

## ÉVALUATION PHYTOCHIMIQUE, ET POTENTIEL ANTIOXYDANT, ANTIBACTÉRIEN DE TROIS CULTIVARS DE FRUIT DE GRENADIER "*PUNICA GRANATUM L*" DU NORD EST D'ALGÉRIE

KACI-MEZIANE Zoubida<sup>1</sup>, BOUTEKRAÏT Linda<sup>2</sup>, LAIDOUDI Djamila<sup>3</sup>, MOUSSAOUI Tarek<sup>4</sup>, MELAHI Nawel<sup>3</sup>, AIT OUARAB Dabha<sup>3</sup>, DJEGHBOUB Meryam<sup>4</sup>, MEGUETAOUI Asma<sup>4</sup>.

1. Université de Blida1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département Agroalimentaire. Laboratoire de Protection et Valorisation Ressources Agro-biologique, B.P. 270, route de Soumaa, Blida 09000, Algérie

2. Université de Blida1. Institut des Sciences et Techniques Appliquées, Blida, Algérie

3. Institut Technique des Arbres Fruitières et de la Vigne (ITAFV) Laboratoire Agroalimentaire, Tessala El Merdja, Alger, Algérie

4. Université de Blida1, Département Agroalimentaire, B.P. 270, route de Soumaa, Blida 09000, Algérie

Reçu le 18/11/2017, Révisé le 24/12/2017, Accepté le 31/12/2017

### Résumé

**Description du sujet :** L'investigation consiste à valoriser le fruit du grenadier "*Punica granatum L*" et mettre en évidence l'efficacité de son utilisation par l'évaluation de son profil phytochimique et antibactérien.

**Objectifs :** L'étude visait à évaluer la composition phytochimique, le pouvoir antioxydant et antibactérien des jus et des extraits bruts de pelures de trois variétés de grenades de la région Mitidja..

**Méthodes :** Le criblage chimique et la quantification par une méthode colorimétrique nous ont permis d'identifier plusieurs familles de métabolites secondaires. L'activité antioxydante par la méthode du piégeage de radical libre DPPH et un aromatochrome pour déterminer le pouvoir antibactérien ont été réalisés.

**Résultats :** Les résultats significatifs des composés phénoliques ont montré une teneur élevée en polyphénols totaux et en tanins pour les jus et les extraits de pelures. L'activité antioxydante présente un effet antiradicalaire intéressant en fonction des valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice) les plus actives avec 1,96 µg / ml et 20,91 µg / ml pour les extraits et les jus respectivement. Les jus et les extraits de pelures de grenades se sont révélés très actifs contre *S. aureus* (28,66 ± 0,18 mm) et *E. coli* (25,3 ± 0,57 mm) respectivement.

**Conclusion :** Les résultats obtenus ont révélé que les jus et les extraits de pelures de grenades étudiées sont de nouvelles sources prometteuses des antioxydants et des composés antibactériens pour les industries alimentaires et la santé humaine.

**Mots clés :** *Punica granatum L*, jus ; extraits de pelures ; activité antiradicalaire, activité antibactérienne.

## PHYTOCHEMICAL ASSESSMENT AND ANTIOXYDANT, ANTIBACTERIAL POTENTIAL IN THREE CULTIVARS OF POMEGRANATE FRUIT "*PUNICA GRANATUM L*" IN NORTH EST ALGERIA

### Abstract

**Description of the subject:** the investigation to valorise the fruit of "*Punica granatum L*" and highlight the efficiency of its use by the characterization of its phytochemical and antibacterial profile.

**Objective:** The study aimed to evaluate the phytochemical composition, antioxidant activity and antibacterial of juices and crude peel extracts of three cultivars of the Mitidja pomegranate region.

**Methods :** Chemical screening and quantification by a colorimetric method allowed us to identify several families of secondary metabolites. The antioxidant activity by the DPPH free radical scavenging method and an aromatochrome to determine the antibacterial potency were performed.

**Results :** Significant results of the phenolic compounds showed a high content of total polyphenols and tannins for juices and peel extracts. The antioxidant activity has an advantageous antiradical effect as a function of the most active IC50 (inhibitory concentration) values with respectively 1.96 µg / ml and 20.91 µg / ml for the extracts and the juices. Pomegranate juices and peels extracts were found to be very active against *S. aureus* (28.66 ± 0.18 mm) and *E. coli* (25.3 ± 0.57 mm) respectively.

**Conclusion:** The results obtained revealed that the juices and pomegranate peels extracts studied were promising new sources of antioxidants and antibacterial compounds for the food industries and human health.

**Keywords:** *Punica granatum L*, juice, peel extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity

\* Auteur correspondant : KACI-MEZIANE Zoubida, E-mail: zoubidameziane@yahoo.fr.

## INTRODUCTION

Ces dernières années, les scientifiques ne cessent d'affirmer qu'une consommation régulière de fruits et de légumes est un bon moyen de prévention de plusieurs maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson,..), des maladies respiratoires (asthme, mucoviscidose,...)[1,2], résultant d'un phénomène appelé « stress oxydant ».

Ce phénomène se réfère à une perturbation de signalisation dégénérative provoquée par l'oxydation des composants cellulaires vitaux et un déficit en antioxydants ou une surproduction de radicaux libres. Il entraîne des altérations de multiples molécules biologiques dont les acides gras, les protéines, l'ADN et les glucides [3].

L'aptitude des différents fruits et légumes à neutraliser ces radicaux libres et à restaurer l'équilibre oxydatif *in vivo* est imputé à leurs richesses en polyphénols, antioxydants naturels aux forts potentiels antioxydants et cytoprotecteurs [4].

L'Algérie, de part sa situation géographique particulière, a bénéficié d'un patrimoine fruitier traditionnel qui est issu d'une arboriculture extensive jouant un rôle économique important dans l'approvisionnement des populations en fruits [5].

Consommés en frais ou sous forme de produits transformés, ces fruits constituent une source inépuisable de nutriments dont les métabolites secondaires sont parmi les plus importants. Les polyphénols constituent l'un des principaux métabolites qui se localisent au niveau des différentes parties des fruits, dont le grenadier.

Le grenadier est une espèce fruitière qui a connu une extension dans différentes régions du monde. En Algérie, la production est évaluée à 847653 tonnes pour une superficie de 12114 ha répartie sur plusieurs wilayas. La région de la Mitidja est considérée comme une région potentielle produisant 16 380 tonnes pour une superficie de 87 ha [6].

L'importance économique du grenadier réside dans ses fruits qui ont une grande valeur nutritive comparable à celle des fruits juteux comme les abricots, les oranges, les pommes et d'autres [7].

Le fruit du grenadier, connu par la grenade, connaît un énorme succès auprès des consommateurs algériens cette dernière décennie, avec une évolution du marché en pleine croissance.

Cependant, ce fruit reste sous exploité et il est consommé généralement en tant que fruit frais. Quant à la valorisation par la transformation, elle est quasi absente et nécessite une grande attention de la part des opérateurs économiques afin de développer ce secteur très promoteur.

La grenade constitue de forts potentiels pour les industries alimentaires comme source de jus ou sous forme d'additifs alimentaires à partir de ses sous-produits. Par ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antibactériennes intéressantes, la grenade est aujourd'hui proposée aussi comme adjuvant dans la prise en charge de certaines pathologies comme les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers, en particulier celui de la prostate [8]. Sa richesse en polyphénols lui attribue un vrai statut nutritionnel et médicinal. Sa valorisation s'avère un meilleur choix attrayant pour combler les besoins en ces composés actifs.

Dans ce contexte et afin de mettre en valeur le fruit du grenadier, nous opté pour la valorisation de son fruit par l'étude de sa composition phytochimique et de son pouvoir antioxydant et antibactérien.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Zone de prélèvement des échantillons

Notre station d'étude est située au niveau de la plaine de Mitidja à 14 kilomètre au sud du chef-lieu de la wilaya de (Blida) (Fig. 1). Son altitude moyenne varie de 50 à 100 mètres [9]. Avec une longitude de 3° 03' mn Est et une latitude de : 36° et 34° mn Nord. La pluviométrie moyenne annuelle est de 667 mm. Les températures moyennes présentent un maximum en juillet (37°C) et un minimum en janvier (11,5°C). Le sol est argileux - limoneux.

Le matériel végétal est constitué de fruits de trois variétés de grenades algériennes installées en collection dans un verger de la station expérimentale de l'Institut Technique des Arbres fruitiers de la Vigne (ITAFV) située dans la région de Boufarik (Fig. 1).

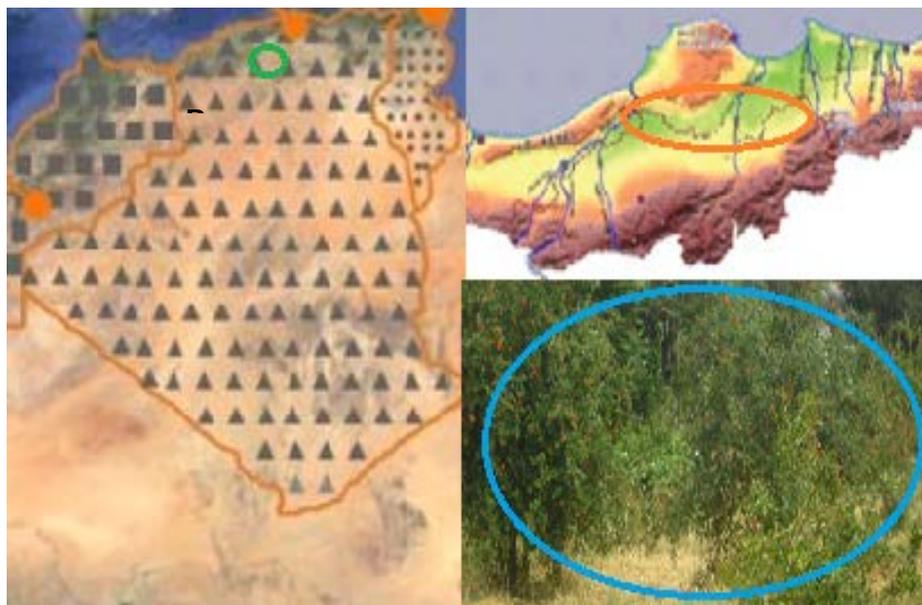


Figure 1 : Lieu de récoltes des échantillons de fruits de grenades

Cercle vert : Région de Blida , cercle rouge : Zone de Mitidja, cercle bleu : verger de récolte des grenadiers(Boufarik)

Ces trois variétés subissent les mêmes conditions géographiques et les mêmes pratiques de conduite. L'identification de chacune de ces variétés récoltés "Doux de Koléa", "Doux de Messaad" et "Bordj Mira" a été faite en collaboration avec le personnel technique de la station Expérimentale (Fig. 2).

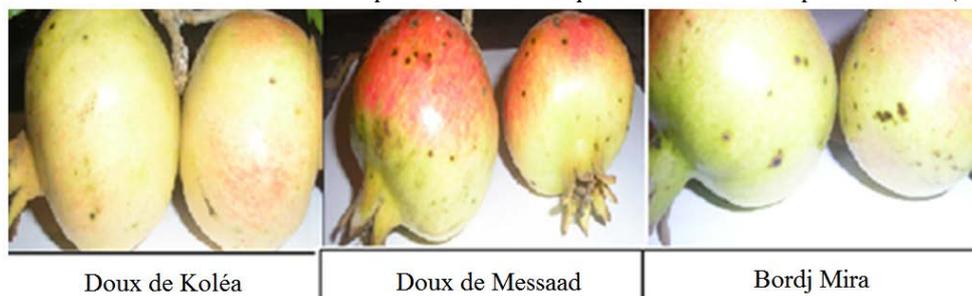


Figure 2 : Collection des trois variétés de grenades

### 1.2. Récolte des échantillons

Pour chaque variété de grenade, quinze fruits sont recueillis d'une façon aléatoire à maturité au début du mois d'octobre en 2016 ; cinq fruits ont été récoltés au hasard de chacune des quatre orientations géographiques des arbres, tout en évitant les fruits les plus exposés au soleil et aussi ceux qui existent carrément en bas de l'arbre. Après la récolte, les fruits sont immédiatement envoyés au laboratoire(ITAFV) pour analyses.

### 1.3. Préparation des jus et des poudres de pelures

Une fois les fruits sont lavés et pelés, les graines sont séparées manuellement de l'écorce. Ensuite le jus est extrait à partir des graines à l'aide d'une presse mécanique,

centrifugé afin d'éliminer la pulpe et enfin stocké à 4°C pour déterminer la teneur totale en composés phénoliques, l'activité de piégeage des radicaux DPPH et l'activité antibactérienne.

Les pelures récupérées après extraction du jus sont isolées, séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 7 jours, pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique puis passées à travers un tamis de 1 mm jusqu'à l'obtention d'une poudre fine nécessaire à la préparation des extraits.

## 2.Méthodes

### 2.1. Rendement en jus

Les arilles d'une grenade de chaque variété étudiée ont été séparées manuellement et le poids total des arilles a été pesé.

L'extraction du jus des arilles a été effectuée en utilisant un presse-agrumes mécanique [10]. Le rendement en jus (RJ) est ensuite calculé par la relation suivante :

$$\text{Rendit jus (\%)} = \frac{\text{Poids jus pressé d'une grenade}}{\text{Poids arilles d'une grenade}}$$

Avec :

Poids jus pressé= Poids en (g) de jus extrait à partir de l'ensemble des arilles d'une grenade ;

Poids arilles = Poids des arilles d'une grenade soumise à l'extraction.

## 2.2. Extraction éthanolique

Les extraits éthanoliques ont été réalisés par épuisement de la poudre de pelures de grenades séchées. La méthode utilisée est la macération à froid. Après agitation pendant 24h, les extraits filtrés sont concentré à l'évaporateur rotatif [11]. Les résidus secs récupérés, pesés pour déterminer leurs rendements et conservés au frais pour réaliser les différents dosages. Le rendement d'extraction, exprimés en pourcentage, est calculé par la formule décrite par [12]:

$$R(\%) = \text{Mext} / \text{Mech} \times 100$$

Avec :

R : Rendement exprimé en pourcentage (%).

Mext: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

Mech : Masse en gramme de l'échantillon végétal.

## 3. Dosage quantitatif

### 3.1. Polyphénols totaux

Un dosage quantitatif a permis d'évaluer la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en tanins hydrolysables et en anthocyanines. Les polyphénols totaux sont déterminés par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu [13]. Les résultats sont exprimés en mg Equivalent Acide gallique/L de jus ou par g de matière sèche. Le dosage des flavonoïdes est fait par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) modifiée et décrite par Lamaison et Carnet [14]. Les résultats sont exprimés en mg Equivalent de Quercétine/L de jus ou g de matière sèche.

Les tannins hydrolysables sont déterminés selon la méthode décrite par Willis et Allen [15] modifié par Çam *et al* [16]. Les résultats sont exprimés en mg Equivalent d'Acide tannique /L de jus ou g de matière sèche. La composition en anthocyanine totaux est estimée par la méthode du pH différentielle en utilisant deux tampons : tampon chlorure de potassium à pH 1,0 (25 mM) et le tampon acétate de sodium à pH 4,5 (0.4 M) [17]. La teneur en anthocyanines est exprimée en mg d'équivalent cyanidine 3-glucoside(EGC) par litre de jus ou de g de matière sèche.

### 3.2. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire de chaque échantillon est évaluée par le test du piégeage du radical DPPH citée par Sahin *et al* [18] avec modifications. Un volume de 25 µl de chaque solution de jus ou d'extrait (à différentes concentration : 2 à 100µg/mL) et 975 µl de la solution de DPPH (24 mg/100 ml d'éthanol) sont mélangés. Après incubation pendant 30 min, l'absorbance est mesuré à 517 nm contre un tube blanc. L'acide ascorbique et l'Hydroxytoluène butylé (BHT) ont été utilisés comme étalon. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I %) et sont calculés par la formule suivante :

Avec :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

I (%): Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

Pour chaque échantillon, la valeur de la concentration d'inhibition(IC<sub>50</sub>) nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH a été déterminée [19].

### 3.3. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de chaque échantillon de jus et d'extraits de pelures a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé [20]. Un milieu de Mueller Hinton a été utilisé pour les bactéries de référence ATCC (American Type Culture Collection): *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13311).

Elles sont collectées au niveau de l'institut Pasteur puis conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée. Ces souches sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc.).

Tableau 1 : Liste des souches bactériennes utilisées

Souches	Famille	Gram	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	Entérobactéries	Gram -	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Gram -	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Gram +	25923
<i>Salmonella typhimurium</i>	Entérobactéries	Gram -	13311

La gélose Mueller Hinton a été ensemencée avec 100 µl d'inoculum à 10<sup>7</sup>UFC/ml et a été laissée 15 mn à 37°C. L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose.

## RÉSULTATS

### 1. Rendements en jus et en extraits secs

Les rendements en jus et en extraits ethanoliqes sont présentés par la figure 3 :

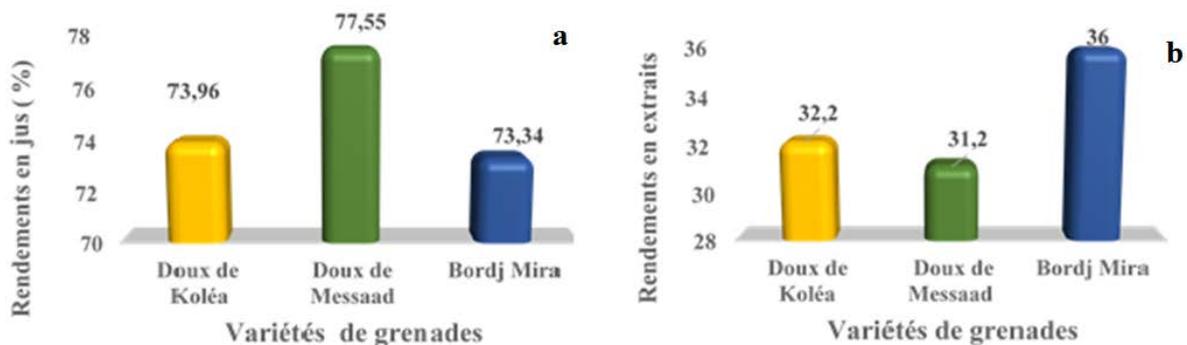


Figure 3 : Rendement de trois variétés de grenades  
(a)Rendement en jus, (b) Rendement en extraits bruts de pelures

Les résultats des rendement d'extraction de jus sont estimés à 77,55±0,23% pour la variété de Doux de Messaad révélant la richesse de cette variété en jus par rapport aux résultats obtenus des deux autres variétés Doux de koléa et Bordj Mira (73,96±0,33% et 73,34±0,03) respectivement (Fig. 3a). Simultanément, extraits bruts des pelures de grenades ont donné un rendement d'extraction de 36,00±0,23% pour la variété de Bordj Mira suivi de ceux de Doux de Koléa

Des disques stériles de papier wattman de 6 mm de diamètre sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur gélose et imprégnés de 45µl de chaque échantillon de jus et d'extraits de pelures de chaque variété de grenade à une concentration de 200 mg/mL[21]. Disposer sur la même boîte des disques imprégnés de l'antibiotique "gentamycine" à une concentration de 10µg/disque et 5 µl de méthanol servant respectivement de témoin positif et de témoin négatif. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans une étuve à une température de 37°C pendant 18 à 24h .

### 4. Traitement des données

Tous les essais ont été répétés trois fois. Pour la comparaison des résultats, nous avons utilisé l'analyse de variance (ANOVA) grâce au logiciel statistica version 9.1 Les différences des moyennes ont été déterminées pour le degré de signification ( $p < 0,05$ ) en utilisant le test de Fisher.

(32,2 ±0,02%) et de Doux de Messaad avec 31,2±0,16 % (Fig. 3b).

### 2. Dosage phytochimique

#### 2.1. Dosage qualitatif

Les résultats du criblage phytochimique des deux types d'échantillons de variétés de fruit de *Punica granatum* L sont reportés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Résultats du criblage phytochimique de trois variétés de jus et d'extraits de pelures de grenade

Extraits et variétés de grenades		Flavonoïdes	Tanins	Anthocyanines	Saponines	Alcaloïdes
Jus	DK	++	++	+++	-	+
	DM	++	++	+++	-	+
	BM	++	++	+++	-	+
Extrait éthanolique	DK	++	+++	+	+	+
	DM	++	+++	+	+	+
	BM	++	+++	+	+	+

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des extraits pelure et de jus de variétés de grenades: Les tanins, les flavonoïdes, les anthocyanines et les alcaloïdes. Cependant, les tests se sont révélés négatifs pour les saponines dans les jus de fruits.

Le fruit de grenade est très riche en tanins et moins en flavonoïdes. En effet, les anthocyanines sont variables selon la partie du fruit, avec une forte richesse dans le jus et une faible présence dans les extraits de pelures.

## 2.2. Teneurs en composés phénoliques

Les résultats en polyphénols totaux, flavonoïdes, en tanins hydrolysables et anthocyanines des jus et des extraits de pelures des trois variétés sont présentés dans la figure 4.

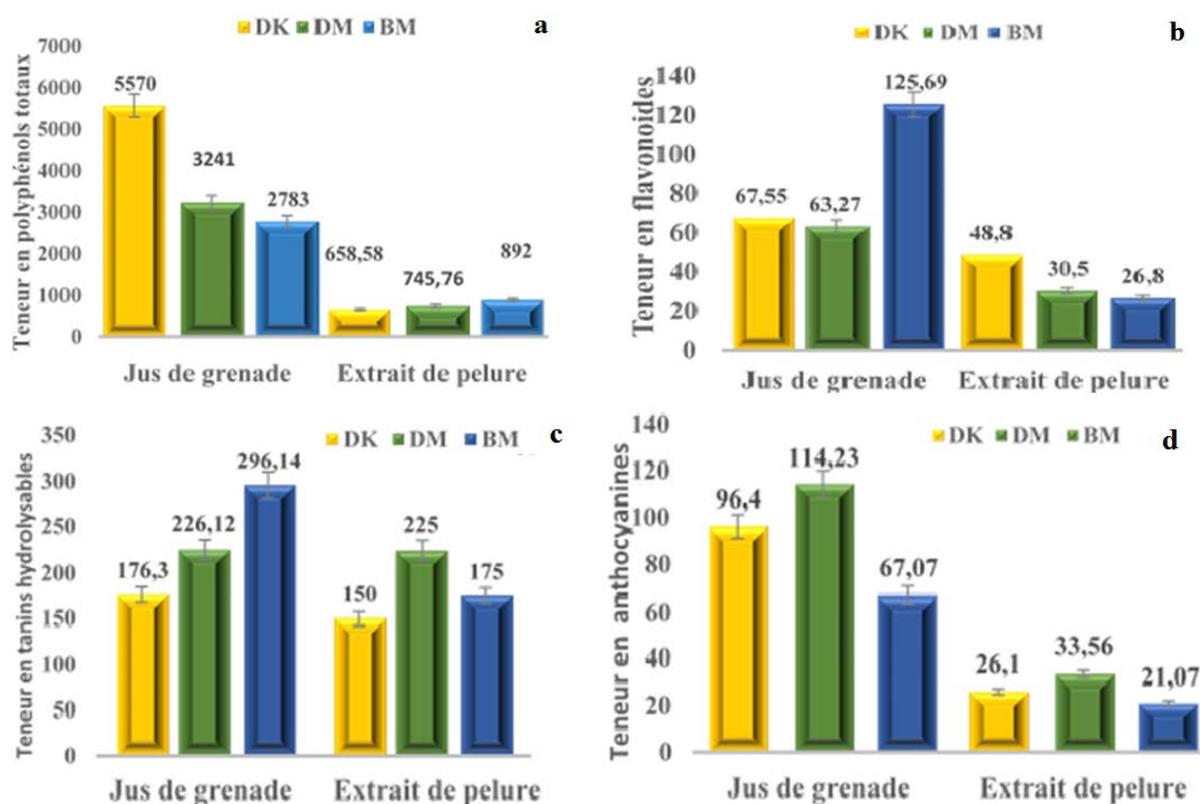


Figure 4 : Teneurs en composés phénoliques des jus et des extraits (a) polyphénols totaux, (b) flavonoïdes, (c) tanins hydrolysables, (d) anthocyanines

Une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs en différents composés phénoliques des trois variétés de jus d'une part et des extraits des pelures des trois variétés de grenades, d'autre part a été observée. Cette composition en polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins et anthocyanines est exprimée en mg équivalent par litre de jus et en mg équivalent par matière sèche pour les extraits de pelures de grenades.

Les teneurs moyennes en polyphénols totaux sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par L de jus et en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche pour les extraits éthanoliques. Ils varient significativement ( $p < 0,05$ ) de 2783 à 5570 mg EAG /L de jus et de 658,58 à 892, 56 mg EAG /g de MS pour les extraits (Fig. 4a)

La valeur la plus importante est celle de l'échantillon de Doux de Koléa ( $5570 \pm 0,32$  mg EAG /L de jus frais) pour la fraction de jus de fruit, et de Bordj Mira ( $892, 56 \pm 0,04$  mg EAG /g de MS) pour les fractions d'extraits de pelures. La classification des trois variétés selon leurs teneurs en polyphénols totaux est la suivante : DK > DM > BM pour le jus, et de BM > DM > DK pour l'extrait brut de pelures de grenades.

Concernant les flavonoïdes, les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par litre de jus et en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche pour les extraits éthanoliques et montrent une variation significative à ( $p < 0,05$ ) de 63,27 à 125 mg EQR/L de jus et de 26,8 à 69,5 mg EQR/g de MS pour les extraits éthanoliques. La variété de Bordj Mira possède la teneur la plus élevée avec  $125,69 \pm 1,29$  mg EQR /L pour les jus par rapport aux deux autres variétés.

Pour les extraits de pelures de grenades, la variété Doux de Koléa présente la teneur la plus élevée par rapport aux deux autres variétés, Doux de Messaad ( $30,5 \pm 0,15$  mg EQR /g de MS) et Bordj Mira ( $26,8 \pm 0,97$  mg EQR /g de MS). Nous constatons aussi que les jus renferment des concentrations plus élevées en flavonoïdes par rapport aux extraits de pelures (Fig. 4b).

Les résultats du contenu en tanins hydrolysables sont exprimés en mg équivalent de l'acide tannique par litre de jus et en mg équivalent de l'acide tannique par g de matière sèche pour les extraits de pelures.

Les concentrations en tanins varient significativement à ( $p < 0,05$ ) de 176,30 à 296,14 mg EAT /L de jus et de 150,0 à 225 mg EAT /g de MS pour les jus et les extraits de pelures respectivement. La variété Bordj Mira présente la teneur la plus élevée pour le jus et l'extrait de pelures de grenade de  $26,14 \pm 0,04$  mg EAT /L de jus et de  $197,01 \pm 0,06$  mg EAT /g de MS respectivement. C'est la présence de cette quantité de tannins qui donne un goût astringent au jus frais de la grenade. L'extrait de pelures de grenades présente une teneur élevée pour la variété de Doux de Messaad qui s'évalue à  $225 \pm 0,12$  mg EAT /g de MS (Fig. 4c).

Le contenu total en anthocyanines pour les mêmes échantillons est exprimé en mg équivalent cyanidine-3-glucoside par litre de jus et en mg équivalent cyanidine-3-glucoside par g de matières sèches de pelures de grenades. Une différence significative entre les moyennes de teneurs en jus et d'extraits est enregistrée chez les fruits des trois variétés de grenades étudiées ( $p \leq 0,05$ ). Les teneurs moyennes dans les jus se sont montrées plus élevées que ceux obtenus par les extraits de pelures de grenades. Elle varie de 74,92 à 114,23 mg ECG /L de jus pour les jus de fruits de grenades. Cependant, cette composition varie de 21,07 à 33,56 mg ECG /g de MS pour les extraits de pelures. La teneur la plus élevée est enregistrée par la variété de Doux de Messaad pour les deux types d'échantillons étudiés (Fig. 4d)

### 2.3. Activité anti-radicalaire

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des jus et des extraits de pelures de grenades des trois variétés de grenades étudiées sont exprimés en termes de pourcentages d'inhibition du radical DPPH et sont présentés par la figure 5.

Un pourcentage d'inhibition du radical DPPH est observé avec les différentes concentrations des différents échantillons de fruits de grenades. Ce pourcentage varie proportionnellement avec les concentrations des jus et des extraits pour les trois variétés de grenades. A une concentration de 100 µg/ml, les extraits de pelures ont exprimé un pourcentage de 92,34% pour la variété Doux de Messaad, alors que les jus ont présenté une capacité de réduction plus faible de 82,99 % et qui se présente par la variété de Bordj Mira.

Pour les deux types d'échantillons, jus et extraits bruts de grenades, le pourcentage d'inhibition est considérable

(66,99 et 92,41%), même à concentration moyenne (50µg /mL) respectivement.

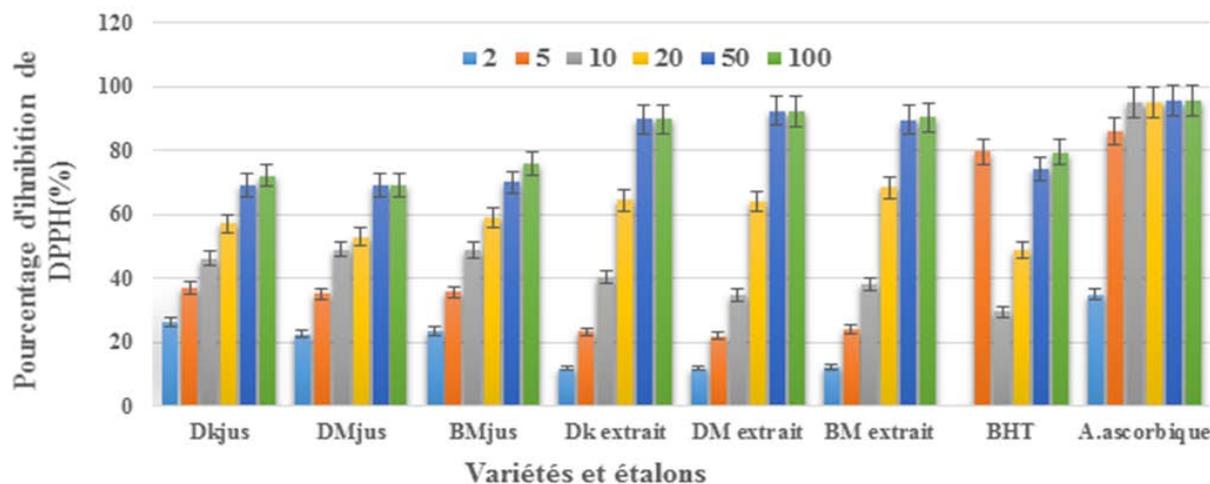


Figure 5: Taux d'inhibition du radical DPPH

DKJ : jus de Doux de Koléa, DMJ : jus de Doux de Mressad, BMJ : Jus de Bordj Mira

DKE :Extrait de Doux de Koléa, DMJ :extrait de Doux de Mressad, BMJ : xtrait de Bordj Mira

L'activité de piégeage des radicaux libres déterminée par DPPH a été exprimée en tant que valeur  $IC_{50}$  (la concentration efficace de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH initial). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Concentration inhibitrice  $IC_{50}$  du radical DPPH des jus, des extraits et des Standarts

Echantillons	$IC_{50}$ (µg/mL)
DK Jus	28,87
DM Jus	27,67
BM Jus	20,91
DK Extrait	1,96
DM Extrait	2,44
BM Extrait	2,36
Acide ascorbique	2,3
BHT	28

L'analyse des données obtenues a indiqué que l'extrait éthanolique de la variété de Doux de Koléa a la valeur d' $IC_{50}$  la plus faible par rapport aux autres extraits et ceux des jus de fruits. L'acide ascorbique a montré une valeur d' $IC_{50}$  de 2,30 µg / ml, proche de celles des extraits de Doux de Messaad et Bordj Mira. La valeurs d' $IC_{50}$  du BHT (28µg/mL est proche de celles obtenus pour les jus de grenades. Sachant qu'une faible concentration  $IC_{50}$ , entraîne une forte activité antioxydante (Tableau 3).

#### 2.4. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des jus et des extraits des trois variétés de *Punica granatum* L sont présentés par le tableau 4.

Tableau 4 : Zones d'inhibition des jus et des extraits de pelures de grenades (mm)

Variété	Type d'extrait	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhimurium</i>
DK	Jus	17,9±0,45	18,66±0,18	17±0,4	17,1±0,5
	Extrait de Pelures	17± 1,00	16 ± 0,00	R	19,3± 0,57
DM	Jus	17,22±0,68	16,32±0,28	16,50±0,5	18,66±0,38
	Extrait de Pelures	15,6± 1,15	16,6±0,28	R	14,03±0,47
BM	Jus	19,6±1,04	18±00	18±00	17,72 ±0,55
	Extrait de Pelures	25,3±0,57	18,6±0,57	R	12,6±1,15
Antibiotique	Gentaxyn	32,33±2,08	26,66±1,52	34,66±3,51	28±1,00

Les résultats du tableau 4 montrent que le jus de grenade agit sur toutes les souches de bactéries, son pouvoir inhibiteur agit différemment d'une souche à une autre mais sont très proche. L'action des jus sont modérément inhibitrice avec *E.coli* (19,6±1,04mm) et *S.typhémurium* (18,66±0,38 mm) pour toutes les variétés étudiées et légèrement inhibitrice avec la variété de Messaad contre *S. aureus* (16,32±0,28mm et *P.aeruginosa* (16,50±0,5mm).

Les extraits éthanoliques de pelures de grenades agissent variablement sur toutes les souches alors qu'elles sont absentes sur *P.aeruginosa*. Une meilleure activité inhibitrice est obtenue avec la variété Doux de Koléa contre *E.coli* (25,3±0,57 mm), modérément inhibitrice contre *S.aureus* (18,6±0,57mm) pour Doux de Messaad, *S.typhémurium* (19,3±0,57mm) pour Doux de Koléa et faiblement inhibitrice contre *S.typhémurium* pour Doux de Messaad et Bordj Mira. Pour les résultats de l'antibiotique Gentaxyn, des zones d'inhibitions sont très élevées par rapport à ceux des jus et des extraits. Cet antibiotique est fortement inhibiteur des quatre souches bactériennes avec une meilleure inhibition pour la souche de *P.aeruginosa* qui en est résistante avec nos échantillons. Seuls les zones d'inhibition entourant les disques de papier wattman (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres d'inhibition des bactéries.

## DISCUSSION

Nos résultats du rendement obtenus en jus sont comparables à ceux trouvés par Tehranifar *et al* [22] qui estiment une valeur de (26,95-46,55%). Dans ce même contexte, Cemeroglu *et al.* [23] ont montré que ce rendement est estimé à 30-70% pour la production industrielle. Nos variétés peuvent être intéressantes pour la production du jus. Les travaux de Borochoy-Neori *et al.* [24] ont rapporté que ce rendement augmente avec la maturation du fruit et ceux de Martínez *et al.*[25] ont confirmé que les variétés de grenades sucrées présentent un meilleur rendement en jus.

Pour les extraits de pelures de grenades, le rendement d'extraction varie d'une variété à une autre. Le degré de polarité des composés antioxydants peut être à l'origine de la variabilité du rendement de l'extraction dans ces parties de fruit [26].

Concernant le screening chimique, nos résultats sont en concordance avec ceux de Reguieg Yssaad et Hammadi [27] qui ont révélé la présence de tanins, de polyphénols, de flavonoïdes et de saponosines dans les extraits éthanoliques de pelures de grenades. Ces composés phénoliques se présentent comme un groupe majeur qui agit comme des antioxydants primaires ou des piègeurs de radicaux libres [28]. Les extraits éthanoliques de pelures de *P. granatum* présentaient des flavonoïdes et des tanins [29].

En effet, la présence de saponines, d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de tanins dans les différents extraits de pelures d'une part et d'alcaloïdes, flavonoïdes, tanins et anthocyanines dans les jus de grenades d'autre part sont responsables des propriétés thérapeutique et pourrait être responsable de leurs puissantes capacités antioxydantes. La présence de saponines dans tous les extraits pourrait jouer un rôle protecteur des maladies cardiovasculaires. Les niveaux de présence des différentes familles de métabolites secondaires dans la grenade diffèrent selon le type de solvant utilisé pour extraire ces composés [31]. Pour les polyphénols totaux, nos résultats étaient plus élevés que ceux élaborés par Gil *et al.* [32]. (2117 ±95 mg/ L). Ceux des jus, ils sont en concordance avec ceux des variétés Marocaines dont la teneur varie entre 1284,42 à 9476,32mg/ L mg/ L obtenus par [7], avec ceux de Tehranifar *et al.* [22] qui sont de 295 et 985 mg /L de jus pour des variétés Irlandaises et avec ceux de Zaouay *et al.* [33] variant entre 108 et 944 mg /L de jus pour des variétés Tunisiennes.

En ce qui concerne les extraits de pelures, nos résultats sont plus élevés que ceux estimés par Saad *et al.*[34] et qui sont de 181,6±5,9 mg eq AG/g de MS et de ceux de Tehranifar *et al.* [22] dont la valeur est de (423,5±1,3 mg eq AG/g deMS). Les Polyphénols totaux sont des anthocyanines (telles que cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside et delphindin-3-glucoside), catechines, tanins ellagiques, et acide ellagique [7].

Ces trois variétés étaient cultivées au même endroit, utilisant des pratiques agronomiques similaires, leurs différences en teneurs de polyphénols totaux dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (la maturité à la récolte et les conditions de stockage) [7].

La variabilité génétique conduit à la variation de la biosynthèse phénolique du métabolite secondaire dans ces variétés. Le taux de polyphénols présent dans nos fractions est très important, ceci serait peut être utile pour envisager l'étude des activités biologiques.

En ce qui concerne les flavonoïdes, les résultats obtenus concordent avec ceux de Viuda-Martos *et al.* [35] avec une teneur de 71,9 mg EQ /g de MS.

Pour les tanins, nos résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Hmid [7] pour des jus de variétés de grenades Marocaines (230,1 et 484,2 mg/L).

La comparaison de ces teneurs trouvées dans notre étude montre que la grenade constitue une source importante de polyphénols totaux et de tanins.

Cependant, les résultats en anthocyanines varient de 21,07 à 33,56 mg EGC /g MS pour les extraits bruts et de 67,07 à 114,23 mg EGC / L de jus, ces teneurs étaient de trois à dix fois supérieures à celles rapporté par Özgen *et al.* [36] avec une valeur de 6 à 41 mg ECG / L pour des variétés turques. D'autre part, Singh *et al.* [37] ont révélé des teneurs en anthocyanines d'environ 676 à 1236 mg ECG / L pour dix jus de grenade chiliens. En fait, la variabilité de la teneur en anthocyanines pourrait s'expliquer par les conditions climatiques. En outre, les anthocyanes sont le plus grand groupe de flavonoïdes connus pour intervenir dans la coloration des jus de grenade [31].

La capacité de piégeage du radical DPPH a montré des pourcentages d'inhibitions supérieurs à ceux signalés par d'autres auteurs, de 31,16 et 66,82 % pour des jus de grenades marocains [7] et entre 15,59 et 40,72 % pour des jus iraniens [22]. Plus le pourcentage d'inhibition est élevé, plus l'activité antioxydante est meilleure. La différence entre l'activité antioxydante des extraits de pelures et des jus peut être attribuée à leurs différences en compositions phénoliques, comme l'a indiqué Özgen *et al.* [35]. De leurs parts, Naveena *et al.* [38] ont aussi observé une activité de piégeage des radicaux significativement supérieurs dans la pelure par rapport à celle des jus de grenade. Ce dernier est une source riche en polyphénols. Cependant, sa composition peut changer en fonction du type de la variété, la maturité et conditions de conservation [39].

Les résultats des valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus pour des extraits de pelures de grenades sont inférieurs à ceux déterminés par Bendjabeur [40] qui sont de 5,49 µg/mL et à ceux de Ben ammar [41] avec une concentration de 7 à 19 µg/mL pour des variétés Algériennes et Tunisiennes respectivement.

La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires. Cette activité antioxydante des extraits de grenade pourrait aussi être attribuée à la présence des polyphénols, comme les tanins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique [31].

Les différentes parties du fruit du grenadier sont efficaces pour piéger les radicaux libres en raison de la présence d'anthocyanines, d'anthocyanidines, de flavonoïdes et de polyphénols et présentent une activité antioxydante élevée en raison de la présence de tanins. Les extraits de pelures de grenades agissent aussi comme un sous-produit écologique en raison de leurs nombreuses utilisations comme agent réducteur dans la fabrication de nanoparticules d'argent [42].

Ces extraits peuvent avoir un grand intérêt dans la prévention de maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués, et servir de source économique d'antioxydants naturels. Ayant la capacité à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes, ils peuvent aussi être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés à ces radicaux. Ils peuvent également être utiles dans la conservation des produits alimentaires, où la chaîne des réactions de radicaux libres a comme conséquence l'oxydation des lipides et la détérioration ultérieures des produits alimentaires [43].

Pour l'activité antibactérienne, la souche de *P.aeruginosa* présente une résistance envers les deux types de sous-produits étudiés, et est expliquée par le fait que cette dernière a développé des mécanismes de résistance aux agents antibactériens présentes dans les extraits, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières [44].

La différence de sensibilité entre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram-négatives pourraient être attribuées à la différence morphologique entre ces microorganismes. Ces dernières ont une membrane phospholipidique externe riche en composants lipopolysaccharidiques structuraux. Les bactéries Gram positif sont plus sensibles car elles n'ont qu'une couche de peptidoglycane qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace [45].

Nos résultats concordent avec ceux de Reddy *et al.* [46] qui ont montré que les extraits de grenades ont une activité antibactérienne significative avec *E. coli* et *S. aureus*, avec ceux d'Al Zokery [47] qui a démontré que ces extraits constituent un puissant inhibiteur de croissance de *S. aureus* et *E. coli* et les travaux de Kadi *et al.* [48] qui ont dévoilé une forte activité contre *S. aureus*, *E. coli* et *S. typhi* pour ces extraits.

Selon Blansky et Newman [49], l'effet inhibiteur présenté par le jus et les extraits bruts de *Punica granatum* peut être attribuée aux tanins qui représentent 28% de l'écorce constituants.

A la suite des résultats phytochimiques qualitatifs et quantitatifs du jus et des extraits en composés phénoliques de *Punica granatum L.*, la présence des tanins se liant aux protéines riches en proline peut interférer avec la synthèse des protéines des parois bactériennes et qui peut être un mécanisme expliquant l'effet antibactérien de ces extraits.

## CONCLUSION

La grenade est une plante qui connaît un regain d'intérêt en phytothérapie et en sciences médicales. Le travail réalisé est une investigation à la valorisation du fruit de grenade par le biais de son jus et ses pelures. Ces derniers sont des sous-produits de l'industrie de transformation du jus de grenade. Ces sous-produits renferment des composés chimiques susceptibles de lui créer des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Les flavonoïdes, les tanins et les saponines en sont responsables. Les graines et les pelures de trois variétés de grenades ont montré un rendement d'extraction élevé en jus et en extrait éthanolique respectivement.

Ces deux sous-produits, jus et extraits ont révélé une richesse en composés phénoliques, en polyphénols totaux et en tanins avec des teneurs allant de 2783 à 5570 mg EAG/L de jus, de 658,58 à 892,56 mg EAG/mg MS d'extraits de pelures de grenades pour les polyphénols totaux, et de 63,27 à 125,69 mg EAT/L de jus, de 26,8 à 48,8 mg EAT /mg MS d'extraits de pelures de grenades pour les tanins. Les jus des trois variétés de grenades ont montré une action modérément inhibitrice contre les quatre souches bactériennes qui se traduit par une forte et une faible inhibition contre *E. coli* et *S. typhimurium* pour les extraits de pelures. Respectivement. Le fruit du grenadier avec ses sous-produits constitue un réservoir de composés phénoliques qui peut dévoiler beaucoup de propriétés thérapeutiques qui doivent être exploités par des recherches en pharmacologie. Il est important de noter que pendant la transformation de la grenade en jus, les pelures sont jetées. L'industrie alimentaire peut ainsi utiliser ces sous-produits comme source d'antioxydants naturels dans les produits alimentaires. La qualité des résultats obtenus nous mènent à penser à réaliser la valorisation du fruit de *Punica granatum L.* et exploiter ses polyphénols dans plusieurs domaines.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Roussel A.M. et Ferry M. (2002). Stress oxydant et vieillissement. *Nutr. Clin. Metab.*, 16 : 285-292.
- [2]. Berger M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Metab.*, 20: 48-53.
- [3]. Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K & Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Metab.*, 16: 233-239.
- [4]. Bouayed J H., Rammal C.H., Younos A., Dicko & Soulimani R. (2008). Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie*, 6(2) :71-74.
- [5]. Bouattoura N. (1988). Les ressources phytogénétiques. Importance-Préservation-Utilisation. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, 12 (1) : 43-69.

- [6]. **Anonyme, 2016.** Ministère de l'Agriculture et le développement Rural. Bulletin de statistiques Series B. phytogénétiques. Importance-Préservation-Utilisation. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, 12 (1): 43-69.
- [7]. **Hmid I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum* L.): Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse Doc. Sci. Agro., France, pp177.
- [8]. **Bidri M. et Choay P. (2017).** Regain d'intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. *Phytothérapie*. 15(2) : 91-10.
- [9]. **Meklati A. (2009).** La mise en place d'un plan d'intervention en cas de sécheresse pour la wilaya d'Alger . Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara Boumerdes.
- [10]. **Mashavhathakha K. L., Soundy P., Ngezimana W. & Mudau F.N. (2014).** Evaluation of physico-chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivar 'Wonderful' on three locations of South Africa. *Tropical Agriculture*, 91(3) :157-164.
- [11]. **Royer M., Ph.D., Houde R & M.Sci. (2010).** Potentiel de développement lié aux extractibles forestiers : État des connaissances et rev des marchés. Tatjana Stevanovic, ing., Ph.D. Université Laval, Canada.
- [12]. **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi., Boulaaba. M & Abdelly.C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- [13]. **Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie Phytochimie, plantes Médicinales*, (4<sup>e</sup>éd), revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, p 1288.
- [14]. **Singleton VL & Rossi JA. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
- [15]. **Lamaison J.L.C. & Carnet A. (1990).** Teneurs en Principaux Flavonoides des fleurs de *Crataegus Monogyna* (Jacq) et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, 65:315-320.
- [16]. **Willis R.B. & Allen P.R. (1998).** Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *Annals Biochem.* 123: 435- 441.
- [17]. **Çam M., Hışıl Y. & Durmaz G.(2009).** Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.* 112(3):721-726.
- [18]. **Lako J.,Trenerry V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon N., Sotheeswaran S., & Premier R. (2007).** Phytochemical flavonols carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101: 1727-1741.
- [19]. **Sahin F., Cakmakci R. & Kantar F. (2004).** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub> -fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265: 123-129.
- [20]. **Bouras.F.& Houchi.A. (2013).** Etude De L'activité Antioxydante de La Plantes *Rumex Vesicarius* L. Mémoire Master Académique. pp 28.
- [21]. **Ponnusamy K., Petchiammal C, Mohankumar R. & Hopper W. (2010).** In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. *J. Ethnopharmacol.*, 132(1): 349-354.
- [22]. **Dragant T, Novica V, Mihailo S, Ana S & Andrija A. (2003).** Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L.J.Serb.Chem.Soc. 68(1): 17-24.
- [23]. **TehraniFar A., Zarei M., Nemati Z., Esfandiyari B. & Vazifeshenas M.R. (2010).** Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *In: Sci. Hortic.*, 126: 180-185.
- [24]. **Cemeroglu B., Artik N., & Erbas S. (1992).** Gewinnung von Granatap-felsaft und seine Zusammensetzung. *Flussiges Obst*, 59:335-340.
- [25] **Borochoy-Neori H., Judeinstein, S., Tripler E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer I., Holland, D.(2009).** Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *J. Food Compos. Anal.* 22: 189-195.

- [26]. **Martínez J.J., Melgarejo, P., Hernández F., Salazar, D.M. & Martínez, R. (2006).** Seed characterization of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Sci. Hortic.* 110: 241–246.
- [27]. **Marinova E. M.N. V & Yanishlieva V. (1997).** Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry.* 58(3):245-248.
- [28]. **Reguieg Yssaad A & Hammadi K. (2017).** Enhancement of the Bark of *Punica granatum* Fruit through the Phytochemical and Antimicrobial Activity. *Studies Med Aromat Plants*, 6:282. doi: 10.4172/2167-0412.1000282
- [29]. **Bryan G. W., Langston W. J. Hummerstone L. G. & Burt G. R. (1985).** *A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators.* Marine Biological Association of the United Kingdom, Occasional Publication Number 4, pp 92.
- [30]. **Bhandary S.K., Kumari N.S., Bhat V.S., Sharmila K.P & M.P Bekal. (2012).** Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *Nitte University Journal of Health Science (NUJHS)* 2(4):34-38.
- [31]. **El-Falleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia N., Nasri Y., Ferchichi A. (2012).** Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J. Med. Plants Res.*, 6: 4724-4730
- [32]. **Gil I.M., Tomas-Barberan F. A., Hess-Pierce .B., Hol- croft D. M & Kader A. (2000).** “Antioxidant Activity of pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing.” *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48(10): 4581-4589.
- [33]. **Zaouay F. P., Mena C., Garcia-Viguera & Mars M. (2012).** “Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L) cultivars.” *Industrial Crops and Products* 40: 81-89.
- [34]. **Saad H., El Bouhtoury F., Pizzi. A., RodeK., Charrier B & Ayed .B.N. (2012).** Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products* 40: 239-246.
- [35]. **Viuda-Martos M., Fernández-López J & Pérez-Álvarez J A. (2010).** Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (6): 635-654.
- [36]. **Özgen M., Durgac C K., Serc S & Kaya.C. (2008).** “Chemical and Antioxidant Properties of Six Pomegranate Cultivars Grown in the Mediterranean Region of Turkey,” *Food Chemistry*, 111(3): 703-706.
- [37]. **Singh R.P., Murthy K.N.C & Jayaprakasha G.K. (2002).** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 81-86.
- [38]. **Naveena B.M., Muthukumar M., Sen A.R., Babji Y & Murthy. T.R.K. (2006).** Improvement of shelf life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *MeatSci*, 74: 409-415.
- [39]. **Labbe M., F. Pérez C & Sáenz. (2010).** Influence of fruit maturity and growing region on phenolic content, antioxidant capacity and color of pomegranate juices. International conference on Food Innovation, Food Inovva 25-29 October 2010 Universidad de Politécnica De Valencia (Spain).
- [40]. **Bendjabeur. (2012).** Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits de végétaux (cas de grenade ) en vue de leurs utilisation alimentaire. Mémoire de Magister .ENSA Alger.
- [41]. **Ben Ammar W., Mediouni C., Tray B., Ghorbel, M.H & Jemal, F. (2008):** Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Biol. Plant.* 52: 314-320.
- [42]. **Middha SK, Usha T & Pande V. (2013).** A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *Punica granatum* peel waste. *Evid Based Complement Alternat.*
- [43]. **Abdel-Azim S.N., Ahmed M.A., Donia F.A. & Soliman H. (2011).** Evaluation of fungal treatment of some agricultural residues. *Egyptian J. Sheep and Goat Sci.* 6(1):1-13
- [44]. **Mann M. E., Gille E., Bradley R. S., Hughes M. K., Overpeck J. T., Keimig, F. T, & Gross W. (2000).** Global Temperature Patterns in Past Centuries: An interactive presentation, *Earth Interactions*, 4(4): 1-29.

- [45]. Scherrer R. et Gerhardt P. (1971). Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology* 107:718-735.
- [46]. Reddy G. S. N., Prakash J. S. S., Srinivas R., Matsumoto G. I. & Shivaji, S. (2003). *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 977–984.
- [47]. Al-Zoreki N.S. (2009). Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *International Journal of Food Microbiology*; 134:244-248
- [48]. Kadi H, Moussaoui A, Benmehdi H, Lazouni H.A., Benayahia A & Boudarba.N. (2011). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Punica granatum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1 (10): 180-182.
- [49]. Blansky et Newman. (2001). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2):177-206