

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE DE JIJEL**



nb. 02/09

**Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et  
de la Vie**  
**Département de Biologie Moléculaire et cellulaire**

**Mémoire de fin d'études**  
**En vue d'Obtention du Diplôme d'Etudes**  
**Supérieures en Biologie**  
**Option : Microbiologie**

02  
02

**Thème:**



*Sensibilité des moisissures pathogènes et  
d'altération aux extraits tanniques et  
flavoniques  
de *Punica granatum*.*



**Membres de jury :**

**Examinatrice : M<sup>lle</sup> LAGGOUNE S.**  
**Encadreur : M<sup>lle</sup> AKROUM S.**

**Réalisé par:**

**M<sup>lle</sup> HAMIHAM Asma**  
**M<sup>lle</sup> LAOUR Hanane**  
**M<sup>lle</sup> LECHEHEB Fatiha**



**Promotion: 2008-2009.**



---

# REMERCIEMENT

*Avant tout chose, nous remercions ELAH tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience pour réaliser cet œuvre.*

*Nous remercions de façon particulière notre Encadreur M<sup>elle</sup> AKROUM pour le grand effort qu'elle n'a cessé de déployer tout au long de la réalisation de ce travail ces conseils judicieux et sa patience sans limite.*

*M<sup>elle</sup> LAGGOUNE qui a accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions aussi au personnel de laboratoire du département de la biologie moléculaire et cellulaire pour l'aide qu'ils nous ont apporté et notamment M<sup>me</sup> HOURIA.*

*ASMA HANANE FATIHA*



# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Présentation de <i>Punica granatum</i></b>	
<b>I. Présentation de <i>Punica granatum</i></b> .....	2
1.1: Taxonomie .....	2
1.2 : Description .....	2
1.3 : Principe actifs et propriétés d'usage .....	3
<b>Chapitre II : Les polyphénols</b>	
<b>II. Les polyphénols</b> .....	4
2.1: Les métabolites secondaires .....	4
2.1.1 : Définition .....	4
2.1.2 : Rôle .....	4
2.1.3 : Principaux groupes.....	4
2.2 : Les extraits végétaux .....	4
2.2.1 : Définition .....	4
2.2.2 : Intérêt .....	4
2.2.3 : Techniques d'extraction et préparation des extraits végétaux .....	5
2.3 : Les extraits éthanoliques et acétoniques .....	5
2.3.1 : Définition .....	5
2.3.2 : Composition des extraits .....	5
2.3.2.1 : Les acides phénols .....	5
2.3.2.2 : Les flavonoïdes .....	6
2.3.2.3 : Les tannins .....	10
2.3.3 : Rôle des polyphénols .....	12
2.3.3.1 : Rôle antioxydant .....	12
2.3.3.2 : Rôle anticancéreux .....	12
2.4 : Flavonoïdes et tannins comme antimicrobiens .....	12
2.4.1 : Activité antimicrobienne des flavonoïdes .....	12
2.4.1.1 : Activité antibactérienne des flavonoïdes .....	12
2.4.1.2 : Activité antifongique des flavonoïdes .....	13
2.4.2 : Activité antimicrobienne des tannins.....	13
2.4.2.1 : Activité antibactérienne des tannins .....	13
2.4.2.2 : Activité antifongique des tannins .....	13
<b>Matériel et méthodes</b>	
1: Préparation des extraits .....	15
1.1: Préparation de l'extrait éthanolique .....	15
1.2: Préparation de l'extrait acétonique .....	15
1.3 : Préparation des dilutions .....	15
1.4 : Observation microscopique des moisissures .....	15
1.5 : Teste de l'activité antifongique .....	15
1.5.1 : Description de la technique utilisée .....	15
1.5.2 : Les conditions de réalisation de la technique .....	16

1.5.3 : Avantages et inconvénients de la méthode .....	16
1.6 : Le protocole d'application .....	16
1.6.1 : Préparation des souches testes .....	16
1.6.2 : Préparation des solutions fongiques .....	16
1.6.3 : Préparation des disques .....	17
1.6.4 : Application .....	17
1.7 : Partitions (affrontement) entre solvant .....	17
1.7.1 : Principe .....	17
1.7.2 : Application .....	17
1.8 : Teste de l'activité antifongique .....	17
<b>Résultats et discussion</b>	
I : Résultat .....	20
II : discussion .....	25
<b>Conclusion</b> .....	27
<b>Références</b>	

## Liste des abréviations :

**GEM** : Milieu Glucosé à l'Extrait de Malt.

*Fs* : *Fusarium solani* .

*As* : *Acrimonium strictum* .

*Tv* : *Trichoderma viride* .

*An* : *Aspergillus niger* .

*Aa* : *Alternaria alternata* .

**ND**: *Non distinct*.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.

**Mg** : Milligramme.

**MI** : Millilitre.

**UFC** : Unité Formant Colonie.

### Liste des tables :

Tableau 1 : Acide hydroxybenzoïque .....	6
Tableau 2 : Acide hydroxycinamique .....	6
Tableau 3 : Caractéristique noté après observation des moisissures .....	20
Tableau 4 : Présence ou absence de l'activité anti fongique .....	22
Tableau 5 : Présence ou absence de l'activité anti fongique avec les phases des extraits ethanologique et acétonique du départ. ....	24

### Liste des figures :

Figure 1 : Squelette de base des flavonoïdes .....	7
Figure 2 : Les flavones .....	8
Figure 3 : Les flavonones .....	8
Figure 4 : Les flavanols .....	8
Figure 5 : Les flavonols .....	8
Figure 6 : Les chalcones .....	8
Figure 7 : Les aurones .....	8
Figure 8 : Les anthocyanidine .....	8
Figure 9 : Proposition pour la biosynthèse des oligomères de procyanidines .....	11

### Liste des schémas :

Schéma 1 : Biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes .....	9
Schéma 2 : Préparation des extrait ethanologique et partition entre solvants .....	18
Schéma 3 : Préparation des extrait tannique et partition entre solvants .....	19

### Liste des photos :

Photo 1 : Fruites de <i>Punica granatum</i> .....	2
Photo 2 : Fleure de <i>Punica granatum</i> .....	3
Photo 3 : Aspect des zones d'inhibition .....	21
Photo 4 : Aspect des zones d'inhibition avec <i>Alternaria alternata</i> .....	23
Photo 5 : Aspect des zones d'inhibition avec <i>Acremonium strictum</i> .....	23

# *Introduction*

L'homme s'est toujours intéressé aux plantes qui ont constitué pour lui une source de nourriture (plantes comestibles), voire un moyen de guérison des maladies courantes comme exceptionnelles (plantes médicinales). On appelle une plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des pathologies.

Certaines plantes médicinales contiennent toute une gamme de matières efficaces qui peuvent avoir des actions très différentes suivant leur utilisation.

Comme exemple, les graines de lin broyées constituent un laxatif doux, grâce à leurs mucilages (glucides) non solubles, elles gonflent comme une éponge et sont excellentes contre les refroidissements et les douleurs. Ces mêmes graines renferment 30 à 40% d'huile qui peut être utilisée dans les préparations cosmétiques ou pharmaceutiques capables de soulager des eczémas.

La lavande (*lavandula*) est utilisée en infusion comme sédatif dans le cas de nervosité, de fatigue, de trouble du sommeil. Hors, son huile essentielle est un antimicrobien et même insecticide (WICHTL et ANTON, 1999).

Les graines de blé (*Triticum vulgare*) sont très nutritives et la vitamine E qu'il en contient exerce une action protectrice de la paroi des artères et abaisse le taux du cholestérol dans le sang. Aussi l'huile de germe de blé peut prévenir des maladies cardiovasculaires (DELILLE, 2007).

Certaines maladies peuvent très bien se guérir en n'utilisant que les plantes, par contre, d'autres nécessitent une suivie plus intense et l'utilisation des plantes dans ce cas joue un rôle très important dans l'accélération de la guérison (SCHAUENBER et FERDINAND, 2006). Par exemple, les varices atteignant les veines nécessitent un traitement qui fait élargir les veines, la stimulation de la circulation sanguine par des exercices physiques ainsi que le fait de boire des infusions de feuilles de vigne rouge aident à accélérer la guérison. Pour les maladies cardiovasculaires les bienfaits des infusions des feuilles d'olivier sont connus. D'autre part, la lavande, le thym, la menthe, le romarin sont utilisés comme antimicrobien et insecticide dans différents domaines (DELILLE, 2007).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à une plante très utilisée par la population algérienne *Punica granatum*. Nous avons testé son action inhibitrice sur cinq espèces fongiques responsables de pathologies humaines et altérations des textiles.



# *Synthèse bibliographique*

*Chapitre I :*  
*Présentation*  
*de Punica granatum*

## **I : Présentation de *Punica granatum* :**

Cette plante est communément appelée « grenadier ». Aussi, nous trouvons l'appellation de "pomme granate". Son nom "*Punica*" vient du latin "*punicus*" qui désignait l'arbuste et du Carthage "*puniceus*" qui signifie "le rouge pourpre". Son nom spécifique "*granatum*" vient du latin "*granatus*" qui signifie : remplit de grains (1).

### **1.1 : Taxonomie :**

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* (HAMMICHE, 1995).

### **1.2 : Description :**

C'est un arbuste fruitier à tige ramifié originaire d'Asie tempérée occidentale, qui a été acclimatée dans tous les continents et cultivée pour son fruit comestible.

L'espèce tolère la sécheresse mais préfère les endroits ensoleillés, les climats secs et arides et peut atteindre jusqu'à 6 m de hauteur.

Elle a l'écorce toxique d'un gris brunâtre qui se desquame en vieillissant, des fleurs rouges orangées avec pollinisation entomophile, et des feuilles caduques, lancéolées, vert foncé coriaces et brillantes sur le dessus.

En automne, la plante donne de gros fruits globuleux au péricarpe coriace qui vire à maturité au jaune rouge, contenant 6 à 12 loges membraneuses blanchâtres de saveur âpre (aigre) et de nombreuses graines, en moyenne 600 graines, à arille (tégument) translucide d'un rose ou rouge très juteuse et à saveur aigrelette sucrée (1).



**Photo 1 : Fruit de *Punica granatum* (2).**



**Photo 2 : Fleures de *Punica granatum* (2)**

### **1.3 : Principes actifs et propriétés d'usage :**

La grenade est une plante médicinale dont toutes les parties (écorce du tronc, fruits, racines, fleurs, arilles et les graines) sont utilisées (AL-MOSTAFA et AL-THUNIBAT, 2008).

Le fruit est riche en vitamines: A, B (B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>), C, et D, en minéraux et en oligo-éléments notamment en calcium, potassium, sodium, fer, cuivre, phosphore, zinc, soufre .... (1).

Les fleurs du grenadier ; utilisées en infusion contre l'asthme ou par macération où elles donnent un pigment rouge, a des propriétés astringentes et antihémorragiques. L'huile des graines est un œstrogène puissant et les arilles juteuses entrent dans la production des vins et du jus de grenade qui est un antioxydant puissant. Cette caractéristique est due aux acide ellagiques: composés phénoliques antioxydants et anticancérigènes (KISHORE *et al*, 2009).

Le jus de grenade renferme aussi des acides phénols (acide ellagique, acide gallique) des flavonoïdes (lutéoline, quercétine) des tannins hydrolysables (ellagitannins, gallotannins), les tannins condensés (catéchines) des acides organiques (tel que l'acide malique et l'acide citrique) (KUMAR *et al*, 2008).

L'écorce de la grenade est un astringent puissant renfermant de 20-25% de tannins (acide tannique, acide gallique..) et des alcaloïdes tel que la pelletière et l'isopelletière que sont toxiques à forte doses (1), (2) (KUMAR *et al*, 2008).

# *Chapitre II :*

## *Les polyphénols*

## **II. Les polyphénols :**

### **2.1 : Les métabolites secondaires :**

#### **2.1.1 : Définition :**

Comme leur nom l'indique, ces composés sont produits au cours de réactions chimiques hors la photosynthèse. Ces réactions représentent ce qu'on appelle le métabolisme secondaire.

#### **2.1.2 : Rôle :**

Des études préalables ont montré que les composés secondaires ont des rôles biologiques très importants, dont nous citons les plus répandus:

- Rôle défensif contre les agressions microbiennes.
- Rôle dans la structure des plantes (lignine, tannins).
- Rôle dans la réduction de la digestibilité car ils ont une forte astringence (action anti herbivores).

#### **2.1.3 : Principaux groupes :**

Les métabolites secondaires comportent plusieurs types de composés, nous citons parmi eux :

- 1- Les composés azotés : sont synthétisés à partir d'acides aminés et comprennent :
  - Les alcaloïdes : substances azotées à caractères alcalin (WILHELM, 1998). Ils sont utilisés comme antalgiques (morphine), comme substances paralysantes (caféine) ou comme poison (nicotine).
  - Les hétérosides : tel que les saponosides qui ont la caractéristique de mousser avec l'eau et rendre les plantes qui en contiennent immangeables.
- 2- Les huiles essentielles : sont des composés terpéniques (aromatiques) très volatiles et responsables des odeurs des plantes.
- 3- Les gommes et les résines : sont des substances produites suite aux blessures végétales.
- 4- Les composés phénoliques : interviennent dans les interactions plante - plante. Parmi eux, nous citons : les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (3).

### **2.2 : Les extraits végétaux :**

#### **2.2.1 : Définition :**

L'extraction des principes actifs des végétaux s'est faite connue depuis l'antiquité quand l'homme a découvert les bienfaits par des procédés solide/liquide qui visent à séparer les constituants des corps solides : écorce, fleurs, racine ... par solubilisation dans un solvant et permettant d'obtenir une phase liquide qui est ensuite purifiée.

Selon la nature du liquide (solvant), nous arrivons à extraire soit un groupe de composés précis ou un mélange de groupes.

#### **2.2.2 : Intérêt :**

Les extraits végétaux permettent de présenter sous forme utilisable les principes actifs des plantes. Outre leurs bienfaits thérapeutiques, les principes actifs des plantes après extraction et purification, sont engagés en cosmétologie pour la fabrication de divers produits cosmétologiques, en médecine dans la fabrication des détergents...et dans les produits nutraceutiques comme additifs alimentaires et éléments pharmaceutiques (3).

### **2.2.3 : Technique d'extraction et préparation des extraits végétaux :**

Les premières techniques utilisées ont permis d'obtenir essentiellement des extraits aqueux et hydro alcooliques. Les principales techniques utilisées sont:

- ❖ L'infusion : consiste à verser sur la plante de l'eau potable bouillante et à laisser refroidir. Cette technique convient aux plantes fragiles.
- ❖ La décoction : consiste à maintenir la plante avec de l'eau potable jusqu'à l'ébullition pendant une durée de 15 à 30 minutes.
- ❖ La digestion : c'est le maintien en contact de la plante avec de l'eau à une température inférieure à celle de l'ébullition pendant 1 à 5 heures. Cette technique n'est utilisée que pour les racines et les rhizomes.
- ❖ La macération : c'est la mise en contact de la plante réduite en fragments avec le solvant et le tout sous agitation. La solution finale sera soutirée et conduira après évaporation du solvant à l'extrait brut. Cette technique convient aux constituants tellement fragiles que même l'infusion risque de les altérer (WICHTL et ANTON, 2003).

## **2.3 : Les extraits éthanoliques et acétoniques :**

### **2.3.1 : Définition :**

Pour l'obtention des extraits éthanoliques et acétoniques le matériel végétal récolté doit être séché à l'ombre à l'abri de l'humidité et de la lumière ; et conservé dans des récipients hermétiquement fermés à température ambiante (WICHTL et ANTON, 2003).

La plante est ensuite broyée et mise à macérer dans le solvant approprié (éthanol à 80% +20% d'eau et acétone à 70% +30% d'eau) à température ambiante. Les extraits sont récupérés et concentrés par l'évaporation des solvants dans le rotavapor 40°C pour l'éthanol et 35 °C pour l'acétone.

### **2.3.2 : Composition des extraits :**

L'éthanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes, même si des fois cet extrait contient aussi des acides phénols. Par contre, l'acétone est utilisée pour l'extraction des tannins (MARKHAM, 1982). Les acides phénols et les flavonoïdes représentent les formes phénoliques les plus simples qui ont une structure chimique allant d'un simple phénol en C<sub>6</sub> (comprennent au moins un noyau benzénique) jusqu'aux flavonoïdes en C<sub>15</sub>.

Les tannins résultent de la condensation des anthocyanes (RICHTER, 1993) (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

#### **2.3.2.1 : Les acides phénoliques :**

##### **a- Définition :**

Un acide phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se localisent sous forme soluble dans les vacuoles.

Le terme « acide phénol » désigne les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

##### **b- Classification :**

##### **\*Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque :**

Ils résultent de l'hydroxylation de l'acide benzoïque. Ont une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, ensuite les substitutions hydroxyles peuvent être méthylées.

Les acides phénols se trouvent sous forme libre, d'esters ou d'hétérosides comme ils peuvent être à l'état condensé comme c'est le cas de l'acide gallique dans les tannins hydrolysables (BRUNETON J, 1999).

**Tableau 1 : Acides hydroxybenzoïques (SARNI- MANCHADO et CHEYNIER, 2006).**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
Acide benzoïque	H	H	OH	H	
Acide vanillique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
Acide gallique	H	OH	OH	OH	
Acide syringique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
Acide salicylique	OH	H	H	H	

**\*Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique :**

Les dérivés de l'acide cinnamique ont une structure de base de type C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> se présentant souvent sous forme estérifiée. Les plus fréquents sont les acides salicylique, p-coumarique, caféique, sinapique et férulique qui sont appelés phényl propanoïdes.

**Tableau 2 : Acides hydroxycinnamiques (SARNI- MANCHADO et CHEYNIER, 2006).**

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
Acide cinnamique	H	H	H	
Acide p-coumarique	H	OH	H	
Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
Acide caféique	OH	OH	H	
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

**2.3.2.2 : Les flavonoïdes :**

**a- Définition :**

Le terme « flavonoïde » du latin "*flavus*" qui signifie « jaune » désigne une large gamme de composés phénoliques presque toujours hydrolysables qui ont des couleur allant du jaune clair au jaune d'or (GUIGNARD, 1996).

**b- Localisation :**

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits... Leur rôle de co-pigments contribue à la coloration. Ils sont synthétisés au niveau des chloroplastes à partir des cinnamoyl-CoA provenant du réticulum endoplasmique. Combinés à des hétérosides, ils quittent le chloroplaste et s'accumulent dans la vacuole.

Les flavonoïdes se trouvent surtout dans les vacuoles mais parfois dans le cytoplasme ou dans les membranes des tissus lignifiés. Comme les anthocyanes localisés dans les parties externes des fruits, des feuilles et des fleurs. Les chalcones sont retrouvées dans les pétales des fleurs (GABOR *et al*, 1988).



### c- Structure et classification :

Les flavonoïdes ont un squelette carboné à 15 atomes de carbone constitué de deux cycles en C<sub>6</sub> (cycles A et B) reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> qui forme généralement un cycle pyrane (RICHTER, 1993) (BRUNETON, 1999).

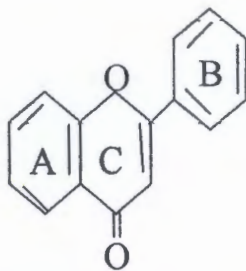
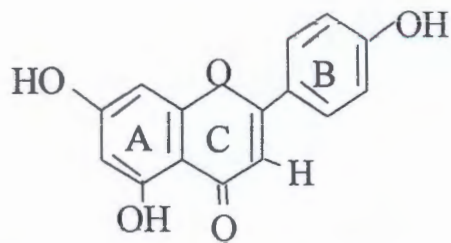


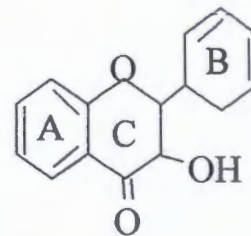
Figure 1 : Squelette de base des flavonoïdes (SARNI- MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Nous pouvons distinguer notamment parmi les différents types des flavonoïdes:

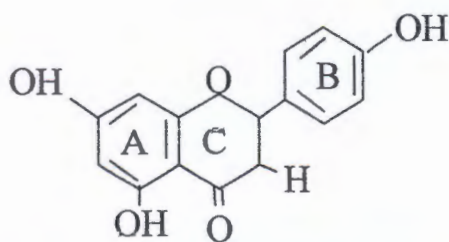
- **Les flavones** : dérivés du 2 phénylchromone (Lutéoline, Apigénine). (Figure 2).
- **Les flavanones** : dérivés du 2,3 dihydrogéné (afzéléchol, catéchol, naringinine, Eriodictyol, homoeriodictyol). (Figure 3).
- **Les flavonols** : dérivés du 3 hydroxy 2 phénylchromone (kaempférol, quercétine, myricétol, fisétine). (Figure 4).
- **Les flavanols** : dérivés du 2,3 dihydro 2 phénylchromanes (catéchines). (Figure 5).
- **Les flavononols** : dérivés 3 hydroxy 2,3 dihydro 2 phénylchromane, (dihydroquercétine).
- **Les chalcones** : ont un noyau pyranique central ouvert (ex: la butéine). (Figure 6).
- **Les aurones** : constituées du 2 benzylidène coumaranones (aureucidine). (Figure 7).
- **Les Anthocyanidines** : dérivés de 2-phénylbenzopyrilliums (ex: la cyanidine). (Figure 8) (SARNI- MANCHADO et CHEYNIER, 2006).



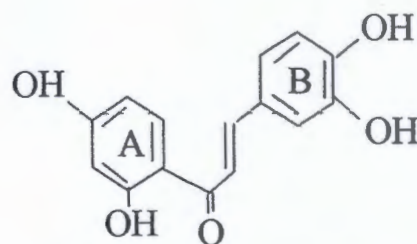
**Figure 2 : Flavone (ex: apigénine)**



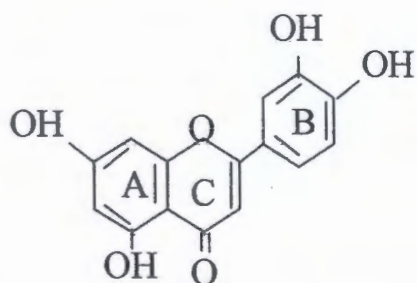
**Figure 5 : Flavonols**



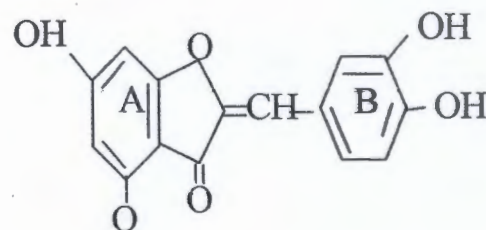
**Figure 3 : Flavanone (ex : narigénine)**



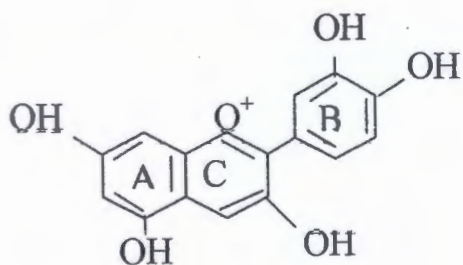
**Figure 6 : chalcones (ex: Butéine)**



**Figure 4 : Flavanols (ex: quercétine)**



**Figure 7 : Aurones (aureucidine).**



**Figure 8 :Anthocyanidines(ex: cyanidine)**

(SARNI- MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

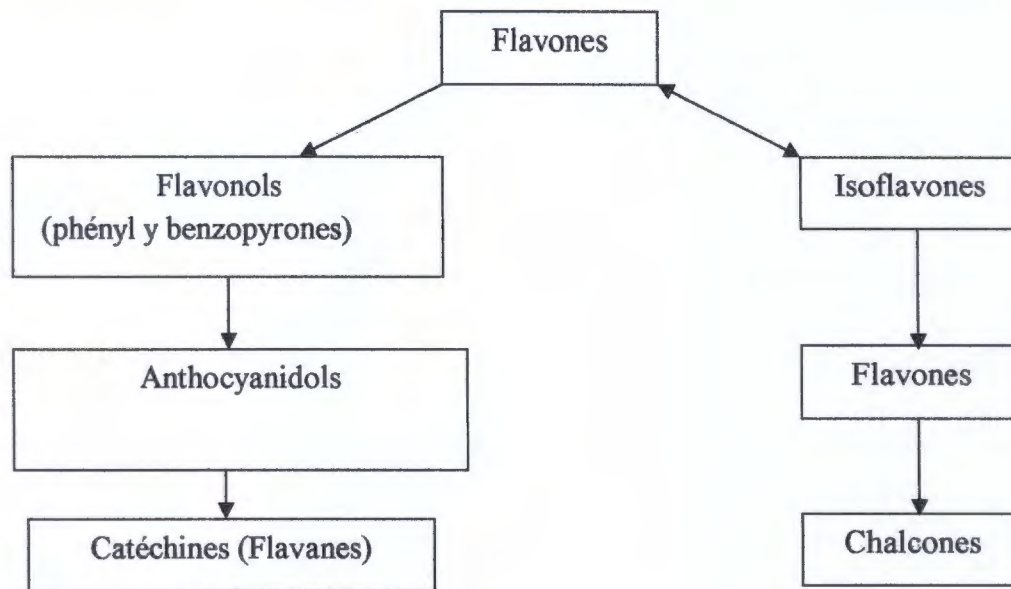
#### **d- Biosynthèse des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbones constitué de deux cycles en C<sub>6</sub> (A et B) reliés par une chaînes en C<sub>3</sub>. Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun qui est la shikimate-phenylalanine (HELLER et FORKMANN, 1993) (GRISBACH, 1982). Ce précurseur de couleur jaune est métabolisée sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase synthase ou la flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol (dihydrokaempférol) respectivement.

de l'enzyme chalcone isomérase synthase ou la flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol (dihydrokaempférol) respectivement.

Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C<sub>3</sub>. Le dihydro flavonols, en présence de la flavonols synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonols, kaempférol ou en flavan 3,4 diols puis en anthocyanidine (pelargonidine-3-O-glucoside).

Le pelargonidol, sous l'action de la 3-O-glycosyl- transférase se transforme en anthocyanoside : pelargonidol-3- glucoside (MARFAK, 2003). (Schéma 1)



**Schéma 1 : Biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (ROBINS *et al*, 1990).**

#### **e- Propriétés et rôle des flavonoïdes :**

##### **- Dans la plante :**

Outre qu'ils contribuent à donner la couleur des plantes, les flavonoïdes jouent un rôle phytoalexine, c'est à dire, permettent de lutter contre les infections causées par les champignons et les bactéries. Aussi, ils assurent la photoprotection vis-à-vis de l'ultraviolet et participent dans la pollinisation et l'attraction des insectes (HADI, 2004).

##### **- Chez l'homme :**

- Favorisent la relaxation vasculaire ce qui améliore la circulation périphérique, la résistance capillaire et empêche l'agglutination des plaquettes sanguines, et la coagulation du sang (MATTIELLO *et al*, 2009) (BASU et PENUGONDA, 2009)

- Inhibition des de l'histamine.

- Réduction des accumulations réactions inflammatoires et des allergies (BASU et PENUGONDA, 2009) (RATHEE *et al*, 2009).

- Augmentation de la fluidité des membranes cellulaires.

- Diminution des symptômes de ménopause et de la sécheresse vaginale (HUNTLEY, 2009).

- Rôles antiviraux, antitumoraux, anticancereux (KISHORE *et al*, 2009).

- Limite l'oxydation des lipides sanguins.

### 2.3.2.3 : Les tannins :

Le terme « tannin » provient d'une pratique ancienne qui utilise des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux. Processus dans lequel les tannins se lient avec les protéines par des liaisons résistantes aux champignons et aux bactéries (WILHELM, 1998).

#### a- Définition :

Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire variant entre 500-2000 KD. Ils sont capables de se lier aux protéines et les précipiter. Aussi, ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et leurs dérivés (HAGERMAN et BUTTLER, 1981).

#### b- Localisation et répartition :

Les tannins sont très répartis dans le règne végétal. Nous les trouvons chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables) (SEIGLER, 1998). Ils sont détectables dans les vacuoles associées à des protéines et des oses (HARBONE et GRAYER, 1988).

#### c- Structure et classification chimique :

Leur structure chimique est très variable mais comporte toujours une partie polyphénolique. Nous distinguons habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tannins qui se différencient par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique.

##### \*Les tannins hydrolysables :

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). Il s'agit de gallotannins. Aussi, des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C<sub>3</sub> de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acides hexahydroxydiphénique, dits: ellagitannins (GUIGNARD, 1996).

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de la  $\beta$ -oxydation des composés C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondant. Mais, l'acide shikimique est considéré comme étant le meilleur précurseur. (SEIGLER, 1998).

##### \* Les tannins condensés :

Ce sont des proanthocyanidines, c'est-à-dire des composés phénoliques hétérogènes: dimères, oligomère ou polymères de flavanes, flavan 3 ols, 5 flavanols, 5 deoxy 3 flavonols et flavan 3,4 diols (STAFFORD, 1999).

Ces composés ont tous comme précurseur des flavonoides C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, et diffèrent entre eux par: le type de liaison, les monomères de flavonoides impliqués, la position stéréochimique des carbones 2, 3 et 4, les hydroxylations et la présence ou non de substituants comme l'acide gallique (STAFFORD, 1999).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont des quercétines.

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (STAFFORD, 1999).

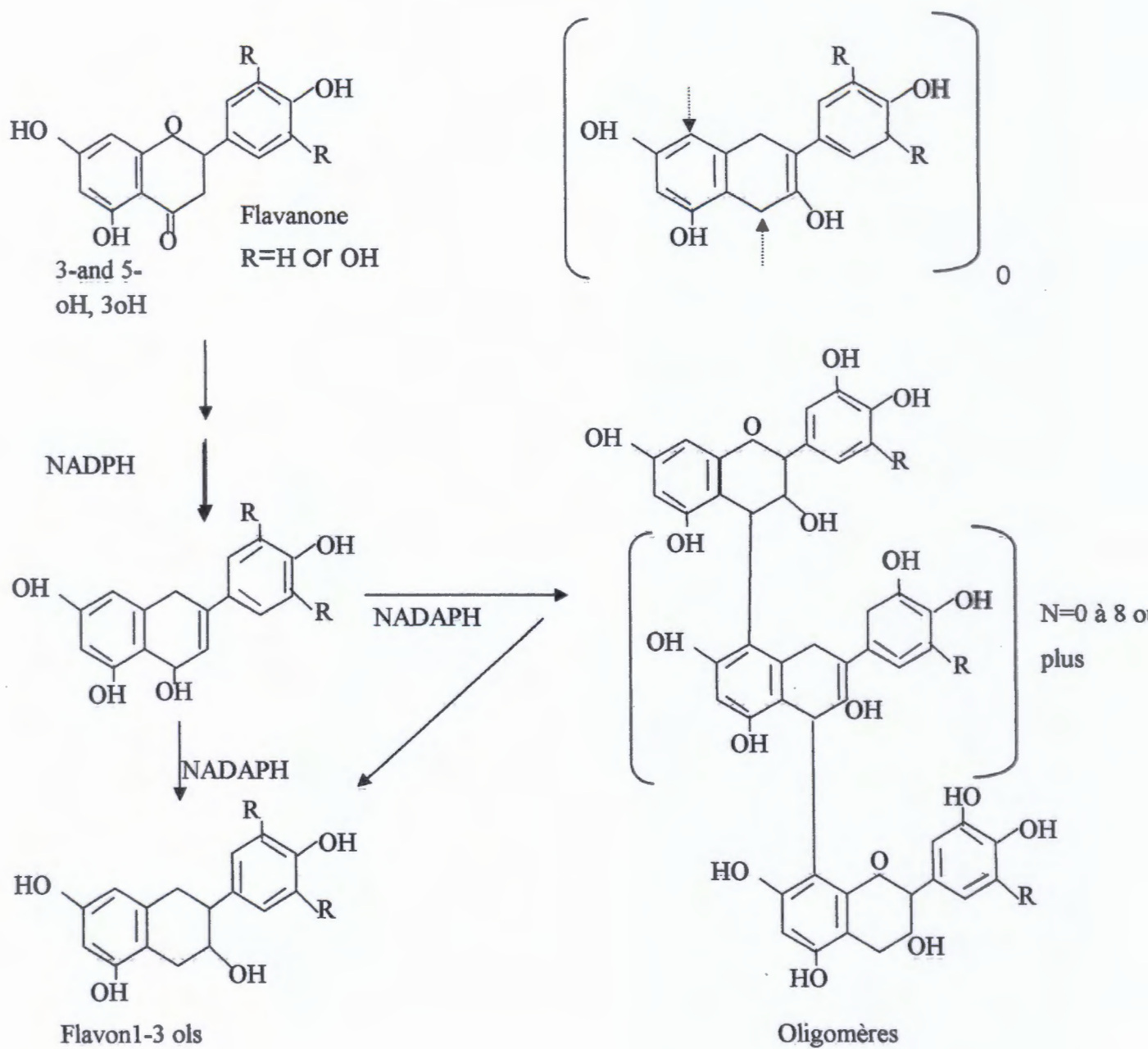


Figure 9 : Proposition pour la biosynthèse des oligomères de procyanidines (SEIGLER, 1998).

#### **d- Intérêt des tannins :**

Suivant leur rôle protecteur dans les plantes contre les agressions microbiennes, les tannins sont utilisés dans le domaine microbiologique pour détecter leur rôle antimicrobien et antiviral.

Les tannins possèdent des propriétés thérapeutiques, et chimioprotectrices qui permettent de protéger de la toxicité causée par des agents chimiques, contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine (CHERUVANKY, 2004).

-Ils préviennent de la mort cellulaire : apoptose et nécrose (RAY *et al*, 2000).

#### **2.3.3 : Rôle des polyphénols :**

##### **2.3.3.1 : Rôle antioxydant :**

Suite aux agressions environnementales (cigarettes, polluants, infections), le corps humain produit en permanence des radicaux libres, espèces chimiques instables déclenchant une chaîne de vols d'électrons responsables de la mort cellulaire et de l'apparition du cancer.

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres en se liant avec elles par des liaisons covalentes et d'activer d'autres antioxydants du corps, cette activité permet aux polyphénols de moduler la communication entre les cellules et le cerveau et de favoriser le système immunitaire (BASU et PENUGONDA, 2009).

##### **2.3.3.2 : Rôle anticancéreux :**

- Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de défense anticancéreuse (KISHORE *et al*, 2009).

- L'apparition du cancer peut être bloquée par la capacité des tissus cibles à métaboliser les agents mutagènes par l'intermédiaire de certaines enzymes synthétisées sous l'action des polyphenols.

- Les enzymes dites de la phase I oxydent les substances mutagènes hydrophobes en produits qui constituent la cible des enzymes de la phase II qui provoque leur hydrolyse et excrétion hors cellule (JHONSON, 1999)

Parmi les flavonoïdes, la quercétine et la catéchine sont les plus actifs sur les cellules tumorales, et les proanthocyanidine, les procyanidines de la part des tannins.

#### **2.4 : Flavonoïdes et tannins comme antimicrobiens :**

##### **2.4.1 : Activité antimicrobienne des flavonoïdes :**

###### **2.4.1.1 : Activité antibactérienne des flavonoïdes :**

Le pouvoir antibactérien de certains flavonoïdes a été confirmé par des recherches scientifiques antérieures qui ont montré qu'ils avaient effectivement un effet sur la perméabilité bactérienne. En effet, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries, dont nous citons comme exemple *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotroplum sinvatum*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus sp.*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (FABRI *et al*, 2009).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes ; ex: l'apigénine montre une activité contre plusieurs bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *B. subtilis*), Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) (PEREIRA *et al*, 2007) et la galangine qu'a une activité contre

*Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* (UZEL *et al*, 2005).

#### **2.4.1.2 : Activité antifongique des flavonoïdes :**

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des plus récentes études sur cette activité est celle de MANTHEY (2004) qui démontre l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxy flavones de *Citrus paradisi* de *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobilétine, la simensetine et la tengerétine extraites de ces deux espèces de *Citrus* servent à protéger ces derniers contre les attaques de *Penicillium digitatum*.

Aussi, les flavonoïdes de *Funtumia elastica* et *Mallotus oppositifolius* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses: *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichoderma sp*, *Trichosporon cutaneum*, *Microphyton mentagrophytes*, *Candida zelandica*, *Candida albicans* (ADEKUNLE et IKUMAPAYI, 2006). D'autres flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eucalyptus globulus*, *E. maculata* et *E. viminalis* ont une action inhibitrice contre les dermatophytes comme *Trichophyton mentagrophytes* (TAKAHASHI *et al*, 2004).

Les travaux de JOHANN et ses collaborateurs (2007) sur l'extrait hexanique de l'écorce de *Citrus spp.* ont donné une activité contre ce même dermatophyte et contre d'autres pathogènes comme *Microsporium canis*, *Curvularia sp.*, *Penicillium digitatum*.

#### **2.4.2 : Activité antimicrobienne des tannins :**

##### **2.4.2.1 : Activité antibactérienne des tannins :**

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales représentés par les bactéries dégradants les fibres et les bactéries protéolytiques (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyrvibrio fibrisolvans*, *Clostridium proteoclasticum* ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*.

L'inhibition bactérienne par les tannins dépend de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (SIVAKUMARAN *et al*, 2004).

##### **2.4.2.2 : Activité antifongique des tannins :**

Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, nous citons les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de *Camellia sinensis* contre *Exobasidium vexans* (SAVITRI KUMAR *et al*, 2009) et les tannins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporium cassis*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*...) et les levures opportunistes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*...).

Autre étude a été montrée que les tannins hydrolysables et condensés de *Pinus maritima* L. ont une action antimycosique contre *Candida*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces* (ROMANI *et al*, 2006).

Cette action antifongique est couramment utilisée pendant les opérations œnologiques lors de la manufacture des vins car les tannins polaires de ces derniers ont une grande capacité de se fixer sur les champignons néfastes.



# *Matériel et méthode*

## **1 : Préparation des extraits :**

L'écorce de la grenade a été cueillie en septembre 2008 de la région de Ouled Bounnar à Jijel. Elle a ensuite été séchée et coupée en petits morceaux .20 g ont été pesées afin de réaliser les macérations.

### **1.1. : Préparation de l'extrait éthanolique :**

La préparation de cet extrait s'est faite par macération dans 350 ml d'un mélange éthanol (96%) / eau (80/20 : v/v) pendant 24 h dans un bécher sous agitation, avec un barreau magnétique et un agitateur puis laisse reposé pendant une nuit (NASERI *et al*, 2008). Le macérât a ensuite été filtré à l'aide du papier filtre mis dans un entonnoir. La récupération du solvant s'est faite dans des flacons et le filtrat a été mis au repos pendant une nuit. Ce repos était nécessaire pour la précipitation des déchets (saletés, boues...).

Après le repos, le macérât a été évaporé à sec dans le rotavapor à 55°C. Le résidu sec (4,96 g) a été récupéré dans une solution à 1/10 : c'est l'extrait éthanolique brut.

### **1.2 : Préparation de l'extrait acétonique :**

L'extraction des tannins à partir de la matière végétale séchée et découpée s'est faite par macération dans un solvant Acétone/eau (70/30:v/v) équivalent à une solution de 350 ml pendant 1 nuit.

Le volume de la macération a été filtré et évaporé à sec dans le rotavapor à 70°C.

Le résidu sec (5,55g) a été récupéré dans une solution à 1/10 présentant ainsi l'extrait brut.

### **1.3 : Préparation des dilutions :**

Pour chaque extrait, nous avons préparé une série de dilutions pour pouvoir déterminer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). L'extrait brut était récupéré dans une solution à 1/10. La solution 1/20 est préparée par l'ajout de 1ml de la solution 1/10 dans 1ml d'eau distillée. L'addition de 1ml de la solution 1/10 dans 2ml d'eau distillée a permis l'obtention de la solution 1/30..... De la même façon nous avons préparé les autres dilutions.

### **1. 4 : Observation microscopique des moisissures :**

Les moisissures qui ont aussi été ramenées sous forme de culture dans des boites de pétri, nous ont permis de réaliser les observations microscopiques de chacune. Cette même observation a été réalisée à partir des solutions fongiques.

L'objectif de cette étape était de confirmer que les moisissures n'étaient pas contaminées et aussi afin d'éviter une éventuelle confusion.

La méthode consistait à déposer sur une lame dégraissée quelques gouttes de la solution fongique étudiée à l'aide d'une anse de platine ; ou un ruban adhésif utilisé pour prélever du mycélium avec une goutte d'eau physiologique stérile préalablement déposée et étalée. L'observation sous microscope optique s'est effectuée aux objectifs 10 puis 40.

### **1.5 : Test de l'activité antifongique :**

#### **1.5.1 : Description de la technique utilisée :**

Cette activité a été testée par la méthode de diffusion sur gélose. Son principe est le même que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, le dépôt de disques (patches) imprégnés de principes sur une géloseensemencée par le microorganisme considéré. Les principes actifs contenus dans les patches diffusent dans la gélose uniformément et l'inhibition des germes se manifeste par l'apparition des zones de non croissance autour des disques actifs. Le diamètre des zones d'inhibition nous permet de définir les extraits

et les concentrations actives. Donc de déterminer la CMI pour chaque moisissure étudiée (RANKOVIC *et al*, 2007).

### **1.5.2 : Conditions de réalisation de la technique :**

Afin d'obtenir des résultats interprétables, le conditionnement de cette méthode nécessite l'utilisation de milieux de culture permettant la croissance des moisissures et ne contenant pas d'inhibiteurs influençant les résultats. Dans notre cas, nous avons utilisé la gélose nutritive fournie par le laboratoire de microbiologie à l'université de Jijel.

Les géloses sabouraud, Malt-Agar et Milieu glucosé à l'extrait de Malt n'ont pu être utilisées du fait qu'elles ne permettaient pas la croissance de toutes les espèces utilisées. Elles ont cependant été utilisées pour l'isolement et la conservation de certaines espèces.

### **1.5.3 : Avantages et Inconvénients de la méthode :**

#### **a- Avantages :**

- Facilité d'application.
- Rapidité de l'obtention des résultats.
- Fiabilité en terme de présence ou absence d'activité.

#### **b- Inconvénients :**

- Les diamètres des zones sont des fois diffusionnelles et nécessitent de refaire la même application plusieurs fois.
- Cette méthode peut donner des valeurs de diamètres des zones approximatives, plutôt que précises, du fait que les patches peuvent ne pas absorber les mêmes quantités des extraits.

#### **c- Solutions :**

Afin de prévenir les problèmes qui peuvent être rencontrés avec cette méthode :

- Nous avons refait toutes les applications à 2 reprises.
- Dans le cas d'une différence importante (ex: 3 mm de différence pour une même zone), nous avons refait une troisième application.
- Dans le cas d'une zone diffusionnelle, nous avons refait la même application trois ou quatre fois. Si le problème avait persisté, il aurait fallu calculer le plus grand diamètre (a) et le plus petit (b), ensuite effectuer le calcul suivant :  $a+b/2$ .

## **1.6 : Le protocole d'application :**

### **1.6.1 : Préparation des souches tests :**

Les moisissures que nous avons étudiées ont été prélevées et identifiées au laboratoire de microbiologie et de mycologies appliquées de l'université Mentouri, à Constantine. Ces espèces ont été choisies pour leurs activités pathogènes pour l'homme et altératives pour les textiles.

### **1.6.2 : Préparation des solutions fongiques :**

Sur la surface des moisissures fournies dans des boîtes de pétri, nous avons prélevé une partie des mycéliums que nous avons ensemencés dans des bouillons nutritifs. Toutes les solutions, ont ensuite été ramenées à  $10^6$  ufc. Cette dernière étape a été réalisée au département de microbiologie et biochimie (Université Mentouri, Constantine).

### **1.6.3 : Préparation des disques :**

Le papier wattman fourni par le laboratoire de microbiologie a été découpé en disques de 6 mm de diamètre qui ont été stérilisés dans 30 ml d'eau distillée dans l'autoclave à 120°C pendant 10 minutes puis séchés dans le four à 15-20°C (VOLPIN, 2004). Ils ont ensuite été trempés dans les principes actifs pendant 5 minutes avant leur application sur la gélose.

#### **1.6.4 : Application :**

L'ensemencement des boîtes contenant la gélose nutritive s'est fait par étalement à l'aide d'un râteau. Ensuite, les disques imprégnés de principe actifs ont été appliqués à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose. Chaque boîte contenait 5 disques périphériques et 1 autre central. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 25°C pendant 72 heures.

Cette application a été refaite en 2 répétitions pour chaque moisissure.

#### **1.7 : Partitions (Affrontements) entre solvants :**

##### **1.7.1 : Principe :**

Pour cette expérience, les solvants utilisés étaient l'éther de pétrole, l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle. Leurs intérêts étaient pour :

\*L'extrait brut éthanolique :

L'éther de pétrole servait à soutirer les déchets (graisses, sucres, composés non phénoliques). Le deuxième servait à soutirer les acides phénols et les aglycones (flavonoïdes non glycosylés). Et enfin, le dernier servait à soutirer les flavonoïdes monoglycosylés. La phase aqueuse restante contenait alors les flavonoïdes di, tri et oligoglycosylés

\*L'extrait brut acétonique : L'éther de pétrole servait à soutirer les déchets.

L'éther diéthylique servait à soutirer les tannins monomériques et enfin l'acétate d'éthyle à soutirer les tannins dimériques.

La phase aqueuse récupérée contenait alors des tannins tri et polymériques non soutirés.

##### **1.7.2 : Application :**

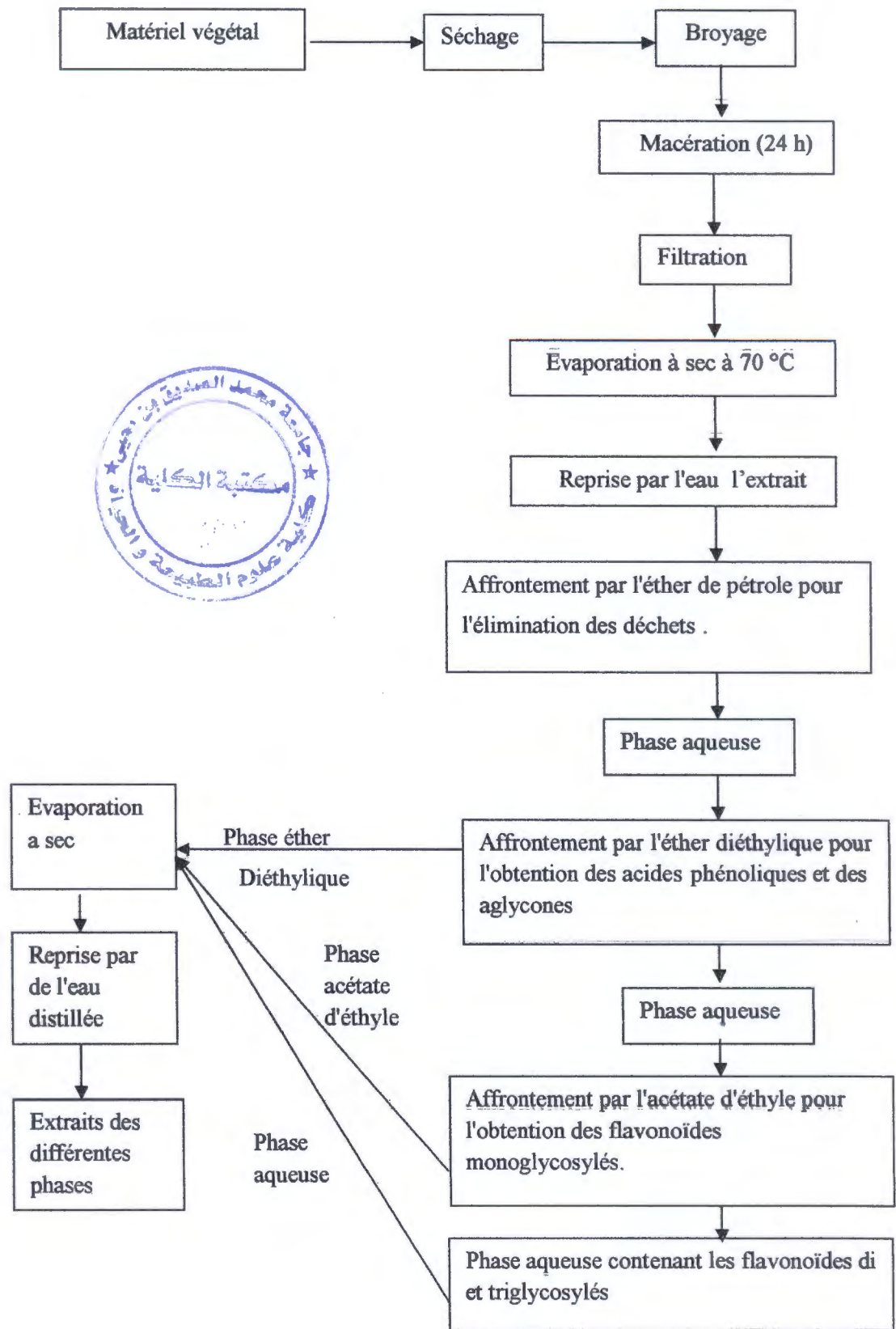
Ces affrontements ont été réalisés en utilisant les extraits bruts éthanoliques et acétoniques réalisés de nouveau (d'après le même protocole décrit auparavant). Pour chaque extrait brut, nous avons ramené le volume à 90 ml avant la réalisation des affrontements. Le même volume de l'éther de pétrole a été ajouté dans une ampoule à déchanter. Après une agitation énergique et un repos de 20 minutes, deux phases ont été obtenues, chacune a été récupérée dans un bécher.

La phase éther de pétrole a été rejetée et la phase aqueuse réutilisée pour le reste de la procédure. La même opération a été répétée avec l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle.

Nous avons obtenu alors trois phases : la phase éther diéthylique, la phase acétate d'éthyle et la phase aqueuse. Chacune d'elles a été évaporée à sec dans le rotavapor à 55°C, sauf les phases éther diéthylique qui ont été évaporées à l'air libre (Schémas 2 et 3).

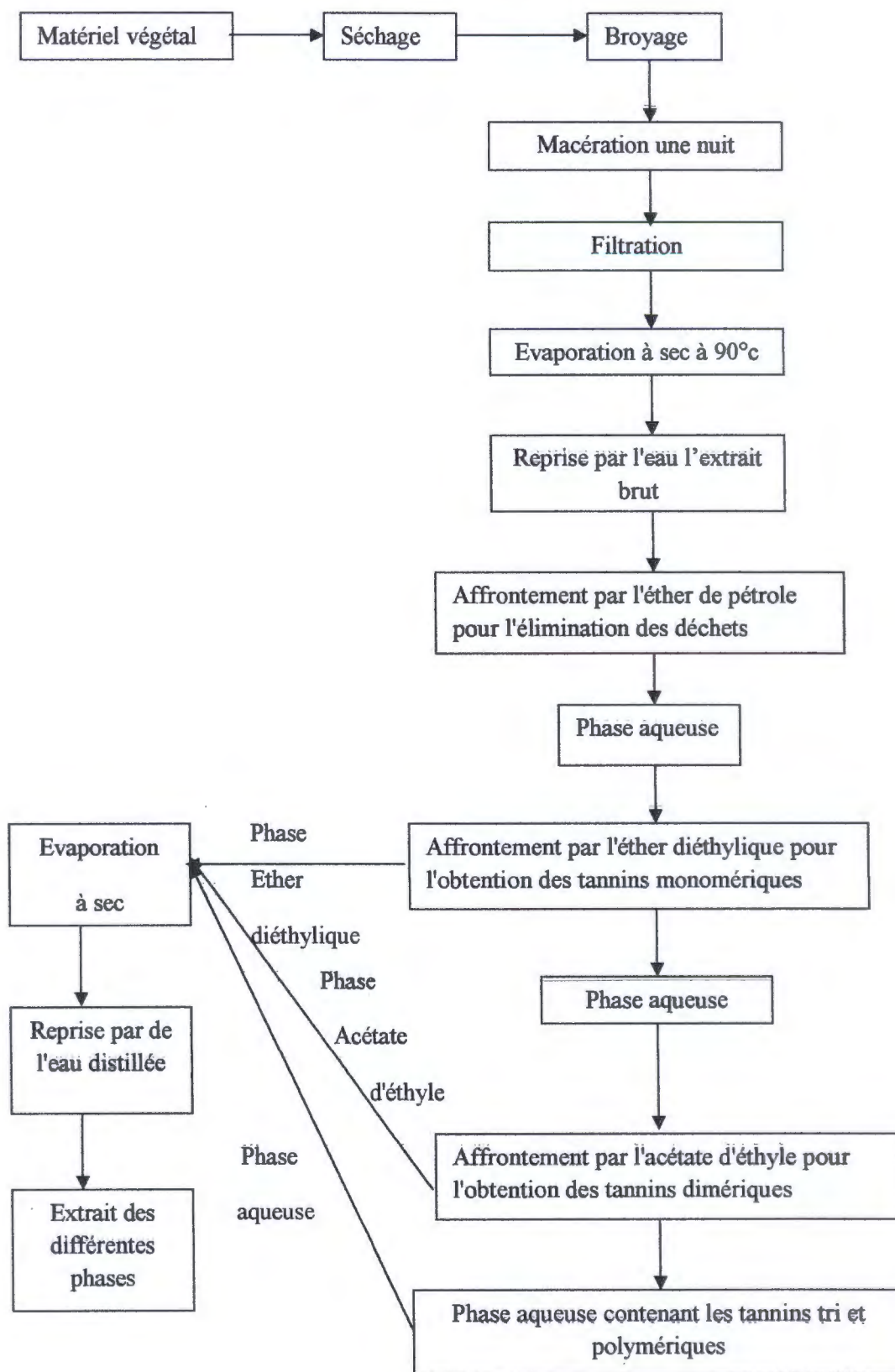
Après l'évaporation complète de chaque phase, nous avons récupéré les extraits secs dans de l'eau distillée stérile, de telle sorte à obtenir des dilutions 1/10 pour chaque phase.

**1.8 : Test de l'activité antifongique :** Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose, selon le même protocole décrit auparavant.



**Schéma 2** : Préparation de l'extrait éthanolique et partitions entre solvants.

(BRUNETON J, 1999)



**Schéma 3** : Préparation de l'extrait acetoniques et partitions entre solvants.

(BRUNETON J, 1999)

# Résultats et discussion

## I. Résultat :

L'observation microscopique des moisissures après leur culture au laboratoire a permis d'effectuer les observations notées dans le tableau 3. D'après ces dernières, nous avons confirmé que nos moisissures s'agissaient bien d'*Acremonium strictum*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* et *Fusarium solani*.

**Tableau 3 :** Caractéristiques notées après observation des moisissures (BOTTON et al, 1990).

		<i>As</i> (sur milieu GEM)	<i>Tv</i> (sur milieu Malt Agar)	<i>An</i> (sur milieu Malt Agar)	<i>Aa</i> (Sur milieu Malt Agar)	<i>Fs</i> (sur milieu Sabouraud)
Observation macroscopique	Recto de la boîte	Colonies à croissance moyennement rapide, plate à centre parfois surélevé, duveteuse ou membraneuse de couleur variable: blanchâtre à rosée. Sporogénèse faible.	Thalle à croissance rapide, d'aspect grumeleux plus au moins floconneux, de couleur blanche au départ devenant vert-bleu dans les régions conidio-gènes.	Thalle à croissance rapide, cotonneux blanc au départ devenant poudreux ou duveteux avec l'apparition de spores noires. Sporogénèse très importante.	Espèce à croissance relativement rapide. Le mycélium a l'aspect de velours aplati, et de couleur brun-grise avec périphérie blanche.	La culture est rapide, montre un mycélium duveteux, floconneux de couleur variable (blanc, beige, crème).
	Verso de la boîte	Le revers est incolore	Le revers est incolore	Revers blanchâtre	Marron foncé à noir	Revers brun à noirâtre (pigment).
Observation microscopique		Mycélium hyalin et parfois septé. Phialides allongés (mycélium aérien) sur les hyphes. Les Phialides ont portées à leur extrémité un bouquet de spores unicellulaires formant une fausse tête. Les conidies ont été de forme cylindriques ou elliptiques. Pas de chlamydo-spore	Mycélium siphonné, conidiophores très ramifiés à ramifications de plus en plus courtes vers l'apex formant de ce fait un ensemble pyramidal. Phialides regroupées en bouquets de 2 à 4, elles sont droites ou incurvées formant des conidies ovoïdes, globuleuses, granuleuses. Présence de chlamydo-spores globuleuses, lisses, hyalins, intercalaires ou terminales dans	Mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores, lisses dressés, hyalins ou brunâtres non ramifiés. Sporocystes globuleux et de grande taille, de couleur marron foncé. Têtes aspergillaires bisériées: Phialides portées par des métules entourant tout le sporocyste. Les Phialides donnent des conidies sèches unicellulaires, globuleuses, brunes, équinuleuses,	Thalle septé, portant des conidiophores noirs, lisses, droits ou flexueux, pourvus de 1 à 3 septes percés de un ou plusieurs pores à travers les quels s'ont bourgeonnés des conidies pluricellulaires, cloisonnées en chaînes simples au ramifiées. Elles ont été de couleur brunes et de forme irrégulières, souvent douées d'un rostre apicale.	Mycélium septé Microphialides très allongées, solitaires, et macrophialides portées par des conidiophores assez courts et très ramifiés produisant deux types de conidies: Microconidies : très abondantes, ovales, unicellulaires, ou uniseptées, macroconidies: fusiformes, cylindriques, 3 à 5 septes. Chlamydo-spores globuleuses à ovoïdes lisses ou



		les cultures âgés.	très verruqueuses disposées en chaînettes.		verruqueuses.
Origine Des espèces	Lésions cutanées	Coton Papier journal Papier édition	Cuir Coton Papier journal	Allergies respiratoires	Céréales (phyto- pathogène)

*Fs* : *Fusarium solani*; *As* : *Acremonium strictum* ; *Tv* : *Trichoderma viride* ; *An* : *Aspergillus niger* ; *Aa* : *Alternaria alternata*; GEM : milieu glucosé à l'extrait de Malt .

Pour la préparation des extraits éthanoliques et acétoniques nous avons utilisé la même quantité de matière végétale pour chacun (20 g) .Après l'évaporation à sec, nous avons obtenus 5.55 g de matière soutirée avec l'acétone et 4.93 g de matière soutirée avec l'éthanol .Sachant que le solvant acétone / eau soutirait principalement des tannins et le solvant éthanol / eau soutirait plutôt les flavonoïdes et acides phénols (MERKHAM, 1982), nous en avons déduit que l'écorce de *Punica granatum* contanait plus de composés tanniques que de composés flavonoïques .

L'activité antifongique s'est manifestée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques comme le montre la photo 3.



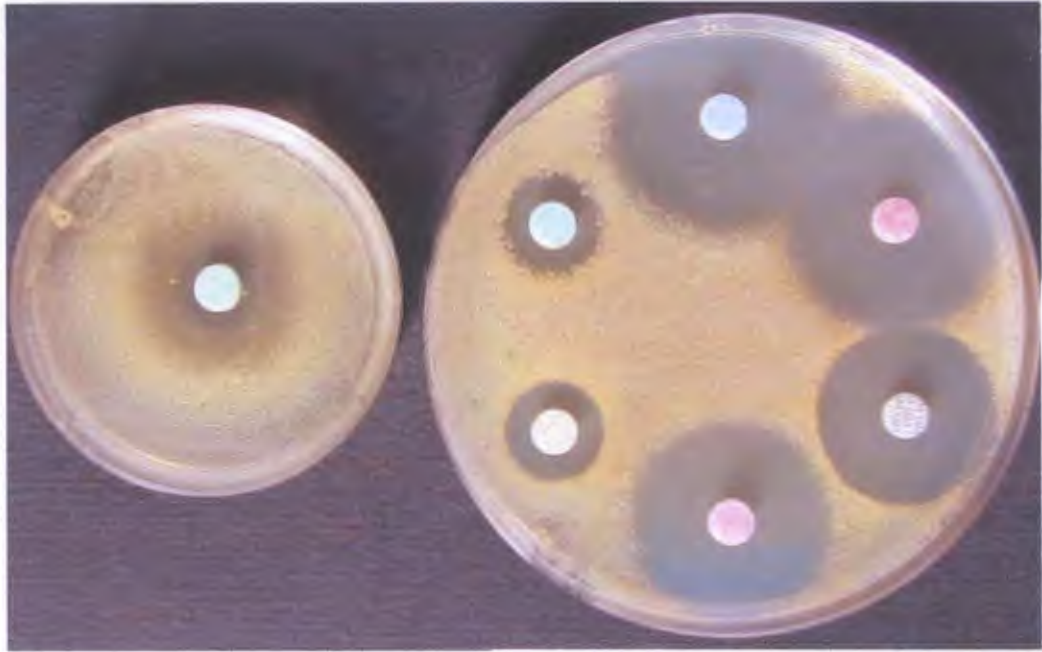
**Photo 3** : Aspect des zones d'inhibition (3).

D'après les résultats du tableau 4, nous avons observé que l'extrait acétonique donnait une plus grande inhibition que l'extrait éthanolique sur la croissance de *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* (photo 2) et *Fusarium solani*. Contrairement à *Acremonium strictum* (photo 3) qui s'est montrée plus sensible à l'extrait éthanolique.

Tableau 4 : Présence ou absence de l'activité antifongique.

Dilutions	Extraits bruts	<i>As</i>	<i>Tv</i>	<i>An</i>	<i>Aa</i>	<i>Fs</i>
1/10	A	+	+	+	+	+
	E	+	+	+	+	+
1/20	A	+	+	+	+	+
	E	±	±	±	±	±
1/30	A	+	-	+	+	+
	E	+	+	-	-	-
1/40	A	-	-	-	-	-
	E	+	+	-	-	-
1/50	A	-	-	-	-	-
	E	+	-	-	-	-
1/60	A	-	-	-	-	-
	E	+	-	-	-	-
1/70	A	-	-	-	-	-
	E	+	-	-	-	-
1/80	A	-	-	-	-	-
	E	±	-	-	-	-
1/90	A	-	-	-	-	-
	E	+	-	-	-	-
1/100	A	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
1/110	A	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
1/120	A	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
1/130	A	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
1/140	A	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-

A : acétonique; E : éthanolique; + : activité antifongique présente; = : activité antifongique absente. As : *Acremonium strictum*, Tv : *Trichoderma viride*, An : *Aspergillus niger*, Aa : *Alternaria alternata*, Fs ; *Fusarium solani*



**Photo 4 :** Aspect des zones d'inhibition avec *Alternaria alternata*.



**Photo 5 :** Aspect des zones d'inhibition avec *Acremonium strictum* (3).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues variaient entre 0.030 mg/ml (solution 1/30); donnée par l'extrait éthanolique contre *Aspergillus niger* et *Fusarium solani*; et 0.0090 mg/ml (solution 1/110); donnée par l'extrait acétonique contre *Trichoderma viride*. Cette dernière valeur de CMI était donc la plus intéressante. De ce fait, nous avons pu dire que *Trichoderma viride* est l'espèce la plus sensible à l'extrait acétonique de *Punica granatum*.

Quand à *Acremonium strictum*, elle était considérée comme étant l'espèce la plus sensible à l'extrait éthanolique de cette plante avec une CMI de 0.0111 mg/ml (solution 1/190) enregistrée pour cet extrait.

Après les affrontements entre les solvants, nous avons obtenu pour l'extrait éthanolique 0.13 g de matière sèche soutirée par l'éther diéthylique, 0.5 g de matière sèche soutirée par l'acétate d'éthyle et 2.68 g contenue dans la phase aqueuse. Cependant, l'évaporation à sec de l'extrait acétonique a donnée les valeurs suivantes 0.20 g, 0.5 g pour la phase acétate d'éthyle et 1.35 g pour la phase aqueuse. Les matières sèches ont été récupérées chacune dans une solution de 1/10 et les résultats de l'activité antifongique ont été cités dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Présence ou absence de l'activité antifongique avec les phases des extraits éthanoliques et acétoniques du départ.

Extrait	Phases	<i>As</i>	<i>Tv</i>	<i>An</i>	<i>Aa</i>	<i>Fs</i>
Extrait acétonique	Ether diéthylique	ND	+	+	ND	+
	Acétate d'éthyle	+	+	-	+	+
	Aqueuse	+	+	ND	+	+
	Témoin	+	+	ND	+	+
Extrait éthanolique	Ether diéthylique	ND	+	-	+	+
	Acétate d'éthyle	ND	-	ND	+	ND
	Aqueuse	ND	+	ND	+	+
	Phases	ND	+	ND	+	+
	Témoin	+	+	+	+	+

ND: non distinct ; + : activité antifongique présente ; - : activité antifongique absente. Les résultats ND sont dus au manque d'extraits, *As* : *Acremonium strictum*, *Tv* : *Trichoderma viride*, *An* : *Aspergillus niger*, *Aa* : *Alternaria alternata*, *Fs* : *Fusarium solani*

*Acremonium strictum* et *Alternaria alternata* n'ont montrées qu'une sensibilité vis-à-vis des phases acétate et aqueuse de l'extrait acétonique.

*T. viride* et *F. solni* avaient la même sensibilité vis-à-vis de toutes les phases de l'extrait acétonique. Elles se sont aussi montrées sensibles aux phases éther diéthlyque et aqueuse de l'extrait éthanolique. Exception faite pour la phase acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique qui n'a donné aucun effet contre *T. viride*.

*Alternaria alternata* a montré une inhibition pour toutes les phases de l'extrait éthanolique.

Pour *Aspergillus niger*, les phases acétate d'éthyle de l'extrait acétonique et l'éther diéthylique de l'extrait éthanolique n'ont donné aucune action. Par contre, l'éther diéthylique de l'extrait acétonique avait effectivement un effet sur cette espèce.

## II. Discussion :

D'après nos résultats, nous supposons que l'écorce de *Punica granatum* contenait plus des tannins que des flavonoïdes, car en effet le poids sec de l'extrait acétonique était supérieur à celui de l'extrait éthanolique alors que nous avons utilisé la même quantité de plante (20 g). Les extraits ont donnés une inhibition contre toutes les moisissures étudiées avec des CMI's allant de 0.030 mg/ml (correspondant à la dilution 1/30) pour l'extrait éthanolique jusqu'à 0.0090 mg/ml (dilution 1/110) pour l'extrait acétonique.

*Acremonium strictum* est la seule espèce qui s'est montrée plus sensible vis-à-vis de l'extrait éthanolique. *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* se sont avérées comme étant plus sensible pour l'extrait acétonique.

Ceci permettait de déduire que ces quatre dernières moisissures étaient plus sensibles aux tannins qu'aux flavonoïdes. Contrairement aux travaux de CRUZ-HERNANDEZ *et al*, (2005) qui ont démontré qu'*Aspergillus niger*, non seulement était une espèce résistante aux tannins, mais en plus avait la capacité d'hydrolyser les tannins condensés et de les utiliser comme source de carbone. Il se pourrait que ces différences de résultats dépendent des souches.

*Acremonium strictum*, quant à elle, était considérée comme étant plus sensible aux flavonoïdes de cette plante. Aucun autre travail antécédent n'a donné des résultats précis concernant cette espèce.

D'après des études antécédentes, les extraits éthanoliques de *Punica granatum* contenaient principalement des flavonoïdes du type lutéoline, quercétine, kaempférol, narigénine (VAN ELSWIJK *et al*, 2004) (1,2).

D'autres études ont montré que cette plante contenait des tannins du type acide gallique, l'acide ellagique (tannins hydrolysable) et des catéchines (MURTHY *et al*, 2004). Ceci expliquait le fait que les extraits acétoniques se sont montrés comme étant les très actifs, conformément aux travaux de ASRES *et al*, (2006) qui a obtenu les mêmes résultats en utilisant la méthode de diffusion sur gélose.

Les CMI's les plus faibles dans cette études ont étaient celles d'*Acremonium strictum* pour l'extrait éthanolique et *T. viride* pour l'extrait acétonique.

D'après nos résultats, nous avons supposé qu'*Alternaria alternata* et *Acremonium strictum* étaient sensibles aux tannins dimériques, tri et polymériques. Par contre les tannins monomériques n'avaient aucune action inhibition sur ces espèces.

Pour *Alternaria alternata* nous avons supposé aussi qu'elle était sensible au flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés. *T. viride* et *F. solani* pouvaient être aussi sensibles aux tannins monomériques, di, tri et polymériques, pour les flavonoïdes aglycones et di triglycosylés.

*Aspergillus niger* était sensible aux tannins monomériques, par contre les tannins dimériques et les aglycones n'avaient aucune action sur cette espèce. De même, les flavonoïdes monoglycosylés n'avaient aucune action inhibition sur *T. viride*.

Donc, d'après nos résultats les extraits acétoniques et éthanoliques de *P. granatum* pourraient être utilisés pour lutter contre les altérations et les maladies causées par les moisissures étudiées. En d'autres termes, ils pourraient avoir un rôle intéressant dans la

production des antifongiques, être utilisés dans le maintien et la protection des textiles et/ou être utilisés dans la fabrication de médicaments antifongiques.

L'activité antifongique des polyphénols s'explique par le fait qu'ils empêchent l'expression des gènes de biosynthèse des protéines membranaires des moisissures (LI *et al*, 2009) ainsi que la formation de certaines enzymes. Cette inhibition est plus souvent connue pour être causée par l'argent. Aussi d'autres études expliquaient l'action des polyphénols par la destruction membranaire (FARIA *et al*, 2006).

*Conclusion*

Cinq espèces fongiques isolées des pathologies humaines, des phytopathologies et des textiles endommagées ont été testées en vue de l'étude de leur comportement vis-à-vis des extraits de *Punica granatum*.

Ces derniers ont montré une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Acremonium strictum*, *T. viride*, *F. solani* avec des CMI's plus ou moins importantes.

*T. viride* s'est avérée comme étant l'espèce la plus sensible à l'extrait acétonique de la plante. *Acremonium strictum*, quant à elle, était la plus sensible à l'extrait éthanolique ; même si elle a montré une forte inhibition contre les phases acétoniques obtenues après les partitions entre solvants. Ces partitions ont permis aussi de connaître les phases des extraits aux quelles chaque moisissure a été sensible.

On peut conclure donc que l'écorce de *P.granatum* renferme des tannins et des flavonoïdes : substances antifongiques intervenants dans la lutte contre les altérations des textiles et les maladies causées par ces espèces.



# Références

- **Adekunle AA, Ikumapayi AM.** 2006. Antifungal property and phytochemical screening of the crude extracts of *Funtumia elastica* and *Mallotus oppositifolius* West Indian Med J : 55(4):158-66.
- **Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY.** 2008. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. Pak J Biol Sci : 11(3):351-8
- **Asres K, Mazumder A, Bucar F.** 2006. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Combretum molle*. Ethiop Med J : 44(3):269-77.
- **Basu A, Penugonda K.** 2009. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. Nutr Rev : 67(1):49-56.
- **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy PH, Larpent JP, Reymond P, Veau P, Sanglier JJ, Vayssier Y.** 1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance. 2<sup>ème</sup> ed. revue et complétée Masson. P : 91,92,93, 95,108,139,144,200,201.
- **Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd. Lavoisier, Paris. P : 1120.
- **Cheruvanky H.** 2004. Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and arteriosclerosis. Unitet Stat Pat : 6(4):733-799.
- **Cruz-Hernández M, Contreras-Esquivel JC, Lara F, Rodríguez R, Aguilar CN.** 2005. Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. Naturforsch : 60(11-12):844-8.
- **Delille L.** 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. ed. Berti P : 94,143,163,173,219.
- **Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES, Scio E.** 2009. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. Bioresour Technol : 100(1):428-33.
- **Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N.** 2006. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. J Agric Food Chem : 22(54-6):2392-7.
- **Gàbor M, Cody V, Middleton E J, Harborne J B, Beretz A, Liss A R.** 1988. Plants Flavonoids in biology and Medicine II; Biochemical, Cellular and Medicinal properties. New York. P : 1-15.
- **Grisebach H.** 1982. Biosynthesis of anthocyanidins. In Markakis P, ed. Anthocyanidins as food colours. New York, USA: Academic Press. P : 69-92.
- **Guingard J.** 1996. Biochimie végétale. Lavoisier, Paris. P : 175-192.
- **Jhonson I.** 1999. antioxydants et anticancéreux. Biofutu. P : 186: 14-15.
- **Johann S , Olivera VL, Pizzalatti MG, Schripsema J, Braz-Filho R, Branco A, Smania JA .** 2007. Antimicrobial activities of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. Peels. Mem Inst Oswaldo Cruz : 102(6):681-5.
- **Hadi M.** 2004. La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade du doctorat en sciences de l'université Louis Pasteur domaine: Pharmacochimie. P : 155.
  
- **Hagerman A.E , L. G. Buttler.** 1981. The specificity of proanthocyanidins-protein interactions. J Biol Chem : 256(44):494-497.
- **Hamliche V.** 1995. Morphologie et systématique botanique. ed. office des publications universitaires. P : 75, 85, 96, 140,142.
- **Harbone J B, Grayer R J.** 1988. The flavonoids, Advances. In: research since 1980. Harborne J B, Chapman and Hall, London. P : 1-20.
- **Heller W, Forkmann G.** 1993. Biosynthesis of flavonoids. In The Flavonoids, Advances in Research Since 1986. Chapman et Hall, London. (Harborne, J.B., eds). P : 399-425.

- **Huntley AL.** 2009. The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: Cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas. J* [Epub ahead of print]
- **Kishore RK, Sudhakar D, Parthasarathy PR.** 2009. Embryo protective effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit extract in adriamycin-induced oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* : 46(1):106-11.
- **Kumar S, Maheshwari KK, Singh V.** 2008. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum L.* seeds in mice *Indian J Exp Biol* : 46(12):811-6.
- **Li Y, Peng Q, Selimi D, Wang Q, Charkowski AO, Chen X, Yang CH.** 2009. The plant phenolic compound p-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system. *Appl Environ Microbiol* : 75(5):1223-8.
- **Manthey JA.** 2004. Fractionation of orange peel phenols in ultrafiltered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels. *J Agric Food Chem* : 15;52(25):7586-92
- **Marfak A.** 2003. Radiolyse gamma des flavonoides, Etude de leur reactive avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges. Spécialité : biphysique. P : 187.
- **Markham KR.** 1982. Techniques of flavonoïdes identification. ed. Academic Press : 6-10.
- **Mattiello T, Trifirò E, Jotti GS, Pulcinelli FM.** 2009. Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. *J Med Food* : 12(2):334-9.
- **Murthy KN, Reddy VK, Veigas JM, Murthy UD.** 2004. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *J Med Food* : 7(2):256-9.
- **Naseri MK, Arabian M, Badavi M, Ahangarpour A.** 2008. Vasorelaxant and hypotensive effects of *Allium cepa* peel hydroalcoholic extract in rat. *Pak J Biol Sci.* 15; 11(12):1569-75.
- **Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA.** 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L. Cv. Cobrançosa*) leaves. *Molecules* : 12(5):1153-62
- **Ranković B, Misić M, Sukdolak S.** 2007..Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Br J Biomed Sci.*; 64(4):143-8.
- **Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K.** 2009. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflamm Allergy Drug Targets* : 8(2):229-35
- **Ray SD, Wong V, Rinkovsky A, Bagohi M, Raje RR, Bagh D.** 2000. Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride induced nephrotoxicity dimethylnitrosamine (DMN) – induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* ; 107 (1-2): 105 – 28.
- **Richter G.** 1993. Métabolisme des végétaux. ed. Lavoisier TEC & DOC. P : 332,333
- **Robins R. J, Rhodes M. J. C, Parr A. J, Walton N. J.** 1990. The biosynthesis of bitter compounds. *Developments in food science* vol : 25, pp: 49-79
- **Romani A, Ieri F, Turchetti B, Mulinacci N, Vincieri FF, Buzzini P.** 2006. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts: *J Pharm Biomed Anal* : 3; 41(2):415-20.
- **Sarni-Manchado P, Cheynier V.** 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. ed. Lavoisier. P : 3, 5,9.

- **Savitri Kumar N, Maduwantha B Wijekoon WM, Kumar V, Nimal Punyasiri PA, Sarath B Abeysinghe I.** 2009. Separation of proanthocyanidins isolated from tea leaves using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 8;1216(19) : 4295-302.
- **Schauenberg P, Ferdinand P.** 2006. Guide des plantes médicinales. ed. delachaux et Niestlé, p : 15,16,17.
- **Seigler SD.** 1998. Plant secondary metabolism. ed. 89-70112 CII' Copyright © by Kluwer Academic Publishers
- **Sivakumaran S, Molan AL, Meagher LP, Kolb B, Foo LY, Lane GA, Attwood GA, Fraser K, Tavendale M.** 2004. Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from *Dorycnium rectum* against rumen bacteria. *Phytochem* : 65(17):2485-97.
- **Stafford H. A.** 1999. Flavonoïds Metabolisme. *J. Agric. Food Chem* : 47 (10), pp 4079-4082.
- **Takahashi T, Kokubo R, SAKAINO M.** 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoides of *Eucalyptus maculata*. *lett App Microbiol* : 39(1):60-4.
- **Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B.** 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* : 160(2):189-95.
- **Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, van der Greef J.** 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochem* : 65(2):233-41.
- **Volpi N.** 2004. Separation of flavonoides and phenolic acids propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 25(12):1872-8.
- **Wichtl M, Anton R.** 2003. Plantes thérapeutiques - Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. ed. Tec et Doc et EMI. P : 310-311.
- **Wichtl M, Anton R.** 1999. Plantes thérapeutiques. ed. Tec et Doc et EMI. P : 5,6,7,8.
- **Wilhelm N.** 1998. Botanique générale. ed. De Boeck université s.a. 10ème édition P : 319.

**Les sites web :**

- (1) : <http://www.plantencyclo.com/>
- (2) : <http://www.wikipedia.org/wiki/>
- (3) : <http://www.nexus.fr/pdf/M51p>

## Sensibilité des moisissures pathogènes et d'altération aux extraits tanniques et flavoniques de *Punica granatum*.

Présenté par : M<sup>elle</sup> HAMIHAM Asma  
M<sup>elle</sup> LAOUAR Hanane  
M<sup>elle</sup> LECHEHEB Fatiha

### Resumé :

Les extraits végétaux ont largement été utilisés par l'homme en médecine traditionnelle pour soigner différentes maladies, et notamment les infectieuses. Dans notre travail, nous nous sommes intéressées aux extraits éthanoliques et acétoniques de *Punica granatum* dont nous avons testé l'activité antifongique contre différentes moisissures néfastes par la méthode de diffusion sur gélose. Ceci dans le but déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices CMI. Des affrontements entre solvants nous ont ensuite permis de connaître le type d'extrait le plus actif. D'après nos résultats, tous les extraits se sont avérés actifs contre les espèces testées. Néanmoins, l'extrait acétonique a été plus actif que l'éthanolique. D'autre part, *Trichoderma viride* s'est avérée comme étant la moisissure plus sensible à nos extraits.

**Mots clés :** *Punica granatum*, extraits, activité antifongique, CMI, tannins, flavonoïdes.

### Abstract :

Vegetal extracts have been widely used by humans in traditional medicine for treating different illnesses, and spatially the infectious ones. In our work, we were interested for the ethanolic and acetonic extracts of *Punica granatum*. We have tested their antifungal activity against different harmful moulds by the diffusion on agar method in order to determinate their minimal inhibitory concentrations MICs. Then, some solvent partitions allowed us to precise the most active extract type. Although our results, all the extracts were active against the tested species. But, the acetonic extract was more active than the ethanolic one. In another part, *Trichoderma viride* was proved as the most sensible mould to our extracts.

**Keywords:** *Punica granatum*, extracts, antifungal activity, MIC, tannins, flavonoids.

### الملخص:

استعمل الإنسان المستخلصات النباتية بكثرة من أجل معالجة الأمراض خاصة منها الأمراض المعدية. في عملنا هذا نخص بالدراسة المستخلصات الايثانولية و الاستونية *Punica granatum* (الرمان). قمنا باختبار النشاط المضاد لخمسة أنواع من فطريات العفن بطريقة الإنتشار على الأغار من أجل تحديد أقل تركيز مثبط. سمحت لنا عملية التوزيع بين المذيبات بمعرفة نوع المستخلص الأكثر فعالية.

من خلال النتائج المحصل عليها يظهر أن جميع المستخلصات لها فعالية على أنواع الفطريات المختبرة. غير أن، المستخلص الاسيتوني أكثر فعالية من المستخلص الايثانولي. ومن جهة أخرى *Trichoderma viride* هي العفن الأكثر حساسية بالنسبة للمستخلصين.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum*، مستخلص، النشاط المضاد للفطريات، CMI، دباغ، فلافونيات.