Seeram N., Schulman R ; 2006.**
 - Pomegranates, Ancient roots to modern médecine.
 - Editions Taylor & Francis, 244.
 - **Spichiger R-E., Savolinen V ; 2004.**
 - Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales.
 - Editions Presses polytechniques et universitaires romandes, 413.
 - **Smallfied B ; 2001.**
 - Itroduction to growing herbs for essentiel oils.
 - Corpand food resecharch, 39.
 - **Stalikas C-D ; (2007).**
 - Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoid
 - Review. J. Sep. Sci, 3268 – 3295
 - **Svoboda K-P., Hampson J-B ; 1999.**
 - Bioactivity of essential oil of selected temperate pharmacological activities.
- ✓ **Site web :**

<http://www.jus-grenade.co>



Annexes

Annexe1. Composition des différents milieux de culture.

Milieu Chapman :

- Peptone :.....10,0 g
- Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g
- Chlorure de sodium :.....75,0 g
- Mannitol :.....10,0 g
- Rouge de phénol :.....0,025 g
- Agar-Agar :.....15,0 g

Milieu EMB :

- peptone10,0g
- lactose10,0 g
- éosine0,4 g
- bleu de méthylène0,0625 g
- hydrogénophosphate de potassium2,0 g
- agar15,0 g

milieu MRS:

- peptone10,0 g
- extrait de viande8,0 g
- extrait de levure..... 4,0 g
- Glucose..... 20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté..... 5,0 g
- Citrate d'ammonium2,0 g
- Tween80.....1,0 ml
- hydrogénophosphate de potassium2,0 g
- sulfate de magnésium heptahydraté0,2 g
- sulfate de manganèse tétrahydraté0,05 g



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- Agar..... 10,0 g

Milieu TSA:

- Peptone de caséine.....17,0 g
- Peptone de farine de soja.....3,0 g
- glucose.....2,5 g
- Chlorure de sodium5,0 g
- Phosphate dipotassique.....2,5 g

Sabouraud :

- Peptone..... 10 g
- Glucose 20 g
- Agar-agar..... 15 g
- extrait de levure..... 4,0 g

annexe2. Gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Concentration(g/ml)	0.00016	0.000312	0.000625	0.00125	0.0025	0.005	0.01	0.02
DO	0.042	0.108	0.193	0.424	0.894	1.776	3.099	4



Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des différents extraits préparés à partir du fruit du *Zizyphus lotus* et de l'écorce du fruit de grenadine. L'analyse qualitative de ces extraits par CCM a révélé la présence des polyphénols dans différents extraits, ce qui est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux dont les deux extraits sont riches en polyphénols (15 μ g équivalent d'acide gallique par mg d'extrait du fruit de *zizyphus lotus* et 18 μ g équivalent d'acide gallique par mg d'extrait de l'écorce du fruit de grenadine). L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a révélé une puissante activité des deux extraits, surtout l'extrait de l'écorce du fruit de grenadine. L'étude de l'activité antioxydante par le test du DPPH a révélé un pouvoir antioxydant proche des deux extraits. A partir de ces résultats, on peut dire que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits à pouvoir antioxydant puissant.

Mots clés : *Zizyphus lotus*, *Punica granatum*, activité antimicrobienne, activité antioxydante, composés phénoliques.