

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Option : Interactions Micro-organismes, Hôtes et Environnements



THÈSE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Par

Mme. BENSLIMANE Sabria

**Contribution à l'étude de l'effet des extraits bruts des écorces
du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum
cyminum* contre les biofilms à l'origine des infections bucco-
dentaires.**

Soutenue le 18/01/2021 devant le jury:

Président	DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Directrice de thèse	REBAI Ouafa	MCA	Université de Mostaganem
Examineur	MEKHALDI Abdelkader	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	AIT SAADA Djamel	MCA	Université de Mostaganem
Examineur	BEKADA Ahmed Med Ali	Pr	Centre Universitaire de Tissemsilet

Année universitaire : 2020 -2021

Dédicaces

Tout d'abord je tiens à dédier ce travail à la mémoire de ceux qui me sont chers mais qui ne font plus parti de ce monde, mon grand père Vladimir qui aurait été si fière de moi, mes grands parents paternel, ainsi que mon oncle parti si tôt, que dieu leur accorde sa miséricorde.

À mes chers parents, pour tous leurs aides, leurs appuis, leurs dévouements, leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes mes années d'études.

À ma très chère grand-mère Maria, qui m'a toujours soutenu et encouragé à poursuivre mes études, et pour tout ce qu'elle a fait pour moi depuis ma petite enfance.

À mon très cher mari qui m'a toujours soutenu, encouragé et réconforté dans les moments les plus durs, merci pour ta compréhension et ton aide. À mes adorables enfants Mohamed Yanis et Lilia que dieu vous garde près de moi et vous protège.

À ma chère sœur Souria qui m'a toujours encouragé et aidé, à son mari Abdelghani, ainsi qu'à mes adorables neveux Abdelwaheb, Norhane et Lina Maria.

À mes beaux parents, à mes belles sœurs Zineb et Nesrine, à mon beau frère Sofiane à mes neveux Nihel et Sadek Rayane ainsi qu'à la grand-mère Khdidja.

À ma chère Ilhem pour son aide, à sa mère Samira et à ses filles adorée Kawtar, Mokhtaria et Rania.

À mes amies que j'adore Asmaa, Kawtar, Katarina et Zuzanna pour vos encouragements et votre réconfort.

À toute ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines.

Remerciements

En premier lieu, je remercie « Allah » le tout puissant, de m'avoir donné la force, le courage et la patience pour traverser ce long chemin difficile et enfin aboutir au bout de ce travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma directrice de thèse Docteur REBAI Ouafa, pour ses conseils, son soutien, sa disponibilité et sa confiance tout au long de ce travail.

J'exprime mes respectueux remerciements au professeur DJIBAOUI Rachid pour l'aide et les conseils qu'il a pu m'apporter, pour sa générosité et ses encouragements, ainsi que pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Mes remerciements vont également aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail. À monsieur MEKHALDI Abdelkader, professeur à l'université de Mostaganem et directeur du laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien. À monsieur AIT SAADA Djamel Maître de conférence A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et à monsieur BEKADA Ahmed Mohamed Ali Professeur à l'Université de Tissemsilt, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie du jury.

Ma sincère reconnaissance s'adresse à Monsieur ARABI Abed de l'université d'Oum El Bouaghi, pour ces précieux conseils, son aide, sa générosité ainsi que sa disponibilité tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude et ma reconnaissance au professeur DALACHE Fatiha qui a grandement contribué à ma formation durant mes années d'études, pour son aide, ces encouragements, sa générosité et ces précieux conseils, sans elle je ne serais pas là aujourd'hui.

J'adresse un grand merci aux dentistes du centre de santé Izza Abdellah pour leur accueil chaleureux.

Mes remerciements les plus distingués sont orientés éventuellement aux techniciens de laboratoires: Djahira, Amina et Nabil pour leur grande aide, leur disponibilité, leur gentillesse, et leurs rôles dans l'achèvement de ce travail.

Je remercie tous mes anciens collègues Wafae A, Aicha L, Nadia B, Amina Z, Amina B, Hiba C, Imane B, Hakim H, Hicham D, ainsi que les enseignants du laboratoire de Microbiologie et biologie végétale pour les bons moments qu'on a pu partager ensemble, pour leurs conseils et leurs encouragements. À ma collègue B. Asmaa pour tous les moments de joies et de peines qu'on a pu partager.

Mes remerciements vont aussi à l'égard de Monsieur BENCHEHIDA A et Mr DAHLOUM L pour leurs aides dans les analyses statistiques des données recueillies au cours de mon étude.

Un grand merci à tous les professeurs de mon cursus universitaire à l'université de Mostaganem qui ont contribué à ce que je suis aujourd'hui, ainsi qu'à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

BENSÛIMANE Sabria

Résumé

Les communautés microbiennes buccales principalement organisées en biofilm, responsable du développement des caries et des maladies parodontales, présentent une résistance croissante aux antibiotiques, en plus, des inconvénients que présentent les produits utilisés pour réduire et inhiber la plaque dentaire. L'utilisation d'agents antimicrobiens d'origine végétale pourrait servir de traitement alternatif efficace contre les infections buccales. La présente étude visait à évaluer les activités antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm des extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum* contre des micro-organismes responsables d'infections bucco-dentaires.

Les extraits ont été obtenus par macération avec trois différents solvants à raison de 70%: acétone, éthanol et le méthanol. Concernant la grenade, les teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait éthanolique 204.67 ± 15.26 mg EAG/g de matière sèche (MS), 67.67 ± 1.53 mg EQ/g MS respectivement. La teneur en tanin la plus élevée a été observée avec l'extrait acétonique 220 ± 17.32 mg EC/g MS. D'autre part, pour le cumin, la plus grande teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins, a été obtenue avec l'acétone 42 ± 3.46 mg EAG/g MS, 24.49 ± 1.24 mg EQ/g MS et 34.95 ± 8.71 mg EC/g MS respectivement.

L'analyse chromatographique par HPLC menée sur les deux extraits des plantes a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. La pédunculagine, la punigluconine et la punicalagine en tant qu'ellagitanine prédominante ont été identifiées pour l'extrait éthanolique d'écorces de grenade. Concernant l'extrait acétonique de *C. cyminum*, les résultats montrent la présence de l'acide p-coumarique, plusieurs flavonoïdes et plusieurs apigénines.

L'évaluation *in vitro*, de l'activité antioxydante de nos différents extraits, a été réalisée par deux méthodes, à savoir le DPPH et FRAP. Pour le premier test les valeurs les plus élevées de l'activité de piégeage ont été observées avec l'extrait éthanolique de grenade ($IC_{50} = 220 \pm 14$ µg/ml) et l'extrait acétonique de cumin ($IC_{50} = 940 \pm 50$ µg/ml).

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits par la méthode de diffusion des puits dans un milieu gélosé, a montré que l'ensemble possèdent un pouvoir antimicrobien sur toutes les souches Gram+ ainsi que sur les levures, en revanche, les bactéries Gram- se sont montrés moins sensibles envers les extraits de grenades et insensibles aux extraits de cumin. Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrées par les extraits étudiés varient de 0.0125 à 100 mg/ml pour la grenade et de 12.5 à 200 mg/ml pour le cumin.

En outre, dans l'activité antibiofilm, les extraits testés ont montré un pouvoir inhibiteur de la formation de biofilm, et ceci de manière dépendante de la concentration, contre les souches qui ont révélé une sensibilité envers ces extraits dans le test de l'activité antimicrobienne.

Mots clés : *Punica granatum*, *Cuminum cyminum*, extraits phénoliques, biofilm buccal, activité antioxydante, activités antimicrobienne et antibiofilm.

Abstract

The oral microbial communities mainly organized in biofilm, responsible for the development of cavities and periodontal diseases, present an increasing resistance to antibiotics. In addition, the disadvantages of products used to reduce and inhibit dental plaque. The use of antimicrobial agents derived from plants could serve as an effective alternative treatment against oral infections. The present study aimed to evaluate the antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of extracts from the peels of fruit of *Punica granatum* and seeds of *Cuminum cyminum* against microorganisms responsible of oral infections.

The extracts were obtained by maceration with three different solvents at a rate of 70%: acetone, ethanol and methanol. For pomegranate, the highest total polyphenols and flavonoids contents were obtained with the ethanolic extract 204.67 ± 15.26 GAE/g dry weight (DW), 67.67 ± 1.53 mg QE/g DW respectively. The highest tannin content was observed with the acetone extract 220 ± 17.32 mg CE/g DW. On the other hand, for cumin, the greatest content of polyphenols, flavonoids and tannins, was obtained with acetone 42 ± 3.46 mg GAE/g DW, 24.49 ± 1.24 mg EQ/g DW and 34.95 ± 8.71 mg EC/g DW respectively.

The chromatographic analysis by HPLC carried out on the two plant extracts allowed to characterize the main phenolics compounds. Pedunculagin, punigluconin and punicalagin as the predominant ellagitannin have been identified for the ethanolic extract of pomegranate peels. Concerning the acetonic extract of *C. cyminum*, the results show the presence of p-coumaric acid, several flavonoids and several apigenins.

The *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of our different extracts was carried out by two methods, namely DPPH and FRAP. For the first test, the highest values of the scavenging activity were observed with the ethanolic extract of pomegranate (IC₅₀= 220 ± 14 µg/ml) and the acetonic extract of cumin (IC₅₀= 940 ± 50 µg/ml).

The evaluation of the antimicrobial power of the extracts by the agar well diffusion method has shown that all of them have an antimicrobial power against all the Gram + strains as well as on the yeasts, on the other hand, the Gram- bacteria have shown less sensitive to pomegranate extracts and insensitive to cumin extracts. The minimum inhibitory concentration (MIC) values recorded by the studied extracts vary from 0.0125 to 100 mg/ml for pomegranate and from 12.5 to 200 mg/ml for cumin.

In addition, in the antibiofilm activity, the tested extracts showed an inhibitory power of the biofilm formation and this in a concentration dependent manner, against the strains which showed sensitivity towards these extracts in the antimicrobial activity test.

Keywords: *Punica granatum*, *Cuminum cyminum*, phenolic extracts, oral biofilm, antioxidant activity, antimicrobial and antibiofilm activities.

المخلص

تتميز المجتمعات الميكروبية المتواجدة بالفم والمنتظمة بشكل رئيسي في هيئة بيوفيلم، مسؤولة عن تسوس الأسنان وأمراض اللثة، لها مقاومة متزايدة للمضادات الحيوية، بالإضافة إلى ذلك، نظرا للاستخدام السلبي للمنتجات المستخدمة لتقليل وتثبيط ترسبات الأسنان. لهذا يمكن استخدام المضادات الميكروبية ذات الأصل النباتي بمثابة علاج بديل فعال ضد التهابات الفم. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم أنشطة مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات البيوفيلم لمستخلصات لحاء ثمار الرمان *Punica granatum* وبذور الكمون *Cuminum cyminum* ضد الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن التهابات الفم.

تم الحصول على المستخلصات بالنقع باستخدام ثلاث مذيبات مختلفة بنسبة 70% : الأسيتون، الإيثانول والميثانول. فيما يتعلق بالرمان، أعلى محتوى من البوليفينول والفلافونويد قد تحصل عليه باستخدام مستخلص الإيثانول 204.67 ± 15.26 مغ EAG/غ بالوزن الجاف (MS)، 67.67 ± 1.53 مغ EQ/غ MS على التوالي. ولوحظ أعلى محتوى من التانين بمستخلص الأسيتون 220 ± 17.32 مغ EC/غ MS. من ناحية أخرى، بالنسبة للكمون، تم الحصول على أعلى محتوى من البوليفينول والفلافونويد والتانين باستخدام الأسيتون 42 ± 3.46 مغ EAG/غ MS، 24.49 ± 1.24 مغ EQ/غ MS و 34.95 ± 8.71 مغ EC/غ MS على التوالي.

إن التحليل الكروماتوغرافي باستخدام HPLC على كلا مستخلصي النباتين مكن من وصف المركبات الفينولية الرئيسية. *Péduncalagine*، *punigluconine* و *punicalagine* باعتبارها الإيلاجيتانين السائدة لمستخلص الإيثانول من قشر الرمان. فيما يتعلق بمستخلص الأسيتون لبذور الكمون، أظهرت النتائج وجود حمض *p-coumaric*، كما تم الكشف عن العديد من مركبات الفلافونويد والعديد من *apigénines*

تم إجراء التقييم في المختبر لنشاط مضادات الأكسدة لمستخلصاتنا المختلفة بطريقتين، وهما DPPH و FRAP. بالنسبة للإختبار الأول، لوحظت أعلى قيم لنشاط الاضطياح مع المستخلص الإيثانولي للرمان ($220 = IC_{50} \pm 14$ ميكروغرام/مل) ومستخلص الأسيتون للكمون ($940 = IC_{50} \pm 42$ ميكروغرام/مل).

أظهر تقييم القدرة المضادة للميكروبات للمستخلصات بطريقة نشر الأبار في وسط أجار، أن جميع المستخلصات لديها قوة مضادة للميكروبات على جميع سلالات الجرام (+) وكذلك على الخمائر، من ناحية أخرى، أظهرت أن البكتيريا ذات الغرام (-) كانت أقل حساسية لمستخلصات الرمان وغير حساسة لمستخلصات الكمون. تختلف قيم الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) المسجلة بواسطة المستخلصات المدروسة من 0.0125 إلى 100 مغ/مل للرمان ومن 12.5 إلى 200 مغ/مل للكمون.

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت المستخلصات المختبرة قوة تثبيط لتشكيل البيوفيلم متعلقة بالتركيز، ضد السلالات التي أظهرت حساسية تجاه هذه المستخلصات في إختبار النشاط المضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: *Cuminum cyminum*، *Punica granatum*، مستخلصات الفينول، غشاء حيوي عن طريق الفم، النشاط المضاد للأكسدة، الأنشطة المضادة للميكروبات والمضادات للغشاء الحيوي.

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements.....	II
Résumé.....	III
Abstract	IVI
المخلص	V
Table des matières	VI
Liste des tableaux	XII
Liste des figures	XIV
Liste des abréviations	XVIII
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I:

Phytothérapie et polyphénols naturels

1.Généralités sur la phytothérapie	4
2.Les polyphénols.....	5
2.1 Généralités	5
2.2 Classification	6
2.2.1 Polyphénols simples	6
2.2.1.1 Acides phénoliques	6
2.2.1.2 Flavonoïdes	7
2.2.2 Polyphénols complexes	9
2.2.2.1 Tanins	9
2.2.2.2 Lignines.....	10
2.3 Activités biologiques des polyphénols	10
2.3.1 Activité antioxydante.....	10
2.3.2 Activité anti-inflammatoire	11
2.3.3 Activité anticancéreuse.....	11
2.3.4 Action sur la maladie d'Alzheimer.....	12
2.3.5 Activité anti-diabétique	12
2.3.6 Activités antibactérienne, antifongique et antivirale	12
2.3.7 Actions sur les maladies cardiovasculaires	13

Chapitre II : **La grenade et le cumin**

1. La Grenade	14
1.1 Généralités	14
1.2 Classification botanique.....	15
1.3 Description générale du grenadier	16
1.3.1 Les feuilles.....	16
1.3.2 Les fleurs	17
1.3.3 Le fruit	17
1.3.3.1 La baie	17
1.3.3.2 L'écorce du fruit.....	17
1.3.3.3 Les graines	17
1.3.4 Système racinaire.....	18
1.4 Constituants biochimiques de la grenade.....	18
1.5 Application thérapeutique de la grenade.....	19
1.5.1 Action antioxydante de la grenade	19
1.5.2 Action Anticancéreuse.....	20
1.5.3 Pression artérielle	21
1.5.4 Réduction du niveau de cholestérol.....	21
1.5.5 La maladie d'Alzheimer.....	21
1.5.6 Action sur le diabète de type 2	22
1.5.7 Action antimicrobienne	22
2. Le cumin	24
2.1 Généralités	24
2.2 Classification taxonomique.....	24
2.3 Description générale du cumin	25
2.4 Constituants biochimiques du cumin	26
2.5 Application thérapeutique du cumin.....	27
2.5.1 Action stimulante de la digestion	27
2.5.2 Activité antioxydante.....	28
2.5.3 Élimination des insectes	28
2.5.4 Influence cardio-protectrice par des effets hypolipidémiques et hypotenseurs..	28
2.5.5 Effet antidiabétique.....	29
2.5.6 Effets anticancéreux	29
2.5.7 Effets antimicrobiens.....	30

Chapitre III :
Le biofilm buccal

1. Généralités	32
2. Le Biofilm buccal (plaque dentaire)	32
2.1 Etapes de la formation du biofilm	34
2.1.1 Formation de la pellicule exogène acquise (biofilm salivaire)	34
2.1.2 Colonisation bactérienne	35
2.1.2.1 Adhésion réversible	35
2.1.2.2 Adhésion irréversible	35
2.1.3 La coagrégation et interactions bactériennes	36
2.1.4 Maturation du biofilm	36
2.1.5 Détachement cellulaire	37
2.2 Transitions des biofilms buccaux	38
2.2.1 Biofilm supragingival	38
2.2.2 Biofilm sous-gingival	39
3. Biofilms microbiens et maladies buccales et systemiques	40
3.1 Biofilms microbiens et maladies buccales	40
3.1.1 La carie	40
3.1.2 La gingivite	41
3.1.3 La parodontite	42
3.1.4 Candidose buccal	43
3.2 Biofilms microbiens et maladies systemiques	44
4. Interactions bactériennes-fongiques au sein du biofilm buccal	45
5. La résistance du biofilm aux antimicrobiens	46
5.1 La matrice d'exopolysaccharide (EPS)	46
5.2 Le quorum sensing	47
5.3 Transfert de gène au sein du biofilm	48
5.4 Présence de bactéries persistantes	49
5.5 La pompe à efflux	50
6. Agents antibiofilm naturels	51

Partie expérimentale
Chapitre IV :
Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	53
1.1 Récolte du matériel végétal	54
1.2 Extraction des composés phénoliques	55

1.2.1	Préparation des extraits bruts.....	55
1.2.2	Le rendement d'extraction.....	57
1.3	Dosage des composés phénoliques	57
1.3.1	Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)	57
1.3.2	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT).....	58
1.3.3	Détermination des tanins condensés (TC) (proanthocyanidines).....	58
1.4	Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	58
1.5	Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes.....	59
1.5.1	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	59
1.5.2	Réduction du fer (FRAP) (Ferric reducing antioxidant power)	60
2.	Procédés d'études microbiologiques	61
2.1	Prélèvements	61
2.2	Isolement.....	61
2.3	Identification des souches	62
2.3.1	Les souches bactériennes.....	62
2.3.1.1	Caractérisation morphologique des isolats.....	62
2.3.1.2	Identification biochimique	62
2.3.1.3	Identification génotypique des souches bactériennes.....	63
2.3.2	Les souches fongiques	65
2.3.2.1	Examen direct à l'état frais.....	65
2.3.2.2	Test du tube germinatif	65
2.3.2.3	Test de production de chlamydozoospores	66
2.3.2.4	Test de la croissance à 45°C.....	66
2.3.2.5	API Candida	66
2.4	Antibiogramme et Antifongogramme.....	67
2.5	Evaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm	68
2.5.1	La formation de biofilm chez les souches bactériennes	68
2.5.1.1	La méthode du Rouge Congo	68
2.5.1.2	La méthode de crystal violet (en tubes).....	69
2.5.1.2.1	Evaluation de la formation de biofilm en fonction du milieu de culture.....	69
2.5.1.2.2	Evaluation de la formation de biofilm en fonction du temps et des isolats testés.....	71
2.5.2	La formation de biofilm chez les souches fongiques	71
2.6	L'activité antimicrobienne des extraits de plantes contre les pathogènes bucco-dentaires.....	73
2.6.1	L'effet antimicrobien par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des puits)	73

2.6.2	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	74
2.6.3	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)	76
2.7	Effet des extraits végétaux sur la formation de biofilm microbiens	76

Chapitre V : Résultats et discussion

1.	Matériel végétal	78
1.1	Rendement des extraits bruts	78
1.2	Teneurs en polyphénols, flavonoides et proanthocyanidines	79
1.3	Analyses des extraits par HPLC	83
1.4	Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes.....	86
1.4.1	Piégeage du radical libre DPPH	86
1.4.2	Réduction du fer (FRAP).....	91
2.	Isolement et identification des souches microbiennes.....	95
2.1	Isolement et identification des souches bactériennes.....	95
2.1.1	Caractérisation morphologique des isolats	99
2.1.2	Identification biochimique.....	104
2.1.3	Identification génotypique des souches bactériennes.....	105
2.2	Identification des souches fongiques	106
2.2.1	Examen macroscopique	107
2.2.2	Examen microscopique.....	108
2.2.3	Tests d'identification de <i>Candida albicans</i>	108
2.3	Antibiogramme et Antifongigramme.....	112
3.	Evaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm.....	117
3.1	La formation de biofilm chez les souches bactériennes.....	117
3.1.1	La méthode du Rouge Congo	117
3.1.2	Formation de biofilm par la méthode de crystal violet (en tubes).....	119
3.1.2.1	Evaluation de la formation de biofilm en fonction du milieu de culture	119
3.1.2.2	Evaluation de la formation de biofilm en fonction du temps et des isolats testés	122
3.2	La formation de biofilm chez les souches fongiques par la méthode de crystal violet (en tubes)	125
4.	L'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de plantes	127
4.1	L'effet antimicrobien par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des puits)	127
4.2	Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).....	134
4.3	Effet des extraits végétaux sur la formation de biofilms microbiens	140

4.3.1	Effet de l'extrait éthanolique d'écorces de grenade	140
4.3.2	Effet de l'extrait acétonique des graines de cumin.....	144
Conclusion	147
Références bibliographiques	151
Annexes	178
Travaux scientifiques	189

Liste des tableaux

Tableau 1. Effets bénéfiques médicinaux des graines de <i>Cuminum cyminum</i>	31
Tableau 2. Mélange réactionnel de la PCR	64
Tableau 3. Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	68
Tableau 4. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits d'écorces de grenade et des graines de cumin.....	80
Tableau 5. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait éthanolique de l'écorce du fruit de <i>Punica granatum</i>	84
Tableau 6. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait acétonique de <i>Cuminum cyminum</i>	85
Tableau 7. Valeurs de la concentration efficace 50 (CE ₅₀) des extraits d'écorces de grenades, des graines de cumin et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH.....	89
Tableau 8. Valeurs de la concentration efficace 50 (CE ₅₀) des extraits d'écorces de grenades, des graines de cumin et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP.....	94
Tableau 9. Résultats de l'identification phénotypique des isolats	100
Tableau 10. Résultats de l'identification microscopique des isolats.....	102
Tableau 11. Résultats de quelques tests biochimiques.....	104
Tableau 12. Résultats de l'antibiogramme des isolats.....	115
Tableau 13. Résultats de l'antifongigramme des souches de <i>Candida</i>	117
Tableau 14. Activités antimicrobiennes des extraits acétoniques, méthanoliques et éthanoliques d'écorces du fruit de <i>Punica granatum</i> et des graines de <i>Cuminum cyminum</i> exprimées par le diamètre de la zone d'inhibition en mm	130
Tableau 15. CMI, CMB et CMF de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique d'écorces de grenades.....	134

Tableau 16. CMI, CMB et CMF de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique des graines de *Cuminum cyminum*.....136

Tableau 17. Action inhibitrice des solutions d'extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* et des graines de *C. cyminum* chez les souches responsables d'infections bucco-dentaires....
.....137

Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des acides hydroxybenzoïques.....	6
Figure 2. Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.....	7
Figure 3. Squelette de base des flavonoïdes.....	8
Figure 4. Classification et exemple des flavonoïdes et de leurs structures chimiques.....	8
Figure 5. Classification des tanins et exemples de structures.....	9
Figure 6. La grenade et ses différentes parties (A), fleur du grenadier Sefri (B).....	18
Figure 7. Aspects morphologiques du cumin.....	26
Figure 8. Structures chimiques de quelques constituants de <i>Cuminum cyminum</i>	27
Figure 9. Cycle des changements écologiques dans le microbiote buccal qui causent la maladie.....	33
Figure 10. Etapes de la formation de la plaque dentaire.....	38
Figure 11. Déclenchement de la lésion carieuse.....	41
Figure 12. Développement de la gingivite et de la parodontite.....	43
Figure 13. Facteurs impliqués dans la pathogenèse de la candidose buccale.....	44
Figure 14. L'initiation du mécanisme de détection du quorum par rapport à la densité cellulaire.....	48
Figure 15. Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques.....	49
Figure 16. Schéma représentant les 5 familles de transporteurs d'efflux bactériens : RND, SMR, MFS, MATE et ABC.....	51
Figure 17. Diagramme montrant un profil commun de biofilm, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et les stratégies antibiofilm possibles.....	52
Figure 18. Écorces du fruit de <i>Punica granatum</i> et des graines de <i>Cuminum cyminum</i>	53
Figure 19. Le grenadier <i>Punica granatum</i> dans la région de Hassi Mameche.....	54
Figure 20. Carte géographique de la station de récolte de la grenade.....	55
Figure 21. Différentes étapes de préparation des extraits bruts.....	56

Figure 22. Réaction de réduction du radical DPPH par un antioxydant.....	59
Figure 23. Évaluation de la formation de biofilm des souches bactériennes en fonction du milieu de culture.....	70
Figure 24. Évaluation de la formation de biofilm des souches fongiques.....	72
Figure 25. Détermination de la CMI par microdilution.....	75
Figure 26. Etapes du protocole de la formation de biofilm en tubes.....	77
Figure 27. Rendements d'extraction (%) obtenus pour les différents extraits d'écorces du fruit de <i>Punica granatum</i> et des graines de <i>Cuminum cyminum</i>	78
Figure 28. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.01 à 0.05 mg/ml) pour le dosage des phénols totaux.....	79
Figure 29. Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.00125 à 0.04 mg/ml) pour le dosage des flavonoides.....	79
Figure 30. Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.025 à 0.4 mg/ml) pour le dosage des tanins	80
Figure 31. Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de l'écorce du fruit de <i>Punica granatum</i> enregistré à 280 nm.....	83
Figure 32. Profil chromatographique de l'extrait acétonique de <i>Cuminum cyminum</i>	85
Figure 33. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique des écorces de grenades.....	87
Figure 34. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique de <i>Cuminum cyminum</i>	87
Figure 35. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.....	88
Figure 36. Pouvoir réducteur des extraits d'écorces du fruit de <i>Punica granatum</i>	91
Figure 37. Pouvoir réducteur des extraits de <i>Cuminum cyminum</i>	92
Figure 38. Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	92
Figure 39. Répartition de différentes souches bactériennes isolées	95
Figure 40. Aspect macroscopique de <i>Streptococcus mutans</i> sur M17.....	100
Figure 41. Aspect macroscopique d' <i>Enterococcus faecalis</i> sur M17.....	100

Figure 42. Aspect macroscopique de <i>Gemella morbillorum</i> sur M17	101
Figure 43. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sur gélose nutritive (A) et Chapman (B)	101
Figure 44. Aspect macroscopique de <i>Klebsiella oxytoca</i> sur la gélose nutritive	101
Figure 45. Aspect macroscopique d' <i>Enterobacter bugandensis</i> sur Mac conkey agar	101
Figure 46. Aspects microscopiques des différentes souches bactériennes	103
Figure 47. Résultats des tests biochimiques des galeries API 20 Strep.....	105
Figure 48. Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification de l'ADN 16s de nos 4 isolats bactériens (2-5).....	106
Figure 49. Répartition des différentes espèces de <i>Candida</i> isolés.....	107
Figure 50. Aspect macroscopique de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231(A), <i>Candida albicans</i> 4 (B) et <i>Candida albicans</i> 3(C) sur gélose Sabrouraud.....	107
Figure 51. Aspects microscopique des souches de <i>Candida albicans</i>	108
Figure 52. Différents aspects morphologiques sous microscope des levures du genre <i>Candida</i>	110
Figure 53. Test d'identification des souches de <i>Candida</i> par la galerie API Candida	111
Figure 54. Résultats de l'antibiogramme de <i>Streptococcus mutans</i>	113
Figure 55. Résultats de l'antibiogramme de <i>Klebsiella oxytoca</i>	113
Figure 56. Résultats de l'antibiogramme d' <i>Enterobacter bugandensis</i>	113
Figure 57. Résultats de l'antibiogramme de <i>Gemella morbillorum</i>	114
Figure 58. Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	114
Figure 59. Résultats de l'antibiogramme d' <i>Enterococcus faecalis</i>	114
Figure 60. Résultats de l'antifongigamme de <i>Candida albicans</i> 3 (A) et <i>Candida albicans</i> 4 (B).....	116
Figure 61. Production de slime chez les isolats bactériens sur milieu Rouge Congo Agar	118
Figure 62. Evaluation de la formation de biofilm en fonction des différents milieux de culture	120

Figure 63. La formation de biofilm chez nos souches bactériennes à 24 et 48 heures	122
Figure 64. Evaluation de la formation de biofilm pour nos 6 souches bactériennes à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 24 et 48 h)	123
Figure 65. Formation de biofilm chez nos souches fongiques à 24 et 48 heures	125
Figure 66. Evaluation de la formation de biofilm pour les trois souches fongiques à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 24 et 48 h).....	126
Figure 67. Activité antimicrobienne des extraits d'écorces du fruit de <i>P. granatum</i> et des graines de <i>C. cuminum</i>	129
Figure 68. L'effet de l'EEG éthanolique sur la formation des biofilms microbiens.....	141
Figure 69. L'effet de l'extrait acétonique de cumin sur la formation des biofilms microbiens	145

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection	MCV : Maladies cardiovasculaires
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	MH : Mueller Hinton
BN : Bouillon nutritif	MS : Matière sèche
CE50 : Concentration efficace 50	Nacl : Chlorure de sodium
CLSI : Clinical and laboratory standards institute	OMS : Organisation mondiale de la santé
CRA : Congo Red Agar	PBS : tampon phosphate salin
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	PCR : Polymerase Chain Reaction
EAG : Equivalent acide gallique	PEA : Pellicule exogène acquise
EC : Equivalent catéchine	PIA : Polysaccharide intercellular adhesin
EEG : Extrait d'écorces de grenades	PPT : Polyphénols totaux
EPS : Exopolysaccharides	QS : Quorum sensing (détection de quorum)
EQ : Equivalent quercetine	RCA : Rouge Congo Agar
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	SDA : Sabouraud dextrose agar
Fe⁺² : Fer ferreux	TC : Tanins condensés
Fe⁺³ : Fer ferrique	Tr/min : Tour/minute
FRAP : Réduction du fer	TSA : trypticase soy agar
FVT : Flavonoïdes totaux	TSB : Tryptic soy broth
GTF : Glycosyltransférases	UFC : Unité formant des colonies
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance	UV : Ultra Violet
MA : Maladie d'Alzheimer	VP : Vogue proskauer
	YPD : Yeast Peptone Dextrose

Introduction

Introduction

La cavité buccale est un écosystème riche avec une myriade de micro-organismes multi-espèces dotés de relations complexes avec l'hôte humain. La plupart des organismes ne peuvent se maintenir dans la cavité buccale que lorsqu'ils adhèrent aux tissus durs ou mous où se forme un biofilm (**Zawadzki et al., 2016 ; Takane et al., 2018**). Les biofilms sont des consortiums de micro-organismes qui peuvent se former sur diverses surfaces, notamment les dents et les dispositifs médicaux oraux. La formation d'un biofilm est un processus réalisé en plusieurs étapes dans lequel les cellules microbiennes adhèrent de manière réversible à la surface, suivi de la production d'une matrice d'exopolysaccharide qui se traduit par un attachement irréversible (**Coenye et al., 2008**). Il a déjà été confirmé qu'il existe des différences substantielles entre les bactéries planctoniques et celles vivants en biofilm qui joue un rôle important dans la santé bucco-dentaire. Les cellules individuelles et leurs micro-colonies créant un biofilm restent dans une homéostasie labile, simultanément, l'activité du système immunitaire humain inhibe la multiplication du microbiote. Lorsqu'un biofilm buccal s'accumule à la surface de la dent à cause de facteurs environnementaux et héréditaires, la pathogénicité augmente et une maladie buccale peut se manifester par la suite (**Kim et al., 2016 ; Zawadzki et al., 2016**).

La tolérance du biofilm aux agressions extérieures est une de ses caractéristiques les plus remarquables. Par rapport à des bactéries cultivées en milieu liquide, on observe une survie des biofilms bactériens à des doses d'antibiotiques allant jusqu'à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI), même si individuellement les bactéries qui les composent sont sensibles aux antibiotiques, le problème est bien sûr amplifié si un biofilm est composé de bactéries résistantes (**Lebeaux et Ghigo., 2012**). Il y a eu une incidence croissante de résistances multiples chez les micro-organismes pathogènes humains ces dernières années, en grande partie en raison de l'utilisation aveugle de médicaments antimicrobiens commerciaux couramment utilisés dans le traitement des maladies infectieuses, également leur déclenchement d'effets secondaires gastro-intestinaux et les réactions allergiques. Cela a contraint les scientifiques à rechercher de nouvelles substances antimicrobiennes et antibiofilm à partir de diverses sources comme les plantes médicinales (**Selvamohan et al., 2012; Seminario-Amez et al., 2017; Al- Nowihi et al., 2020**). La nature est une source d'agents médicaux depuis des temps immémoriaux. Il est clair que le règne végétal recèle une source inépuisable de principes actifs inestimables dans la gestion de nombreuses maladies (**Parekh et Chanda, 2007 ; Kaur et Mondal, 2014**).

L'utilisation d'extraits bruts de parties de plantes et de composés phytochimiques, de propriétés antimicrobiennes connues, peut être d'une grande importance dans les applications thérapeutiques. Ces dernières années, un certain nombre d'études ont été menées dans divers pays pour prouver une telle efficacité. De nombreuses plantes ont été utilisées en raison de leurs caractéristiques antimicrobiennes, qui sont dues aux métabolites secondaires synthétisés par ces dernières. Ces produits sont connus par leurs substances actives comme les composés phénoliques. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur une telle activité des plantes médicinales et sur les 4 000 000 espèces végétales sur terre, seul un petit nombre a été étudié pour leurs activités antimicrobiennes (**Selvamohan et al., 2012**).

Parmi ces plantes médicinales se trouve le grenadier (*Punica granatum*), le nom de son fruit la grenade, dérive du latin pōmum "pomme" et grānātum "à graines". Elle est originaire d'Iran et du nord-est de la Turquie et est cultivée dans tout le Moyen-Orient, l'Asie du Sud et la région méditerranéenne depuis plusieurs millénaires. Elle est également largement cultivée en Chine du Sud et en Asie du Sud-Est (**Khan et al., 2017**). De nombreux constituants phytochimiques sont présents dans différentes parties de la plante de *Punica granatum*, ce qui la rend importante sur le plan médical (**Kumar et al., 2018**). Dans plusieurs études, il a été constaté que les extraits de grenade ont de nombreux effets potentiels, notamment antibactériens, antifongiques, antiviraux, antioxydants, antimutagène, cytotoxique, hypoglycémique, hépatoprotectrice, et anti-inflammatoire (**Arun and Singh, 2012 ; AL-Saeed et al., 2015; Reguieg and Hammadi, 2017 ; Nozohour et al., 2018**).

Le *Cuminum cyminum* (cumin) est une plante aromatique de la famille des Apiacées, qui est considéré comme une épice à graines les plus anciennes et les plus appréciées au monde après le poivre noir (**Belal et al., 2017**). Il est utilisé pour aromatiser de nombreuses cuisines, en particulier les cuisines d'Asie du Sud, d'Afrique du Nord et d'Amérique latine, et également dans l'élaboration des parfums et des préparations médicales telles que les dentifrices, les bains de bouche et les savons (**Saeed et al., 2016**). Le cumin est un réservoir de nombreux composés bioactifs ayant diverses applications thérapeutiques. Il améliore l'appétit, la perception gustative, la digestion, la vision, la force et la lactation. Il est également utilisé dans le traitement de la fièvre, de la diarrhée, des vomissements, de la distension abdominale, de l'œdème et des troubles puerpéraux (**Pandey et al., 2015**).

En raison de l'importance de ces deux plantes, nous avons mené le présent travail afin d'identifier les composants bioactifs de ces plantes et d'étudier leur efficacité *in vitro* contre les bactéries et les levures qui provoquent diverses infections bucco-dentaires.

Le manuscrit est scindé en trois parties essentielles, la première partie consiste en une étude bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres, le premier chapitre comprend la phytothérapie et polyphénols naturels, le deuxième est consacré à la description botanique des deux plantes étudiées à savoir la grenade et le cumin, tandis que le troisième rapporte le biofilm buccal, il aborde les étapes de sa formation, les types de biofilms oraux, ainsi que les pathologies bucco-dentaires pouvant toucher l'homme et la résistance des biofilms aux antimicrobiens.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, où on y aborde les étapes suivantes :

- Préparation des extraits bruts à partir des plantes choisies à savoir les écorces du fruit de *Punica granatum* et les graines de *Cuminum cyminum*, et ceci en utilisant trois différents solvants pour la macération (acétone, éthanol et le méthanol).
- Détermination du rendement d'extraction et des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et proanthocyanidines.
- Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes par la technique de piégeage du radical libre (DPPH) et par la réduction du fer (FRAP).
- Isolement et identification des souches bactériennes et fongiques présentes dans la cavité buccale et à l'origine des infections bucco-dentaires.
- Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques et antifongiques pour les bactéries et les levures respectivement.
- Evaluation de la formation de biofilm chez les souches bactériennes et les souches fongiques.
- Evaluation de l'effet antimicrobien des extraits des deux plantes par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des puits) et par la détermination de la CMI, CMB et CMF.
- Effet des extraits d'écorces de *P. granatum* et des graines de *C. cyminum* sur la formation de biofilm microbiens.

La dernière partie consiste en l'interprétation et la discussion des résultats. Le manuscrit est achevé par une conclusion ainsi que des perspectives

Partie
bibliographique

Chapitre I:
Phytothérapie et
polyphénols naturels

Partie bibliographique

Chapitre I: Phytothérapie et polyphénols naturels

1. Généralités sur la phytothérapie

Depuis des siècles les plantes sont utilisées par l'ensemble des civilisations du monde entier pour leurs vertus nutritives mais aussi curatives. Encore aujourd'hui, de nombreuses médecines traditionnelles reposent sur l'utilisation des plantes et l'OMS estime que 70 % de la population mondiale les utilise encore de façon prédominante pour leurs propriétés thérapeutiques. En effet, on remarque que tout au long de l'histoire de la médecine la phytothérapie s'est imposée comme un atout essentiel. Ainsi des plantes ont été retrouvées dans une sépulture préhistorique de plus de 60 000 ans (**Pellas, 2017**). Le médecin français Henri Leclerc (1870–1955) a transformé l'empirisme ordinaire en études cliniques. Il utilise pour la première fois le terme «phytothérapie» en 1913 et publie divers numéros du «Précis de phytothérapie», le premier en 1922. À la suite des essais cliniques, il introduit un grand nombre de plantes médicinales dans la thérapie (**Petkova et al., 2019**). Au début du 19^e siècle, les progrès de la chimie et de la pharmacologie, ont permis d'isoler les premières molécules au laboratoire. Les plantes produisent une multitude de substances qui affectent leur métabolisme, leur défense, leur adaptation à leur environnement et même la compétition entre espèces (**Baracat et al., 2018**).

La recherche de nouveaux agents pharmacologiquement actifs a conduit à la découverte de nombreux médicaments cliniquement utiles qui jouent un rôle fondamental dans le traitement des maladies humaines (**Atanasov et al., 2015**). De plus en plus de recherches de nouveaux produits phytochimiques sont effectuées, qui pourraient être développés comme antimicrobiens utiles pour le traitement des maladies infectieuses. L'abondance des plantes médicinales dans la nature ainsi que les connaissances traditionnelles, améliorent la compréhension des propriétés, de la sécurité et de l'efficacité des plantes médicinales (**Shanmugapriya et Thayumanavan, 2014**). Une large gamme de parties de plantes médicinales possède des propriétés thérapeutiques variées. Les différentes parties utilisées sont la racine, la tige, la fleur, le fruit, les exsudats de brindilles. Les plantes médicinales ont une grande capacité de synthétiser des substances aromatiques, dont la plupart sont des phénols ou leurs dérivés substitués par l'oxygène, dont la majorité sont des métabolites secondaires, récemment 12 000 agents d'origine végétale ont été isolés. Beaucoup

de ces substances servent de moyens de défense des plantes contre l'invasion des micro-organismes, des insectes et des herbivores. Les principaux groupes de composés phytochimiques antimicrobiens peuvent être divisés en plusieurs catégories et qui comprennent les alcaloïdes, les composés phénoliques et les composés terpéniques (**Saxena, 2012 ; Jahanban-Esfahlan *et al.*, 2019**).

2. Les polyphénols

2.1 Généralités

Les plantes sont des organismes sessiles, pour cela ils ont développé de nombreux mécanismes pour s'adapter aux changements qui surviennent dans leurs conditions de croissance fluctuantes, afin de permettre une flexibilité fonctionnelle sous l'influence de facteurs environnementaux, sans affecter les processus physiologiques cellulaires et de développement en produisant un nombre de métabolites secondaires, qui jouent différents rôles en réponse à l'évolution de l'environnement, de la croissance et du développement (**Isah, 2019**). Parmi ces métabolites on trouve les composés phénoliques, qui sont des molécules spécifiques du règne végétal. Ils se caractérisent par la présence d'au moins un noyau aromatique, auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...), selon leur configuration chimique, les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes (acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les lignines) (**Abbas *et al.*, 2017**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Ils représentent les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation et les principales sources sont les fruits, légumes, céréales, olives, légumineuses sèches, chocolat et les boissons (café, thé, vin) (**D'Archivio *et al.*, 2007 ; Benhammou, 2011**). Sur la base de la recommandation de 5 portions/jour de fruits et légumes par les centres de contrôle et de prévention des maladies, une personne avec une alimentation riche en fruits et légumes peut consommer un ou plusieurs grammes par jour de polyphénols. Du fait de l'importance de ces derniers dans notre alimentation, il est hautement souhaitable de comprendre leurs fonctions biologiques et modes d'activités (**Perron et Brumaghim, 2009**).

Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, en effet une accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones avoisinantes a été observée dans le cas des blessures et de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre. De plus, les phénols auraient également un

rôle dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la floraison, la tubérisation et la dormance des bourgeons. D'autres propriétés leurs sont attribuées tels que leurs effets protecteurs contre les rayonnements UV, les insectes, leur rôle dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur et enfin leur pouvoir antifongique et antibactérien (Benhammou, 2011 ; Shehu *et al.*, 2016).

2.2 Classification

2.2.1 Polyphénols simples

2.2.1.1 Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les acides phénoliques se trouvent en abondance dans les aliments et sont divisés en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. La teneur en acide hydroxybenzoïque des plantes comestibles est généralement plus faible par rapport aux acides hydroxycinnamiques, communément appelés phénylpropanoïdes, qui sont plus courants (Bruneton, 2008 ; Pascal *et al.*, 2018).

- **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) :** Ces acides sont très communs, ils sont soit sous forme libre soit sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides. On les trouve notamment dans les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon, dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (Achat, 2013). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans la **Figure 1**.

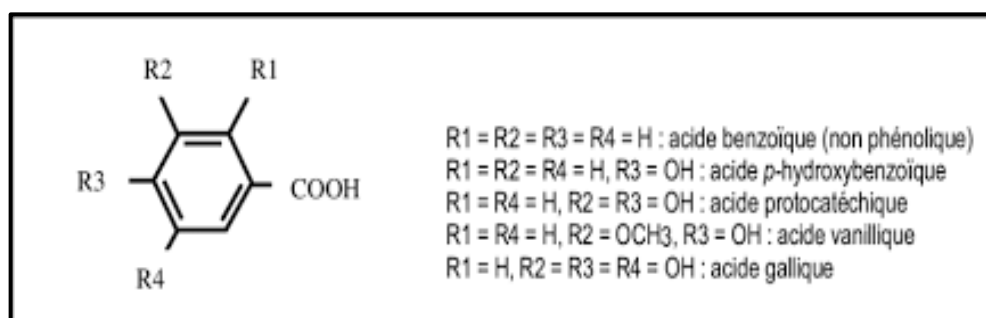


Figure 1. Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (Achat, 2013).

- **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3) :** Ces composés sont très répandus. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique **Figure 2 (Achat, 2013).**

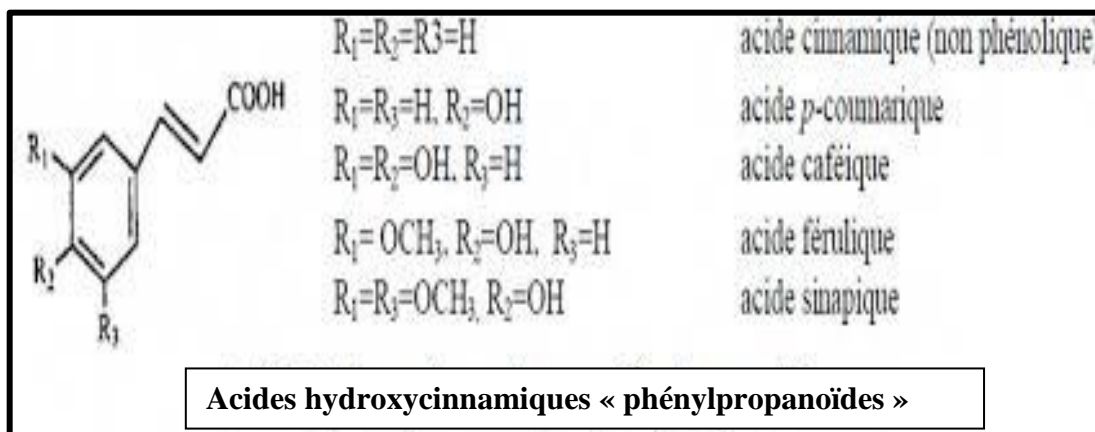


Figure 2. Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Amaechina *et al.*, 2007).

2.2.1.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe de polyphénols le plus étudié. Un grand nombre de flavonoïdes sont responsables des couleurs attirantes des fleurs, des fruits et des feuilles, à ce jour plus de 4000 variétés ont été identifiées. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Figure 3**) (Dacosta, 2003 ; Pandey et Rizvi, 2009). Au sein de chaque groupe, il ya des différences du nombre et de la disposition des groupes hydroxyles et de leur degré d'alkylation et/ou de glycosylation. Le squelette d'hydrocarbure C15 (séquence C6-C3-C6) des flavonoïdes est la base de plusieurs milliers de molécules qui sont regroupées en différentes classes en fonction de leur degré d'oxydation. En fonction des variations du type d'hétérocycle impliqué, les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs sous-classes: flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, chalcones, flavanols, et l'anthocyanes (Hossain *et al.*, 2016 ; Pascal *et al.*, 2018) (**Figure 4**). Parmi ces différentes classes, les flavones et les flavonols sont les plus répandus et structurellement diverses (Harborne *et al.*, 1999).

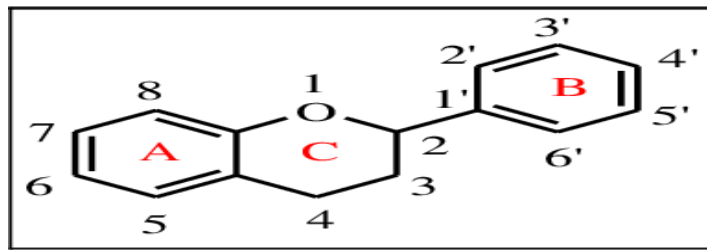


Figure 3. Squelette de base des flavonoïdes (Achat, 2013).

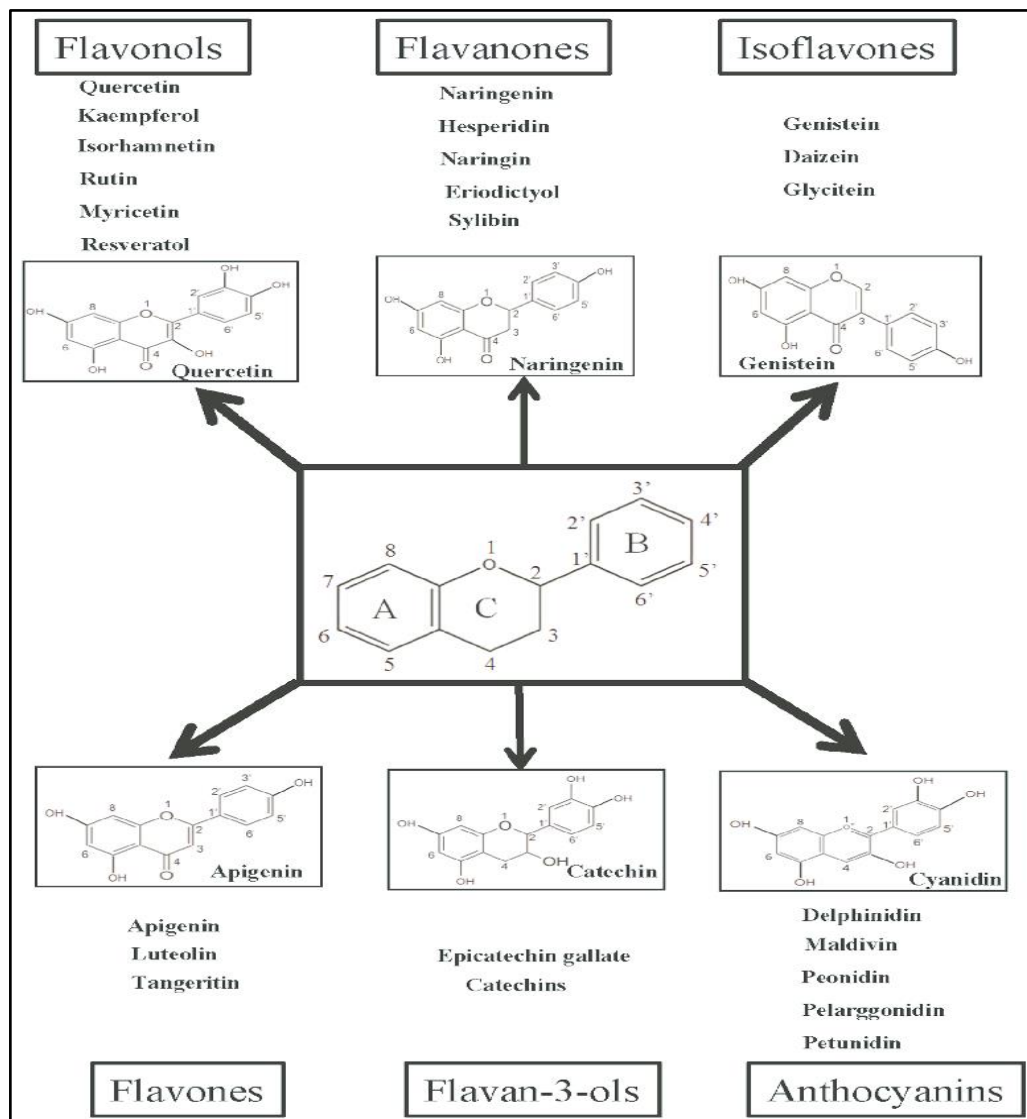


Figure 4. Classification et exemples des flavonoïdes et de leurs structures chimiques (Hossain *et al.*, 2016).

2.2.2 Polyphénols complexes

2.2.2.1 Tanins

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, on peut les trouver dans divers organes tel que l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines, ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées (**Boudjouref, 2011**). Ils sont solubles dans l'eau, et ont la capacité de se lier aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former des complexes stables. Leurs poids moléculaires sont compris entre 500 et 3000 Da d'où leurs formes volumineuses (**Moufida, 2006**).

Les tanins sont des molécules complexes, leur classification se fait selon leurs teneurs en sucres, degrés de polymérisation et d'estérification, ils sont divisés en trois groupes: tanins condensés, formés du monomère flavan-3-ol ou du flavan-3,4-diol, tanins hydrolysables qui ont un noyau de sucre lié par estérification à l'acide gallique (gallotannins) ou à l'acide ellagique (ellagitannins) et tanins complexes ou catéchine- gallate, qui partagent les propriétés des tanins hydrolysables et condensés (**Aguilera-Carbo et al., 2008 ; Bendjabeur, 2012**) (**Figure 5**)

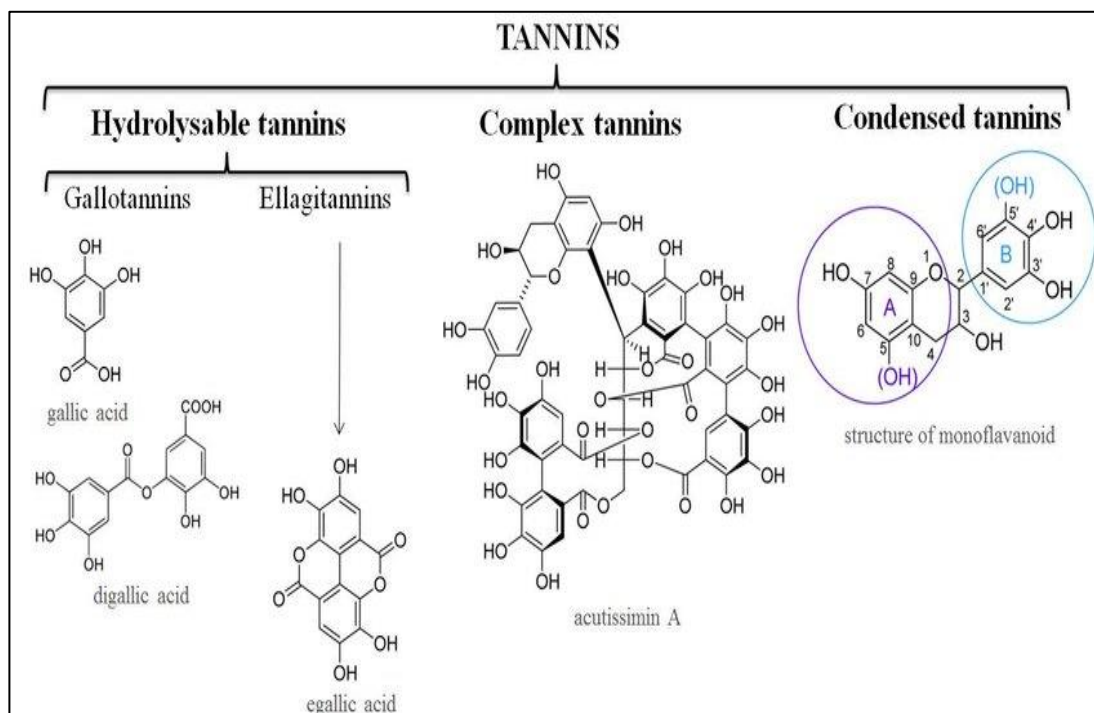


Figure 5. Classification des tanins et exemples de structures (**Delgado- Sánchez, 2017**).

2.2.2.2 Lignines

La lignine est considérée comme le polymère aromatique le plus abondant de la nature. Les lignines ont un haut poids moléculaires, qui avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, contribuent à former la paroi des cellules végétales. Ils ont une structure phénolique tridimensionnelle hautement ramifiée composée d'unités phényl-propane telles que l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Comme la cellulose, la lignine est également insoluble dans les solutions aqueuses (**Bendjabeur, 2012 ; Mudgilet Barak., 2019**). Elles entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes (**El Gharras, 2009**).

2.3 Activités biologiques des polyphénols

Les plantes médicinales jouent un rôle important dans le traitement des maladies. L'Organisation mondiale de la santé a conseillé et a exhorté les pays en développement à utiliser leurs ressources en plantes médicinales et d'autres systèmes de médecine traditionnelle pour les soins primaires. La phytothérapie est également utilisée en pays développés et ceci à cause des effets secondaires moindres des phytomédicaments par rapport aux médicaments de synthèse modernes, leur moindre coût, ainsi que leurs efficacités (**Olaokun et al., 2017**).

2.3.1 Activité antioxydante

Les polyphénols naturels constituent le plus grand groupe de composés phytochimiques, ces composés ont attiré de plus en plus d'attention en tant qu'agents potentiels pour la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif. En conditions physiologiques, le dioxygène produit au niveau des mitochondries des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont toxiques pour l'intégralité de la cellule. En effet, les (ERO) jouent un rôle important dans de nombreuses maladies, telles que les maladies cardiovasculaires (tel que l'athérosclérose), le cancer, la carcinogenèse, les maladies neurodégénératives (tel que la maladie d'Alzheimer), et le diabète (**Quideau et al., 2011 ; Li et al., 2014**). Ces polyphénols peuvent avoir des effets anti-oxydants par plusieurs voies différentes, y compris l'inhibition directe des espèces réactives de l'oxygène, la chélation des ions métalliques et l'induction de gènes antioxydants (**Oktyabrsky et al., 2009 ; Ghnimi, 2015**).

2.3.2 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse physiopathologique déclenchée par des lésions des tissus vivants résultant d'infections bactériennes, virales et fongiques; agents physiques; et une réponse immunitaire déficiente, elle se caractérise par de la chaleur, des rougeurs, des douleurs, un gonflement et une fonction perturbée des organes. Depuis l'antiquité, les troubles inflammatoires sont traités avec des plantes et des formulations d'origine végétale. Au cours des deux dernières décennies, une panoplie de preuves a émergé indiquant l'intérêt potentiel des métabolites secondaires pour des interventions thérapeutiques dans plusieurs maladies inflammatoires. Le continent africain est richement doté de diverses plantes médicinales aux activités anti-inflammatoires, qui se sont révélées efficaces dans le traitement des affections inflammatoires en médecine traditionnelle. Un certain nombre d'études ont révélé la capacité d'extraits végétaux ou de métabolites secondaires à contrôler les niveaux de diverses cytokines inflammatoires ou médiateurs inflammatoires, y compris IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , NF- κ B, NO, iNOS, COX-2 et 5-LO (Okoli *et al.*, 2003 ; Napagoda *et al.*, 2018 ; Oguntibeju *et al.*, 2018).

De nombreuses études ont démontré le pouvoir anti-inflammatoire des flavonoïdes, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes inhibent la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Certaines kinases (PKC, la PI3kinase et tyrosine kinases) impliquées dans la réponse inflammatoire sont aussi affectées par les flavonoïdes (Ferradji, 2011).

2.3.3 Activité anticancéreuse

Des études épidémiologiques ont suggéré qu'une consommation élevée de fruits et légumes (> 400 g/j) peut réduire le risque de cancer de $\geq 20\%$. Le régime méditerranéen est riche en pulpe et en jus de fruits, et l'apport élevé associé en fibres, en antioxydants et en composés polyphénoliques réduit le risque de cancer (Koolaji *et al.*, 2020). De nombreuses études *in vitro*, ont démontré les propriétés anticancéreuses des polyphénols, en utilisant des cultures cellulaires cancéreuses ou des animaux prétraités par des réactifs chimiques carcinogènes. En revanche, les données sur l'effet des polyphénols vis-à-vis du cancer humain sont plus disparates. Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés : activité oestrogénique ou antioestrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention du stress oxydant, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire (Achat, 2013).

2.3.4 Action sur la maladie d'Alzheimer

Le pouvoir inhibiteur des polyphénols et en particulier des flavonoïdes tels que les xanthones, la quercétine, la gossypétine, la myricétine et l'epicatechin-3-gallate, a été prouvé contre l'acétylcholinestérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. L'inhibition de l'AChE va conduire à la correction du déficit de l'acétylcholine et l'amélioration de son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du niveau de l'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (**Heinrich et Theoh, 2004 ; Ghnimi, 2015**).

2.3.5 Activité anti-diabétique

Les glucides contenus dans les aliments ou les repas sont les principales sources d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie chez les diabétiques. Les polyphénols alimentaires ont un potentiel de contrôle de l'hyperglycémie très intéressant. Les effets alimentaires des polyphénols sont la protection des cellules pancréatiques contre la toxicité du glucose, inhibition de la digestion de l'amidon par inhibition des enzymes de digestion, amélioration de la résistance à l'insuline et inhibition de la formation de produits finaux de glycation avancée (**Rasines-Perea et Teissedre, 2017**).

L' α -amylase pancréatique, est une enzyme clé dans le système digestif et catalyse l'étape initiale d'hydrolyse de l'amidon en maltose et en glucose ce qui conduit à l'élévation de l'hyperglycémie post-prandiale. **Ponnusamy et al. (2010)** ont étudié des plantes médicinales antidiabétiques pour leur effet inhibiteur de l'amylase pancréatique humaine *in vitro*, et ont constaté que cette dernière abaissait les taux d'hyperglycémie post-prandiale et ceci par le contrôle de la dégradation de l'amidon. Leur mode d'action était l'inhibition de l' α -amylase pancréatique, ce qui a réduit la vitesse d'hydrolyse de l'amidon conduisant ainsi à une baisse des taux de glucose (**Gajera et Hirpara, 2018**).

2.3.6 Activités antibactérienne, antifongique et antivirale

Les composés phénoliques jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions bactériennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons et les virus. Ces propriétés antimicrobiennes trouvent de nombreuses applications en médecine humaine il y a un intérêt croissant dans ce sujet, les polyphénols végétaux pourraient représenter une source de nouveaux agents anti-infectieux contre les agents pathogènes humains résistants aux antibiotiques (**Ferrazzano, 2011 ; Rezaire, 2012**).

Des études récentes ont montré une importante activité antibactérienne des polyphénols, ces derniers présentent deux mécanismes d'actions, l'un consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique chez les bactéries et l'autre provoque l'endommagement des membranes cellulaires de ces dernières. Les polyphénols présentent également une activité antiviral et en particulier anti VIH (**Liu *et al.*, 2005 ; Ghnimi, 2015**). Les composés, appartenant aux acides phénoliques, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféïques. Ils sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus (**Rezaire, 2012**).

2.3.7 Actions sur les maladies cardiovasculaires

Plusieurs études ont évalué le rôle des flavonoïdes dans la prévention des maladies cardiovasculaires (MCV) et ceci en estimant leur effet sur des biomarqueurs associés au risque de MCV, sur la pression sanguine, le cholestérol sanguin, la fonction endothéliale, la rigidité artérielle et l'agrégation plaquettaire. Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sur la santé cardiovasculaire ont souvent été référés aux flavonoïdes en général et en particulier aux flavonols (**Perez-Vizcaino et Duarte., 2010**).

Une méta-analyse de 133 essais cliniques sur les effets des aliments ou extraits riches en polyphénols sur le risque de MCV a permis d'obtenir des résultats concluants pour les flavonoïdes du thé vert et du cacao. Ces études ont démontré une réduction significative du risque cardiovasculaire global, car la consommation des flavanols du thé vert ont eu un effet bénéfique sur le LDL-cholestérol tandis que celle de cacao riche en flavanols a diminué la pression artérielle et a amélioré la fonction endothéliale (**Morand et Milenkovic, 2014**).

Chapitre II :

La grenade et le cumin

Chapitre II : La grenade et le cumin

1. La Grenade

1.1 Généralités

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. La grenade a été mentionnée dans des textes religieux importants comme la Bible, le Coran et les textes bouddhistes et ceci dans un contexte positif. La grenade avait également une valeur unique dans les cultures du monde entier, dans la Chine ancienne, les graines de la grenade symbolisaient l'immortalité tandis que les Perses croyaient en son insurmontabilité dans les batailles, et les Babyloniens considéraient les graines de grenade comme symbole de renaissance (Wald, 2009 ; Hasan *et al.*, 2018).

La terre d'origine du grenadier est le Moyen-Orient où on le trouve en abondance. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Algérie, Tunisie, Maroc, Italie, Grèce et l'Espagne. Il se fait plus rare au niveau de la France, Portugal, Bulgarie et en Russie. En Amérique, on trouve le grenadier en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (Wald, 2009).

De nombreuses études ont démontré que le régime alimentaire est primordial pour le maintien du corps en bonne santé, et pour la prévention de nombreuses maladies. Parmi les aliments qui contiennent des propriétés nutritives très intéressantes on peut citer la grenade, en effet elle possède des effets antioxydants très élevés, ainsi que plusieurs propriétés thérapeutiques, et ceci grâce à sa composition chimique riche en polyphénols et notamment en tanins (Alhijna et Bourich, 2017). Les grenades ont des antécédents médicaux importants et elles détiennent des propriétés médicinales remarquables (Longtin, 2003) telles que l'anti-inflammation, l'anti-diabète, antidiarrhéiques, le traitement de la plaque dentaire et des aphtes et la lutte contre les infections intestinales et les parasites paludéens (Ismail *et al.*, 2012). Des études récentes ont également révélées l'efficacité du fruit de la grenade contre le cancer, l'athérosclérose, les maladies cardiaques infectieuses et coronariennes (Lansky *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2011).

Une production d'environ 322-341 litres de jus et approximativement 669 kilogrammes de marc de grenade, un sous produit composé de graines et de peaux, sont obtenues au cours de la transformation d'une tonne de fruit de grenade. Le marc de grenade

détient des teneurs élevées en polyphénols, donc il peut être une source potentielle pour isoler les antioxydants à valeur ajoutée (**Qu et al., 2010**). La grande partie des composés chimiques de la grenade se trouve en outre dans l'écorce et les pépins qu'on considère comme déchets. Les écorces de grenade constituent 50% du poids total du fruit, elles sont une source importante de composés bioactifs comme les composés phénoliques, les flavonoïdes, les ellagitanins et les proanthocyanidines (**Li et al., 2006**), les minéraux, principalement le potassium, l'azote, le phosphore, le magnésium, le sodium et le calcium (**Mirdehghan et Rahemi, 2007**), et les polysaccharides complexes (**Jahfar et al., 2003**).

Il existe une multitude de variétés de grenadier mais aucune différence n'a été recensée au niveau de la taille du fruit ou de caractéristiques agronomiques. La différence entre chaque variété peut être visuelle au niveau de la couleur de peau (du rouge foncé au jaune pâle rosé), la couleur des arilles (du rouge très foncé au rose transparent) ou bien au niveau du goût des arilles (acide ou doux). En Algérie, environ quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'état dont on peut citer l'Espagne rouge, Corda travita, Mollerhuesso, Mellisse, Papersshell, Gajin, Sefri, Zemdautomne, Sulfani, Spanishduoy, Chelfi Doux de kolea et Messaad (**Zeghad, 2018**).

L'étude et l'évaluation des composés de la grenade ont été récemment un sujet intéressant pour les scientifiques, qui ont démontré leur efficacité dans la prévention et la lutte contre les maladies chroniques les plus fréquentes (**Alhijna et Bourich, 2017**).

1.2 Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753 comme suit :

Embranchement : spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* L (grenadier)

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes a été créée par un groupe de botanistes, l'*Angiosperm Phylogeny Group* ou APG, qui réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires.

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII. La classification du grenadier devient :

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* L

(Bendjabeur, 2012)

Dans la classification de Linné ou dans la classification APGII, le genre *Punica* ne possède que deux représentants: *Punica granatum* et *Punica protopunica*. Ce dernier croît exclusivement sur l'île de Socotra, située dans l'océan Indien, près des côtes de Somalie **(Wald, 2009)**

1.3 Description générale du grenadier

Le grenadier forme naturellement un arbrisseau ou un sous-arbrisseau. L'arbre adulte peut atteindre entre 5 et 10 m de haut, touffu, très ramifié depuis la base du tronc et il est plus ou moins épineux. Le tronc est tortueux, à écorce grisâtre qui se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au sommet. Généralement, sa durée de vie est extrêmement longue **(Douaouri, 2018)**.

1.3.1 Les feuilles

Punica granatum est une espèce à feuilles caduques. Elles sont de forme oblongues, opposées ou sous opposées, luisantes, étroites, entières et non stipulées, de 3 à 7 cm de long et de 2 cm de large selon les cultivars. Au stade juvénile, les feuilles sont de couleur rougeâtre puis à la maturité, elles deviennent verdâtres **(Douaouri, 2018)**. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante. Elles sont munies d'un court pétiole, de 1 à 5 mm de long, qui est généralement rougeâtre. Elles ne possèdent pas de stipule **(Wald, 2009)**. La plupart des variétés de

grenadier ont des feuilles en paires, alors que certaines variétés peuvent avoir trois ou quatre feuille par nœud (**Douaouri, 2018**).

1.3.2 Les fleurs

Les fleurs du grenadier sont très ornementales. Elles sont de couleur rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches, elles s'ouvrent de mai à juillet (**Wald, 2009**). La corolle d'un rouge éclatant est formée de 5 à 7 pétales obovales (**Figure 6**). Elles sont appelées aussi balaustes (quand elles sont sous forme de boutons), les fleurs sans odeur sont sèches, de saveur astringente et donnent à la salive une teinte violacée. Elles sont hermaphrodites, actinomorphes (**Alhijna et Bourich, 2017**).

1.3.3 Le fruit

1.3.3.1 La baie

Le fruit du grenadier, la grenade est une baie ronde à écorce dur, elle a la taille d'une pomme ou d'une orange. Elle mesure entre 6 et 12 cm de large alors que le poids varie de 200 à 650 grammes (**Holland et al., 2009 ; Pande et Akoh, 2016**). Divisée en neuf loges dont les cloisons membraneuses partent du réceptacle et renferment des semences entourées d'une pulpe succulente, ordinairement rougeâtre. A maturité le fruit est facilement identifiable par le reste du calice qui le surmonte, formant une couronne dentée (**Alhijna et Bourich, 2017**) (**Figure 6**). La période de maturité des grenades diffère selon les variétés et a lieu entre la fin du mois d'aout et décembre (**Melgarejo, 1993**).

1.3.3.2 L'écorce du fruit

Le péricarpe, qui n'est pas comestible, coriace et épais. Il forme une écorce dure, d'un beau jaune à l'intérieur du fruit (**Bärtels, 1998**). Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente qui varie selon les cultivars poussant dans différentes régions du monde. Il est très coloré, généralement de teinte brun-rougeâtre (**Chakass et al., 2007**) ou rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau lisse de teinte blanc-jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé (**Douaouri, 2018**).

1.3.3.3 Les graines

Les graines ou arilles représentent la partie comestible du fruit, elles sont contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses (**Figure 6**). Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux (**Wald, 2009**). Elles sont composées

d'un tégument externe pulpeux et très succulent, et un tégument interne dur et coriace (Alhijna et Bourich, 2017)

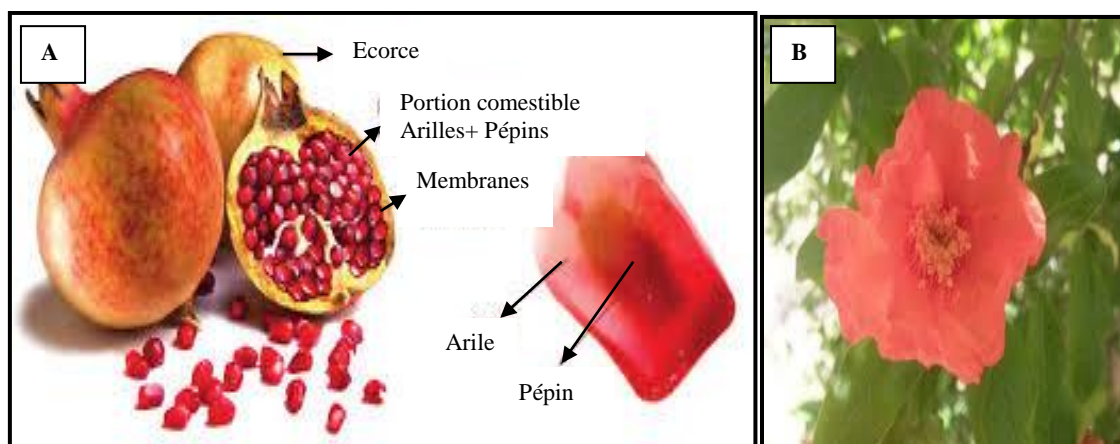


Figure 6. La grenade et ses différentes parties (A), fleur du grenadier Sefri (B) (Hmid, 2013).

1.3.4 Système racinaire

Le système racinaire du grenadier a la capacité à s'adapter selon les conditions du sol. La racine du grenadier est ligneuse, noueuse, dure et pesante. La face externe grise jaunâtre ou brunâtre montre de larges écailles subéreuses, des rides ou de larges fissures. La face interne jaune verdâtre est lisse et finement striée longitudinalement (Alhijna et Bourich, 2017).

1.4 Constituants biochimiques de la grenade

Au cours de la dernière décennie, des progrès significatifs ont été accomplis dans la mise en place des mécanismes pharmacologiques de la grenade et des composants individuels qui en sont responsables. Des extraits de toutes les parties du fruit semblent avoir des propriétés thérapeutiques (Jurenka, 2008).

En général, le fruit de la grenade se compose de 52% de parties comestibles (graines), comprenant 78% de jus et 22% de pépins, les 48% restants sont constitués de 38% d'écorce externe et 10% de cloisonnement interne (en poids). L'écorce représente une source importante de composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les ellagitanins et les proanthocyanidines. Elle est également constituée de minéraux, principalement de potassium, azote, magnésium, sodium, calcium, phosphore ainsi que des polysaccharides complexes. Les arilles contiennent 85% d'eau, 10% de sucres totaux tels que

le fructose et le glucose, 1.5% de métabolites et de composés bioactifs tels que des acides organiques (acide ascorbique, acide citrique et acide malique), des acides phénoliques et des flavonoïdes, surtout les anthocyanes. Les graines sont une riche source de lipides; l'huile de pépins de grenade représente 12 à 20% du poids total des graines, elles sont également riches en tanins hydrolysables et en anthocyanes (El- Nemr *et al.*, 1990 ; Sreekumar *et al.*, 2014 ; Sharma *et al.*, 2017 ; Bar-Ya'akov *et al.*, 2019).

Les différentes parties du fruit de la grenade contiennent toutes les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, ce qui peut expliquer que de nombreuses études ont démontré que les combinaisons d'extraits de grenade de différentes parties du fruit étaient plus efficaces qu'un seul extrait (Sreekumar *et al.*, 2014).

1.5 Application thérapeutique de la grenade

1.5.1 Action antioxydante de la grenade

Une consommation journalière d'au moins 400 g de fruits et de légumes a été recommandé par l'OMS pour prévenir des maladies chroniques tels que les cardiopathies, les cancers, le diabète de type II et l'obésité. Cette propriété peut être due à la présence d'agents antioxydants, en particulier les composés phénoliques, qui sont couramment présents dans les fruits et légumes. C'est pour cela qu'au cours des dernières années, l'accent mis sur les antioxydants naturels a grandement augmenté (Hmid, 2013 ; Zeghad *et al.*, 2019).

Les aliments d'origine végétale sont une source importante de macronutriments (lipides, glucides et protéines), mais également de métabolites secondaires qui sont très bénéfiques pour la santé des consommateurs notamment en fournissant des antioxydants. En effet, ces composés sont connus pour leurs propriétés à piéger les radicaux libres et à inhiber l'oxydation des lipides *in vitro*. Des études antérieures ont suggéré que la punicalagine provenant des pelures est l'un des principaux composés phytochimiques contribuant à la capacité antioxydante totale du jus de grenade, tandis que les anthocyanes ne jouent qu'un rôle mineur dans cette activité. Le mode d'action par l'activité antioxydante est assez complexe et plusieurs facteurs y jouent un rôle. Madrigal-Carballo *et al.* (2009) ont suggéré que les composés phénoliques de grenade subissent des réactions d'oxydo-réduction parce que les groupes hydroxyles phénoliques donnent facilement de l'hydrogène aux agents réducteurs (Viuda-Martos *et al.*, 2010 ; Zeghad *et al.*, 2019).

Différentes études ont démontré le pouvoir antioxydant de diverses parties de la grenade, à savoir les graines (**Sadeghi et al., 2009 ; Pedriali et al., 2010 ; Gill et al., 2012 ; Abiola et al., 2018 ; Jalal et al., 2018**), les écorces (**Osama et al., 2010 ; Qu et al., 2010 ; Rajan et al., 2011 ; Abdel Moneim et al., 2011 ; Dikmen et al., 2011 ; Singh et Immanuel 2014 ; Jalal et al., 2018**), et le jus de grenade (**Abdel Moneim et al., 2011 ; Fernandes et al., 2015**).

1.5.2 Action Anticancéreuse

Des études *in vitro* utilisant trois lignées cellulaires de cancer de la prostate (DU-145, LNCaP et PC-3) ont démontré le pouvoir inhibiteur des extraits du jus et d'écorces de grenade, ainsi que de l'huile de graines, sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate. Ces extraits ont provoqué une perturbation du cycle cellulaire, ont induit l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires de cancer de la prostate, ont supprimé le potentiel invasif des cellules PC-3 et ont diminué la prolifération du DU-145. D'autres études ont également démontré que des combinaisons d'extraits de grenade de différentes parties du fruit étaient plus efficaces que n'importe quel autre extrait (**Jurenka, 2008; Mohammad et Kashani, 2012**).

Différents extraits, ainsi que l'huile de pépins de grenade ont été testés en culture cellulaire, sur des animaux avec un cancer de la peau ainsi que sur des peaux humaines reconstituées. Les extraits et l'huile ont tous démontré un vaste potentiel de prévention du cancer de la peau qui a été induit par les radiations ultraviolettes (**Sharma et al., 2017**).

Récemment, de nombreux travaux scientifiques ont étudié le lien entre l'alimentation et le risque de cancer du sein. Ils ont aboutit à des résultats concluant démontrant les effets bénéfiques de la grenade sur ce type de cancer. Les polyphénols du jus fermenté, du péricarpe et de l'huile de pépins de grenade ont inhibé l'aromatase, qui convertit les androgènes en œstrogènes et qui joue un rôle important dans la cancérogenèse mammaire. Ces polyphénols avaient également la capacité d'inhiber l'enzyme de biosynthèse des œstrogènes la 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase, inhibant ainsi la prolifération des lignées cellulaires du cancer du sein MCF-7 et MB-MDA (**Sharma et al., 2017**).

Seeram et al. (2005) ont évalué *in vitro* l'effet anti-prolifératif du jus de grenade contre les cellules tumorales du colon (HT-29, HCT116, SW480, SW 620). Le jus de grenade a inhibé la prolifération de toutes les lignées cellulaires de 30% à 100% et a induit l'apoptose dans les cellules du côlon HT-29 de même que l'extrait de tanin de grenade standardisé.

1.5.3 Pression artérielle

Les résultats d'études de l'amélioration de la pression artérielle et des fonctions endothéliales du corps humain par la consommation de jus de grenade, ont démontré une réduction significative de la pression artérielle systolique, le potassium contenu dans le jus peut empêcher la raideur des artères et l'athérosclérose, il améliore le flux sanguin vers le cœur et réduit les incidents de crise cardiaque (**Qamar Abbas *et al.*, 2018**).

Des études ont démontré le pouvoir du jus de la grenade à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine sérique (ECA) et à réduire la pression artérielle systolique chez les patients hypertendus. Un protocole a été suivi sur dix sujets hypertendus auxquels on a administré 50 ml/jour de jus de grenade contenant 1.5 mmol de polyphénols totaux pendant deux semaines. Une diminution moyenne de 36% de l'activité de ECA sérique et une diminution faible mais significative de 5% de la pression artérielle systolique ont été enregistrés chez 7 sujets (70%) (**Mohammad et Kashani, 2012**).

1.5.4 Réduction du niveau de cholestérol

La richesse de la grenade en antioxydants comme les anthocyanes et les tanins aident à bloquer l'accumulation de cholestérol dans les artères, ce qui permet de protéger contre les attaques cardiaques. Le jus de ce fruit permet la protection contre les attaques cérébrales et ceci en diminuant la concentration de lipoprotéines de basse densité du corps. L'extrait de feuille de grenade a été testé pour sa capacité de réduction du cholestérol sérique chez des souris nourries avec un régime riche en graisse. L'administration de cet extrait a permis de réduire le taux de cholestérol total et de triglycérides du corps. Le poids des souris a été réduit et l'absorption intestinale des graisses ainsi que les niveaux d'énergie et de HDL corporels ont diminué (**Qamar Abbas *et al.*, 2018**).

1.5.5 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie cérébrale dégénérative progressive qui implique la mort neuronale pyramidale sélective, une accumulation de fibrilles intraneuronales et extracellulaires, enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) et plaques séniles et de peptide amyloïde β ($A\beta$). Le cerveau des patients atteints de MA est soumis à un stress oxydatif intense. Des travaux réalisés sur l'extrait éthanolique de grenade ont démontré l'effet de cet extrait sur la protection des cellules PC12 du stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cet extrait a également inhibé la mort des cellules neuronales causée par

le stress oxydatif induit par A β et le déficit d'apprentissage et de mémoire induit par A β (Hirai *et al.*, 2001 ; Kumar *et al.*, 2018).

Des souris transgéniques avec une pathologie semblable à la maladie d'Alzheimer ont été traitées avec du jus de grenade, les résultats ont démontré qu'il y avait 50% moins d'accumulation de bêta-amyloïde soluble et moins de dépôts amyloïdes hippocampiques que les souris témoins, suggérant ainsi l'effet neuroprotecteur du jus de grenade. Les souris ont également présenté un meilleur apprentissage du labyrinthe aquatique et ont nagé plus rapidement que les témoins (Mohammad et Kashani, 2012).

1.5.6 Action sur le diabète de type 2

De nombreuses parties de la grenade, comme l'écorce, les graines, les fleurs et le jus, ont montré des effets hypoglycémisants sur des rats ayant une hyperglycémie induite et ceci par l'inhibition des enzymes liées au métabolisme des glucides, la stimulation de la libération d'insuline par les cellules β et la protection du tissu pancréatique, ces propriétés seraient attribuées aux composés phénoliques (Virgen-Carrillo *et al.*, 2020). De plus, les travaux réalisés par Banihani *et al.* (2014) encouragent les patients atteints de diabète type 2 à consommer le jus de grenade qui favorise le contrôle des taux de glucose, car il améliore la résistance à l'insuline, la fonction des cellules β et permet la diminution de la glycémie à jeun. De plus, les extraits éthanoliques des fleurs du grenadier ont démontré une bonne capacité à faire baisser la glycémie (Wald, 2009).

1.5.7 Action antimicrobienne

La grenade contient de nombreux composés bioactifs qui luttent contre des infections comme la diarrhée et les ulcères. Le fruit de la grenade et ses dérivés présentent une activité antibactérienne contre les organismes pathogènes et résistants aux antibiotiques. Les acides ellagique et gallique en tant qu'agents antimicrobiens naturels ont prouvé leur capacité à précipiter les protéines membranaires et à inhiber les enzymes qui conduisent à la lyse des cellules chez *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Kumar *et al.*, 2018 ; Qamar Abbas *et al.*, 2018).

Prashanth *et al.* (2001) ont étudié, *in vitro*, l'action de différents extraits d'écorces de grenades obtenus à partir de différents solvants pour isoler divers composés actifs et ceci sur six souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Les résultats ont démontré la

capacité antibactérienne de tous les extraits sur les souches testées. Cependant, l'extrait méthanolique a eu le plus fort pouvoir inhibiteur par rapport aux autres extraits essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis* (**Hmid, 2013**).

El-zoreky. (2009) a démontré l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'écorces de grenade contre les micro-organismes, tels que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger*. **Braga et al. (2005)** ont également signalé l'effet des extraits méthanoliques du fruit contre la croissance et la production de toxines de *S. aureus* FRI 722.

D'autres recherches, ont mis en évidence l'activité antifongique de l'extrait d'écorces du fruit de *P. granatum* contre *C. albicans*. L'activité antifongique a été associée principalement à la présence de punicalagine, considérée comme le principal composant de cette plante. De plus, cet extrait a fortement altéré la structure cellulaire de la levure, gênant la croissance et le développement de cette dernière et empêchant ainsi l'invasion tissulaire (**Almeida et al., 2018**).

Les polyphénols de grenade ont également des effets antiviraux, la punicalagine a un effet anti-grippal, elle inhibe la réplication de la grippe humaine A/Hong Kong (H3N2) en bloquant la réplication de l'ARN (**Kumar et al., 2018**). La grenade a également prouvé son efficacité contre un autre virus, en effet le jus de grenade a été testé pour son activité inhibitrice contre le VIH-1 en utilisant CD4 et CXCR4 comme récepteurs cellulaires et CCR5 comme corécepteur cellulaire. Les résultats ont été concluants et suggèrent la possibilité de produire un microbicide anti-VIH-1 à partir de sources peu coûteuses et largement disponibles (**Neurath et al., 2005**).

2. Le cumin**2.1 Généralités**

Les épices sont des bio nutriment importants pour les ingrédients alimentaires et les suppléments nutritionnels. Depuis les temps anciens, les épices ont été utilisées comme additifs alimentaires pour améliorer le goût et la saveur des aliments. Outre ces utilisations, les épices ont également de nombreuses propriétés médicinales (**Singh et al., 2017**). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (**Athamena., 2010**).

Le cumin (*Cuminum cyminum L.*) est une petite plante aromatique annuelle de la famille des Apiacées, il est originaire d'Égypte et est cultivé au Moyen-Orient, en Inde, en Chine et dans les pays méditerranéens depuis des millénaires. Réservoir de nombreux composés bioactifs avec diverses applications thérapeutiques, il est mondialement populaire et essentiel pour l'aromatisation dans de nombreuses cuisines, en particulier l'Asie du Sud, l'Afrique du Nord et l'Amérique latine (**Al-Snafi, 2016 ; Singh et al., 2017**).

La production mondiale de cumin est d'environ 300 000 tonnes, il est principalement produit en Asie centrale et du Sud. L'Inde représente le producteur le plus important au monde (soit 70% de la production mondiale), avec une production annuelle de 0.1 à 0.2 millions de tonnes. L'Inde consomme près de 90% de sa production total et exportent les 10% restants (**Siow, 2018**).

Le cumin a été utilisé comme traitement anti-inflammatoire, diurétique, carminatif et antispasmodique, également pour soigner les caries dentaires, l'épilepsie et aussi pour traiter la dyspepsie, l'ictère, la diarrhée, les flatulences et l'indigestion. La poudre de cumin a été utilisée comme cataplasme et suppositoire (**Vican, 2001; Singh et al., 2017**).

2.2 Classification taxonomique

Royaume: Plantae

Sous-royaume: Viridiplantae

Infra-royaume: Streptophyta

Superdivision: Embryophyta

Division: Tracheophyta

Embranchement: Spermatophytina

Classe: Magnoliopsida

Super-ordre: Asteranae

Ordre: Apiales

Famille: Apiacées

Genre: *Cuminum*

Espèce: *Cuminum cyminum* (Al-Snafi, 2016)

2.3 Description générale du cumin

Le cumin (*Cuminum cyminum*) appartient à la famille des Apiacées, c'est une petite plante herbacée annuelle mince de la famille du persil, qui peut atteindre une hauteur de 30 à 45 cm. Il a une tige principale qui se ramifie jusqu'à cinq branches secondaires et chaque branche peut avoir 2-3 sous-branches, les branches atteignent la même hauteur, ce qui donne à la plante un couvert uniforme d'inflorescence (**Figure 7**) (Siow, 2018).

Les feuilles sont parfumées, finement divisées, les fleurs sont petites portées en ombelles de couleurs blanches ou roses en été (Athamena, 2009).

Le fruit est fusiforme, d'une couleur jaune clair, qui devient plus foncé au contact de l'air, strié variant du vert au gris-brun, d'une odeur aromatique et un goût épicé et amer. Le fruit du cumin ressemble au carvi, mais est plus gros et plus long (Athamena, 2009 ; Singh *et al.*, 2017).

Chaque fruit contient une seule graine, qui est de couleur jaune à grise brunâtre et est de forme allongée avec neuf protubérances. L'odeur et le goût du cumin sont similaires à ceux du carvi, mais ils sont plus chauds et moins agréables (Singh *et al.*, 2017).



Figure 7. Aspects morphologiques du cumin (Site web : www.Wikipedia).

2.4 Constituants biochimiques du cumin

Le cumin a une saveur forte distinctive, son arôme est dû à sa teneur en huile essentielle (**Srinivasan, 2018**). Les graines de cumin contiennent environ 15% d'huile fixe, constituée essentiellement de triglycérides (55%), d'esters de stérol (25%) et d'acides gras libres (10%). Elles contiennent aussi 2.5 à 10 % d'huile essentielle, constituée de 25 à 35% d'aldéhyde cuminique, aldéhyde hydrocuminique, perilla aldéhyde, terpinéol, ρ -cymène, dipentène, pinène, terpinène et limonène (**Figure 8**). En outre, elles renferment 13% de résine, 7% de pentosanes, des tanins, de l'aleurone, 59% de fibres diététiques, 8.3% d'amidon, des protéines, de la cellulose, des sucres, des flavonoïdes, des coumarines, des caroténoïdes et des acides phénoliques (acide salicylique, acide gallique, acide cinnamique, hydroquinone, résorcinol, acide P-hydroxybenzoïque, rutine, coumarine, quercétine) (**Athamena, 2009 ; Al-Snafi, 2016**). 19 composés phénoliques ont été identifiés au cours de la maturation du cumin, l'acide rosmarinique dominaient chez les graines non mûres, alors que c'était l'acide p-coumarique qui était le plus abondant chez les graines à moitié mûres et mûres (**Al-Snafi, 2016**).

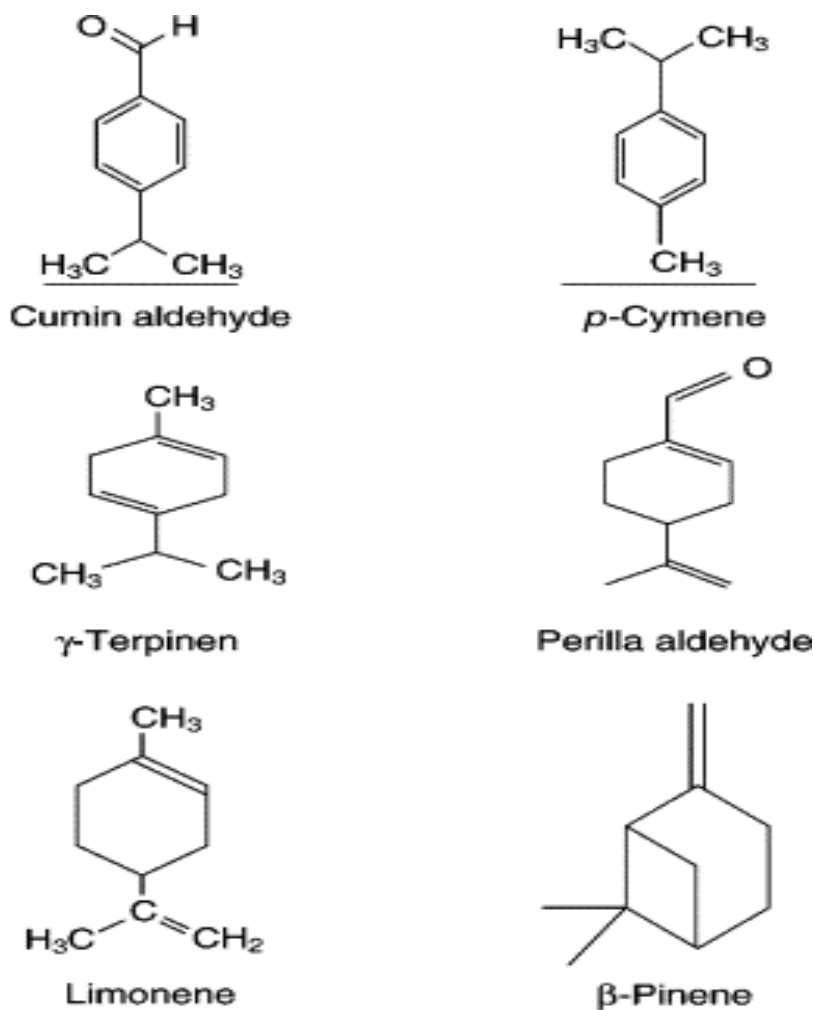


Figure 8. Structures chimiques de quelques constituants de *Cuminum cyminum* (Amin, 2012).

2.5 Application thérapeutique du cumin

Les graines de cumin sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies, notamment la diarrhée et la dyspepsie chronique, la gastrite aiguë, le diabète et le cancer. Ces propriétés thérapeutiques sont généralement rapportées à ses constituants bioactifs tels que les terpènes, les phénols et les flavonoïdes (Srinivasan, 2018 ; Sharma *et al.*, 2019).

2.5.1 Action stimulante de la digestion

A l'issue des essais réalisés sur l'influence du cumin sur les enzymes digestives du pancréas et des muqueuses intestinales des rats, on a constaté une réduction de l'activité de la lipase pancréatique (1.25%), des activités de la trypsine pancréatique, de la chymotrypsine et de l'amylase. D'autre part, le cumin a également entraîné une réduction de 25% du transit des aliments, qui est en relation avec l'effet bénéfique des graines de cumin sur les enzymes

digestives ou la sécrétion de bile (**Srinivasan, 2018**). Des essais réalisés par **Milan et al. (2008)**, ont constaté que les extraits de cumin augmentaient grandement les activités enzymatiques de l'amylase, la lipase et la phytase.

2.5.2 Activité antioxydante

Les huiles essentielles ainsi que les extraits de cumin ont montré une activité antioxydante significative dans plusieurs méthodes d'essai. Il s'agit de leur capacité à piéger les radicaux hydroxyles, les radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) et les peroxydes lipidiques (**Johri, 2011**). Les activités antiradicalaires des extraits de cumin ont été très élevées par rapport à l'huile essentielle (**Athamena, 2009**).

L'activité antioxydante élevée du cumin a été largement attribuée à la présence d'alcools monoterpéniques, linalol, carvacrol, anéthol et estragol, flavonoïdes et autres composés polyphénoliques (**Johri, 2011; Singh et al., 2017**).

2.5.3 Élimination des insectes

Les résultats de diverses études ont montré que l'huile essentielle de *C. cyminum* a une toxicité significative contre les œufs des insectes alimentaires nuisibles. Les insectes ravageurs des produits stockés peuvent être éliminés par des fumigants, par contact et par l'action d'ingestion des poisons que contiennent des monoterpènes de cumin (**Roustakhiz et Raissi, 2017**).

2.5.4 Influence cardio-protectrice par des effets hypolipidémiques et hypotenseurs

Kalaivani et al. (2013) ont mené une étude pour évaluer le potentiel antihypertenseur de l'extrait aqueux de graines de cumin et son rôle dans l'expression artérielle – endothéliale de l'oxyde nitrique synthase, l'inflammation et le stress oxydatif chez des rats avec une hypertension rénale induite. La prise du cumin chez les rats hypertendus a permis d'améliorer l'oxyde nitrique plasmatique et de réduire la pression artérielle systolique.

Les flavonoïdes contenus dans le cumin ont une activité antioxydante et améliorent le système antioxydant. L'extrait de cumin a pu diminuer de façon significative le niveau de lipoprotéines de basse densité oxydées, et a augmenté les activités de la paraoxanase qui est un protecteur de l'oxydation de lipoprotéines plasmatiques et qui contribue à l'hydrolyse des peroxydes lipidiques dans les lésions athérosclérotiques (**Srinivasan, 2018**).

2.5.5 Effet antidiabétique

L'effet antidiabétique des graines de cumin a été rapporté chez des diabétiques humains, l'administration de ce dernier a permis de réduire significativement la glycémie à jeun et post-prandiale. De plus, des études réalisées sur des rats diabétiques ont démontré que les graines de cumin atténuent les anomalies métaboliques liées au diabète. Un régime contenant de la poudre de cumin chez des rats diabétique d'alloxone s'est montré très efficace dans la réduction de l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie liées au diabète sucré (**Srinivasan, 2018**).

L'effet anti-hyperglycémiant a été étudié sur 27 lapins sains après administration gastrique de l'eau, de tolbutamide et des préparations traditionnelle de 12 plantes comestibles. Pour ce but une solution de dextrose a été infusée en sous-cutanée. Le cumin a montré des diminutions significatives pour chaque point de tolérance du glucose (**Athamena, 2009**).

2.5.6 Effets anticancéreux

Ces dernières années, un intérêt remarquable a été généré pour l'identification de substances naturelles chimiopréventives capables d'inhiber ou d'inverser la carcinogénèse, cette propriété serait due à la présence de substances phénoliques. Des recherches actuelles, ont affirmés que les graines de cumin possédaient des propriétés anti-cancérogènes, ce potentiel chimiopréventif pourrait être dû à sa capacité de changer le métabolisme cancérogène, en augmentant la sécrétion d'enzymes anti-cancérogènes par les glandes. Le limonène contenu dans le cumin présente de fort pouvoir anti-tumoral (**Prakas et Gupta, 2014**).

D'autres expérimentations, sur le 1- (2-éthyl, 6-heptyl) phénol (EHP), un composé actif extrait à partir du cumin, ont révélé l'activité antitumorale contre six types de lignées de cellules tumorales : HEPG2 (hépatique), HELA (Cervicale), HCT116 (côlon), MCF7 (sein), HEP2 (larynx), CACO2 (côlon). MCF7 était la lignée de cellules tumorales la plus sensible où seulement 33% des cellules ont survécu, suivi de HEPG2 où 41% des cellules ont survécu et HEP2 où 56% des cellules ont survécu et ceci à une concentration d'EHP de 10 µ/ml. Quand aux cellules tumorales CACO2 et HCT116, l'effet a été plus faible avec 72% et 76% de survie des cellules respectivement (**Mekawey et al., 2009**).

D'autre part, les graines de cumin introduites dans l'alimentation ont montré un potentiel chimiopréventif dans le cas du cancer de pré-estomac et du col de l'utérus (**Al-Snafi, 2016**).

2.5.7 Effets antimicrobiens

Selon l'étude de **Derakhshan et al. (2008)**, l'huile essentielle de graines de cumin a significativement inhibé la croissance de *Klebsiella pneumoniae*, par la suppression de la capsule et en réduisant l'activité de l'uréase, en plus de son activité antibiofilm sur cette souche. Ces propriétés seraient principalement du au cuminaldéhyde (**Siow, 2018**). D'autres études ont démontré l'activité antibactérienne du cumin sur *Bacillus brevis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (**Sagdic et Ozcan, 2003 ; Gachkar et al., 2007**).

Le cumin possède également une activité antifongique, il a eu un effet inhibiteur remarquable sur la croissance fongique des souches d'*Aspergillus* (**Siow, 2018**).

Le **Tableau 1** résume les effets thérapeutiques de quelques constituants actifs contenus dans les graines de *Cuminum cyminum*.

Tableau 1. Effets bénéfiques médicinaux des graines de *Cuminum cyminum* (Siow, 2018).

Effet thérapeutique	Constituant actif	L'activité
Antimicrobien	Huile essentielle Cuminaldehyde	Inhibition de la croissance de <i>K. pneumoniae</i> en provoquant un allongement cellulaire, une répression de l'expression des capsules et une inhibition de l'activité des uréases. Inhibition de la formation de biofilm.
Antifongique	α -Pinene	Inhibition de la croissance fongique des souches d' <i>Aspergillus</i> .
Antioxydant	Alcools monoterpéniques, linalol, carvacrol, anéthole, œstragol, flavonoïdes, composé polyphénolique	Effets de piégeage des radicaux hydroxydes, des radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) et des peroxydes lipidiques, des pouvoirs de réduction et de chélation.
Anti-ostéoporotique	Phytoestrogènes	Diminution de l'excrétion urinaire de calcium, augmentation de la teneur en calcium et de la résistance mécanique des os chez l'animal.
Analgésique	Linalool, dérivés de β -D glucopyranoside	Amélioration de la tolérance et de la dépendance à la morphine par le test au formol chez le rat.
Cicatrisation des plaies	Terpenoïdes	Amélioration de l'épithélisation dans les modèles ouverts et restructurés de plaies d'incision et de granulome.
Anti-tumoral	2-éthyl-6- heptyl phénol	Inhibition de la croissance des lignées cellulaires tumorales, y compris CACO2, HEPG2, HELA, HEP2, HCT116 et MCF7.
Anti-cancérigène	Alcools monoterpéniques, linalol, carvacrol, anéthole, œstragol, flavonoïdes, composés polyphénoliques	Diminution de la glutathion-S-transférase de plus de 78% dans l'estomac, le foie et l'œsophage des souris
Antidiabétique	Cuminaldehyde	Inhibition de l'aldose réductase et α -glucosidase isolées de rat.

Chapitre III :
Le biofilm buccal

Chapitre III : Le Biofilm buccal

1. Généralités

La cavité buccale représente l'entrée du tube digestif et détient plusieurs fonctions déterminantes pour la santé, notamment la phonation, la mastication, la déglutination et la respiration (**Secci, 2006**). Une mauvaise santé bucco-dentaire est liée à certaines maladies tel que le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde et l'ostéoporose, ainsi que les ulcères d'estomac et le cancer gastrique et des risques de complications de la grossesse (**Watabe et al., 1998; Petersen et al., 2005; Rautemaa et al., 2007**).

La cavité buccale représente un écosystème unique et complexe et abrite une flore très diversifiée contenant plus de 700 espèces bactériennes, des champignons, des levures, des mycoplasmes, des parasites eucaryotes et des virus. En une ou deux heures environ, six milliards de ces microorganismes sont produits dans la bouche humaine (**Chardin et al., 2006**), ils colonisent les surfaces buccales ou ils forment un consortium microbien appelé plaque dentaire ou biofilm microbien (**Takahashi, 2005**).

2. Le Biofilm buccal (plaque dentaire)

Grâce au microscope confocale à balayage laser, on a pu démontré que le biofilm est constitué d'agrégats de micro-organismes dans lequel les cellules sont collées les unes aux autres et/ou à une surface biotique ou abiotique, ces cellules sont intégrées dans une matrice auto-produite composée de polysaccharides intercellulaires bactériens, de protéines et d'acides nucléiques extracellulaires (**Donlan et Costerton, 2002 ; Hall Stoodley et al., 2004**).

Ces rassemblements de micro-organismes mènent à la formation de micro-colonies dont la différenciation conduit à la formation de biofilm. Les micro-colonies sont séparées par des espaces libres appelés canaux, qui permettent la circulation de fluides et assurent l'apport de l'oxygène, de nutriments aux micro-organismes et permet l'élimination de leurs produits de dégradation (**Lawrence et al., 1991**).

La bouche favorise la croissance de diverses communautés de micro-organismes (**Wade, 2013**) qui se maintiennent sur toutes les surfaces dentaires et gingivales. Une croissance sous forme planctonique amènerait à leur élimination rapide par la salive, leur ingestion et leur destruction dans les sucs acides de l'estomac, c'est pourquoi ils s'organisent

en biofilm. Ce dernier leur permet de vivre au contact les uns des autres, ce qui leur donne la possibilité d'avoir des interactions potentiellement synergiques ou antagonistes.

La composition du microbiote est influencée par l'environnement oral, des changements dans les conditions locales peuvent affecter les interactions microbiennes et définir, le type de relation entre le microbiote buccal et l'hôte. En effet, soit une relation symbiotique ou plutôt dysbiotique (nuisible) qui augmenterait le risque de maladies telles que les caries ou les maladies parodontales (**Figure 9**) (**Marsh, 2003 ; Roberts et Darveau, 2015**).

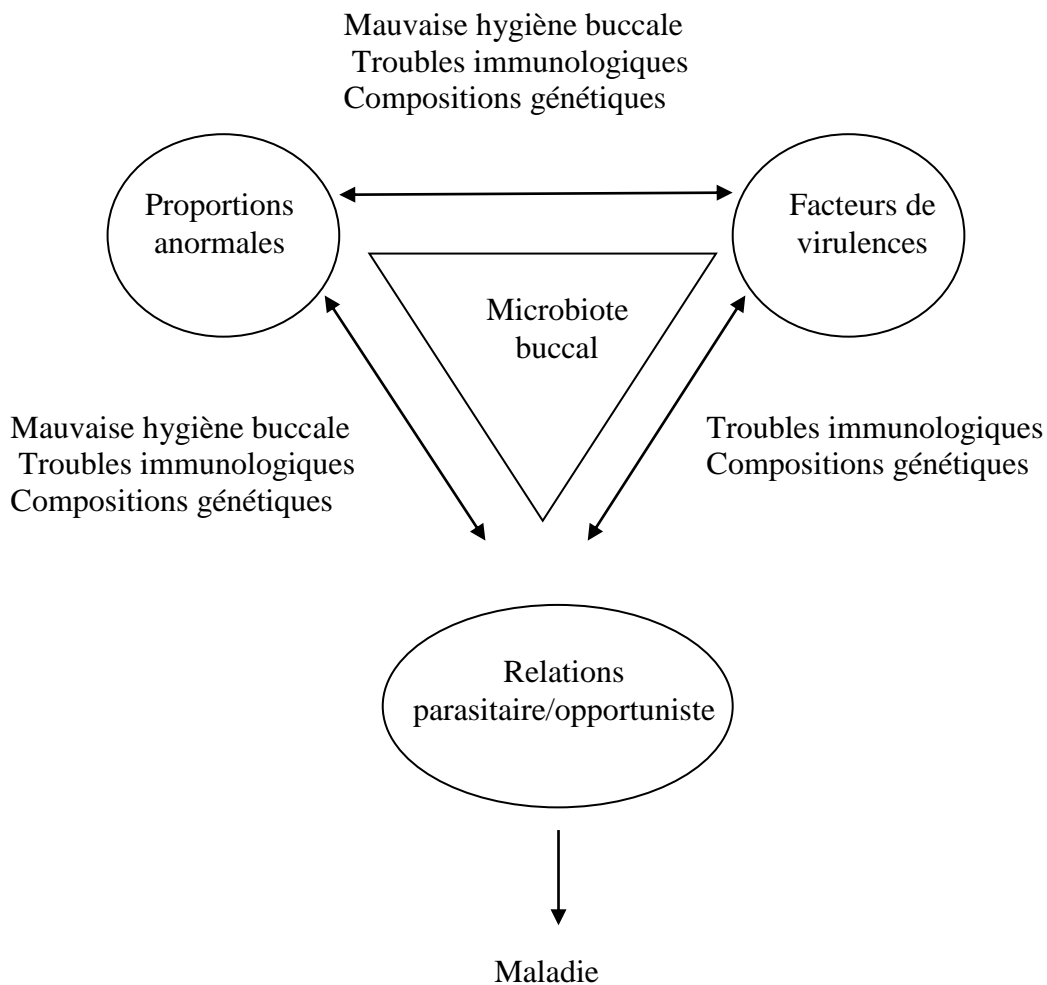


Figure 9. Cycle des changements écologiques dans le microbiote buccal qui causent la maladie. Une mauvaise hygiène buccale, des troubles immunologiques et certaines compositions génétiques sont des facteurs majeurs qui contribuent au début de ce cycle. Une condition peut conduire les microbes à devenir anormaux ou à acquérir des facteurs de virulence, et à leur tour, activer le reste du cycle et éventuellement la maladie (**Zarco et al., 2012**).

2.1 Étapes de la formation du biofilm

La formation de biofilm est un processus très complexe qui se déroule en plusieurs étapes (**Figure 10**). Le bon déroulement du processus est assuré par un nombre de facteurs et de conditions qui doivent être présents dans la cavité buccale. On peut cependant y distinguer cinq phases caractéristiques :

2.1.1 Formation de la pellicule exogène acquise (biofilm salivaire)

La pellicule exogène acquise (PEA) est un élément important car elle constitue l'interface entre la surface de l'émail et la première couche du biofilm buccal. Cette pellicule se forme dès l'éruption d'une dent et quelques minutes après leur nettoyage. Il s'agit d'un film protéique à la surface de l'émail composé de l' α -amylase, de proline-rich-glycoprotéines (PRG) et de la cystatine A. L'anhydrase carbonique (AC) VI sécrétée s'adsorbe également à l'émail et enrichit la pellicule exogène acquise; cette AC VI produit au sein du biofilm du bicarbonate qui amortit les chutes de pH de la plaque (**Kivelä *et al.*, 1999**). Dès l'adsorption des protéines à l'émail, elles entrent en interactions par des liaisons croisées entre plusieurs d'entre elles, cette réaction dépend d'une transglutaminase sécrétée par les glandes salivaires. On retrouve aussi au sein de cette pellicule des complexes hétérotypiques entre les mucines de type MG1, et l' α -amylase, les PRG, la stathérine et les histatines. Certaines glycosyltransférases (GTF-C) dans leur forme soluble, produites par les streptocoques cariogènes, ont été identifiées dans le biofilm salivaire et pourraient participer à l'adhésion bactérienne à la surface de l'émail (**Pellat *et al.*, 2002 ; Bowen et Koo., 2011 ; Lynge Pedersen et Belstrom., 2019**).

Ce biofilm salivaire est dépourvu de bactéries et remplit plusieurs fonctions:

- Garantir la lubrification pendant la mastication.
- Protéger la dent de la déminéralisation en raison de sa perméabilité sélective, limitant ainsi le transport des ions dans et hors la dent.
- Moduler l'adsorption précoce de la flore buccale.
- Procurer un support pour les fluorures, le calcium et les phosphates qui pourront être rendus disponibles lors de la reminéralisation amélaire (**Pellat *et al.*, 2002**).

2.1.2 Colonisation bactérienne**2.1.2.1 Adhésion réversible**

Un certain nombre de bactéries Gram positives, colonisent les dents pelliculées, c'est la première étape dans la colonisation des surfaces amélaire dans la bouche. Il s'agit de plusieurs souches de Streptocoques et ceci grâce à des interactions physicochimiques non spécifiques (forces de Van der Waals et forces de répulsion électrostatiques), ces interactions peuvent s'étendre sur des distances relativement plus longues (**Kolenbrander et al., 2002 ; Dige et al., 2009**).

2.1.2.2 Adhésion irréversible

L'adhésion irréversible des "colonisateurs primaires" (*Streptococcus sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. mitis* ; *Actinomyces viscosus*) sur la PEA se fait par des interactions spécifiques de type ligand-récepteur. Les adhésines sont des structures fibrillaires protéiques polymérisés appelées fimbriae ou pili à la surface des cellules microbiennes, et des récepteurs complémentaires sont présents au niveau de la pellicule exogène acquise. Ces interactions appelés interactions sélectives sont solides et se produisent sur des distances courtes (**Fejerskov et al, 2003 ; Bonnaure Mallet et al., 2006**).

Les fimbriae de type 1 des streptocoques du groupe mitis permettent l'adhésion microbienne sur la PEA grâce à des ligands constitués par certaines glycoprotéines et mucines salivaires, des oligosaccharides de membranes de cellules épithéliales, ou encore par l'amylase salivaire. Les fimbriae de type 2 (par exemple, ceux d'*Actinomyces viscosus* ou *A. naeslundii*) forment des liaisons de type lectine (liaison entre un résidu glucidique et une protéine), soit avec d'autres bactéries (coagrégation avec des streptocoques, en particulier du groupe mutans), soit avec les cellules épithéliales. Les fimbriae permettent d'installer un contact à distance entre une bactérie et son substrat de fixation en créant un pont entre le corps bactérien et la surface à coloniser. Ça permet ainsi le passage d'une fixation bactérienne de la phase réversible à la phase irréversible (**Gracieux et al., 2006**).

Le dernier type d'interaction est la liaison enzyme-substrat, par exemple l'enzyme glycosyl-transférase intégrée à la surface de *S. mutans* (permet la synthèse des glycanes en présence de saccharose), lui permette une forte adhésion à la PEA. Le glucane aide les *Streptococcus mutans* ainsi que d'autres bactéries qui s'organisent en agrégats à s'adhérer et à s'accumuler, il constitue de ce fait un constituant primordial du biofilm dentaire. Les streptocoques sécrètent une matrice extracellulaire qui participe à l'adhérence irréversible.

Cette matrice (appelée aussi glycocalyx) est constituée de glycanes insolubles, mais aussi de glycanes et fructanes solubles et d'hétéropolymères. Elle joue un rôle actif et constitue à l'intérieur du biofilm une réserve de nutriments, d'eau et d'enzymes. On a constaté que l'inhibition *in vitro* des glycosyl transférase par des ions métalliques divalents (Fe^{+2}) réduisait le caractère cariogène d'une plaque (**Devulapalle et Mooser, 2001 ; Gracieux et al., 2006**).

2.1.3 La coagrégation et interactions bactériennes

Les Streptocoques viridans, et surtout *S. gordonii* représentent les premiers colonisateurs. De nombreuses espèces de bactéries nouvellement présentes adhèrent et se coagrègent sur ces colonisateurs précoces, ce qui facilite leur survie. *Streptococcus* est le seul genre bactérien buccal qui démontre une vaste coagrégation intra et inter générique. La coagrégation peut se faire uniquement entre les micro-organismes qui ont des récepteurs compatibles, et est dépendante de la présence d'adhésines d'une part et de leurs ligands d'autre part (**Kolenbrander et al., 2006**). Cette coagrégation est bénéfique pour ces microorganismes, par exemple l'élimination du lactate par les Streptocoques qui devient une source de carbone pour la croissance de *Candida albicans*. L'acide lactique est également utilisé par *Veillonella* qui produit de la vitamine K ou ménadione inévitable à la croissance des bactéries à Gram négatif (*P. gingivalis*), et l'hydrogène est utilisé par *Campylobacter rectus* qui apporte un facteur de croissance proche de l'hémine, qui contribue à la croissance de certains bacilles à Gram négatif (*Porphyromonas, Prevotella*). La présence de l'oxygène est réduite, ce qui stimule la croissance des bactéries anaérobies facultatives. La coagrégation consiste en fait à la succession bactérienne associée au déplacement de la dominance initiale des espèces du genre *Streptococcus* dans le sens de la prédominance d'autres genres bactériens (**Gracieux et al., 2006**).

2.1.4 Maturation du biofilm

Les colonisateurs secondaires, comme *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* spp., *Treponema* spp., et *Porphyromonas gingivalis* (**Kolenbrander et al., 2002**) interagissent via les interactions adhésines-récepteurs avec les colonisateurs primaires. La densité des bactéries du biofilm augmente rapidement au fur et à mesure que les colonisateurs tardifs s'attachent aux premières couches de biofilm et commencent à se répliquer. Les bactéries constituant la structure tridimensionnelle du biofilm produisent en continu les composants extracellulaires. Les vides et les canaux

commencent à se former grâce à l'écoulement des fluides et à l'apport de nutriments de l'environnement (**Stoodley *et al.*, 1998**).

Au cours du temps, en raison de la variété des espèces microbiennes, se forme différents gradients de nutriments, de pH ou d'oxygène. Cela conduit à différents micro-environnements permettant la coexistence et la coagrégation de différentes espèces (**Marsh, 2009**). Une multitude d'interactions entre les cellules bactériennes commencent à se réaliser, aidant le biofilm à se réguler en fonction des changements environnementaux ou des défenses de l'hôte (**Miller et Bassler, 2001**). Cette communication se fait principalement par le biais d'une signalisation chimique de cellule à cellule appelée détection de quorum (QS). Les bactéries sécrètent de petites molécules de signalisation appelées auto-inducteurs, afin de contrôler leur comportement en fonction de la densité de population dans l'environnement environnant (**Miller et Bassler, 2001 ; Konovalova et Sogaard-Andersen, 2011**). La concentration locale de molécules de signalisation libérées par une seule bactérie est faible, mais la concentration de ces auto-inducteurs peut atteindre un seuil qui permet aux bactéries d'activer ou d'inactiver des gènes particuliers quand le nombre de bactéries présents est suffisant (**Senadheera et Cvitkovitch, 2008**). La détection du quorum dans les biofilms régule le mouvement de l'information génétique entre et au sein des microbes (transfert de gènes) qui contribuent à la formation et à l'évolution bactériennes. La communauté complexe de bactéries continuera de croître et de produire une matrice jusqu'à ce que la plaque mature soit formée avec une épaisseur maximale atteinte (**Madsen *et al.*, 2012**).

2.1.5 Détachement cellulaire

Les forces de cisaillement causées par l'écoulement de salive ou lors de la mastication peuvent éliminer les micro-organismes des surfaces buccales et restreindre toute expansion supplémentaire de la plaque dentaire (**Hall-Stoodley *et al.*, 2004**). La dispersion des biofilms est un phénomène important dans la prolifération de ces derniers, car les cellules détachées (cellules de dispersion), peuvent coloniser de nouveaux endroits dans la bouche et démarrer un nouveau cycle de biofilms (**Singh *et al.*, 2002**). Le processus de détachement présente des problèmes cliniques car certaines espèces bactériennes, comme *S. mutans*, peuvent pénétrer dans la circulation sanguine et provoquer une bactériémie et une endocardite. En général, la dispersion du biofilm peut être classée en deux catégories principales: une dispersion passive, où des forces externes ou une action humaine provoquent le détachement des cellules de la plaque dentaire, et une dispersion active, où c'est les cellules elles-mêmes qui se détachent du biofilm à cause des conditions défavorables (**Kaplan, 2010**), la plupart des agents de

détachement libérés sont des enzymes à fonctions dégradantes (Kaplan, 2014). Kaplan et ses collaborateurs (2003) ont découvert que la bactérie buccale *Aggretinobacter actinomycetemcomitans* produit une enzyme extracellulaire particulière (Dispersin B) qui régule la dispersion du biofilm buccal par la dégradation des composants de la matrice (N-acétyl-D-glucosamine).

(2009).

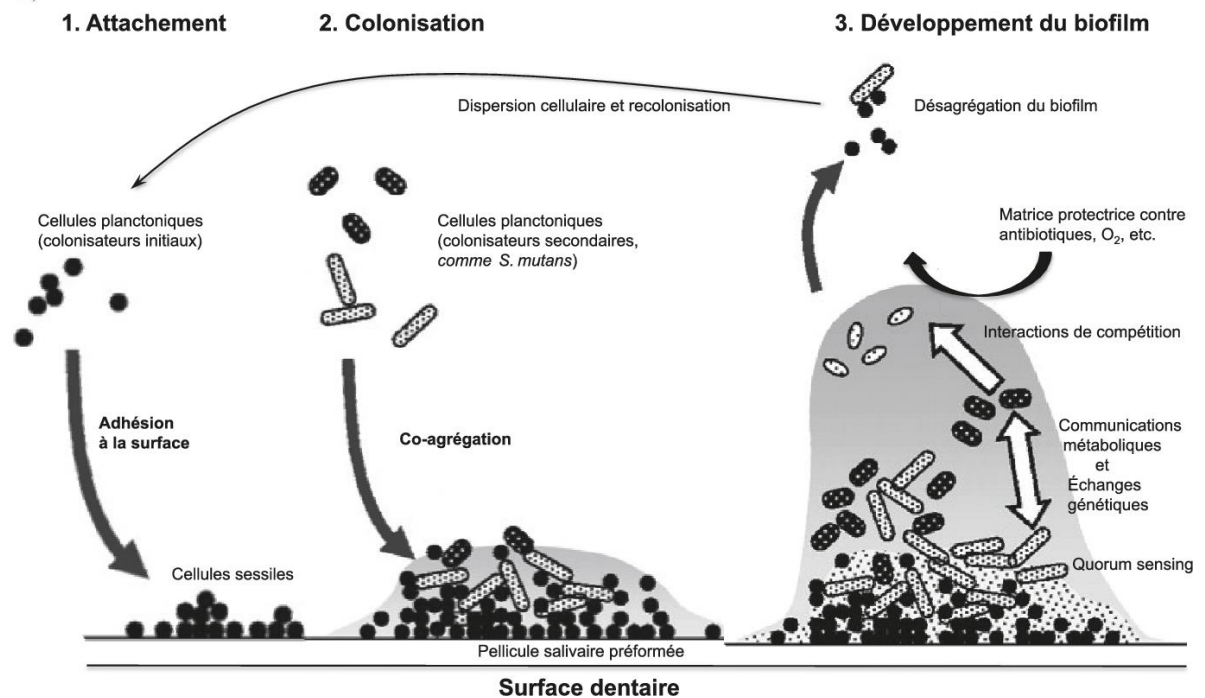


Figure 10. Etapes de la formation de la plaque dentaire (Hojo *et al.*, 2009)

2.2 Transitions des biofilms bucaux

2.2.1 Biofilm supragingival

Des études antérieures ont étudié la succession des bactéries dans les échantillons de biofilm supragingival au cours de quelques heures, à jours et mois après le nettoyage professionnel. Les résultats ont confirmé l'adhésion et l'attachement spécifique des premiers colonisateurs à la surface de la dent par des bactéries classées comme complexe jaune, il s'agit de *S. intermedius*, *S. oralis* et *S. mitis*. Suite à l'élimination du biofilm, d'autres espèces ont recolonisé l'environnement supragingival, comme *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Neisseria mucosa* et *Fusobacterium nucleatum et Eikenella corrodens*. Une élévation a été observée dans le nombre bactérien au sein des biofilms supragingivaux chez

les sujets présentant des parodontites par rapport aux sujets sains, en revanche les deux groupes cliniques ont montré un schéma semblable de microbiote. Une prédominance a été enregistrée dans les échantillons de biofilm supragingival sains et ayant une parodontite par les bactéries tels que *S. mutans*, *S. anginosus*, *Selenomonas noxia*, *Prevotella melaginononica*, *Propionibacterium acnes*, *Treponema sokranskii*, *Neisseria mucosa* et *Leptotrichia buccalis*. Ces changements dans la composition microbienne de la plaque ont une grande importance car ils sont en corrélation avec l'apparition d'une inflammation gingivale (**Díaz et Kolenbrander., 2009 ; Aruni et al., 2015**). La plaque supragingivale est un facteur environnemental majeur qui peut influencer sur la sensibilité aux maladies parodontales. Il a été confirmé depuis plusieurs années que l'éradication de la plaque supragingivale entraîne un abaissement de la gingivite (**Tezal et al., 2006**).

2.2.2 Biofilm sous-gingival

Les premiers colonisateurs sont généralement des bactéries anaérobies facultatives, mais dès que l'épaisseur du biofilm augmente et que les métabolites bactériens à faible potentiel d'oxydo-réduction s'accumulent, un gradient d'oxygène se forme permettant ainsi la prolifération des organismes moins résistants à l'oxygène, en particulier les anaérobies obligatoires. En effet, la composition du biofilm de la plaque change au cours du temps pour intégrer d'avantage de bactéries anaérobies à Gram négatif (**Díaz et Kolenbrander., 2009**).

Le microbiote sous-gingival est composé d'une communauté microbienne unique dominée par des bactéries anaérobies et protéolytiques obligatoires, impliquées dans le développement de la parodontite, l'une des principales causes de perte de dents. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia* appelés complexe rouge, sont grandement accordés à la poche parodontale et représentent les agents étiologiques de la parodontite (**Kageyama et al., 2017**). Certaines de ces bactéries anaérobies sont considérées comme des parodontopathogènes (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemocitans*, *Tannerella forsythia*, spirochetes, etc.) et provoquent la parodontite. On estime que les parodontopathogènes détournent la défense de l'hôte et renforcent l'inflammation destructrice des tissus (**Kolenbrander et al., 2010**)

La succession microbienne de la communauté sous-gingivale et la progression de la maladie qui s'en suit sont complexes vu la grande variété de cette communauté. Chez les individus en bonne santé, les parodontopathogènes sont présents en petite quantité, alors que les Streptocoques, les Actinomyces et les Veillonelles dominent. Une mauvaise hygiène

bucco-dentaire modifie l'environnement pour favoriser la propagation accrue de parodontopathogènes, aboutissant à un décollement gingival et une perte osseuse et dentaire (Kolenbrander *et al.*, 2010).

3. Biofilms microbiens et maladies buccales et systemiques

3.1 Biofilms microbiens et maladies buccales

Les biofilms buccaux s'accumulent progressivement dans nos bouches et une bonne hygiène bucco-dentaire est fondamentale pour empêcher leur établissement et leur progression. Il est bien évident que l'environnement buccal fournit les nutriments essentiels qui favorisent la croissance et la maturité de la communauté bactérienne et leur association entraîne certainement des problèmes de santé, telles que les caries dentaires, la gingivite, la parodontite et la candidose buccale (Metwalli *et al.*, 2013).

3.1.1 La carie

La carie dentaire est l'une des maladies infectieuses buccales les plus fréquentes provoquée par le biofilm buccal, elle est considérée comme l'une des pathologies les plus répandues dans le monde (Bowen *et al.*, 2018).

Certaines études ont mis en évidence l'importance d'une variété de facteurs comme la constitution génétique de l'organisme, les aspects immunologiques et ses aspects comportementaux avec l'environnement hôte. L'infection carieuse est répandue chez tout les types d'âges, cependant, elle est plus courante chez les enfants où un niveau élevé de caries a été constaté et ceci en partie à cause de leur forte consommation de sucres, qui ont une relation positive avec les caries dentaires (WHO, 2015 ; Vasudevan., 2017).

Le développement de la carie dentaire implique une prédominance par des bactéries aciduriques, notamment les *Actinomyces*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* qui ont été pendant longtemps considérés comme les agents étiologiques de la carie. Cependant, récemment une forte symbiose a été constatée entre *Streptococcus mutans* et *Candida albicans*, conduisant à un accroissement de la masse du biofilm et de la densité cellulaire, ainsi qu'à une virulence accrue. D'autres travaux, ont démontré que la colonisation de *C. albicans* améliorerait probablement la cariogénicité du biofilm buccal, en augmentant le rapport *Streptococcus mutans* / *Streptococcus sanguinis* (Falsetta *et al.*, 2014 ; Dame-Teixeira *et al.*, 2016; Hwang *et al.*, 2017).

Les Streptocoques, les organismes les plus abondants dans les biofilms oraux, fermentent les glucides de faible poids moléculaire en acides. Après les repas, les glucides sont abondants, le métabolisme bactérien atteint des pics, le pH peut chuter à 5, ce qui provoque la dissolution de l'émail. Au fur et à mesure de l'abaissement du pH, les bactéries tolérantes aux acides dépassent les autres bactéries et constituent ainsi une proportion plus élevée de la communauté ce qui conduit à des lésions carieuses (**Kolenbrander *et al.*, 2010**) (**Figure 11**). Lorsque les glucides alimentaires sont épuisés, le pH augmente et la dissolution de l'émail cesse, et le processus de reminéralisation peut être activé. Un point important de l'hypothèse de la plaque écologique est que chez une personne en bonne santé, ces deux processus de déminéralisation et de reminéralisation s'équilibrent, cependant chez un individu avec des caries actives, cet équilibre est déplacé vers la déminéralisation (**Ilie, 2014**).

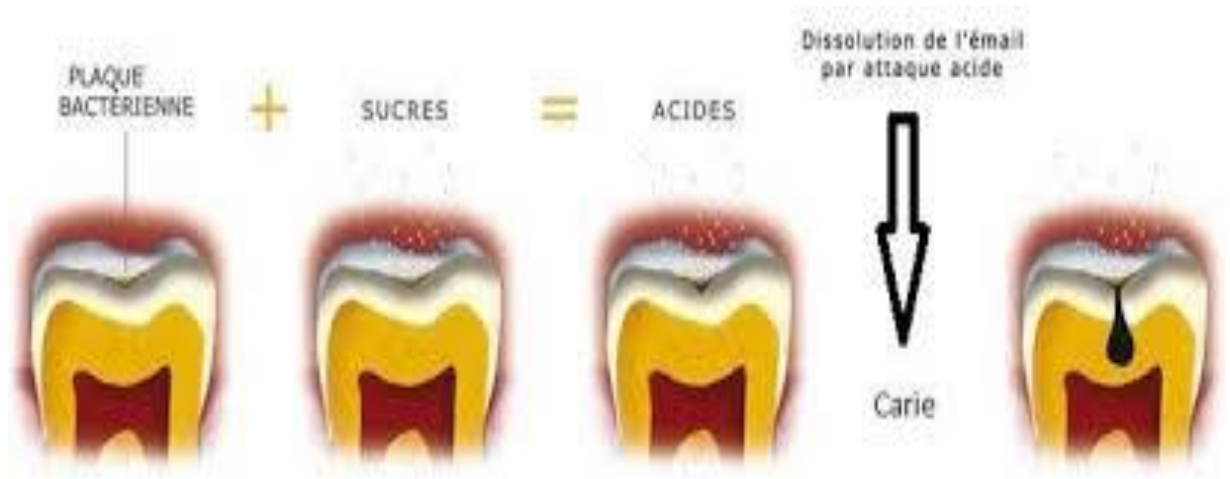


Figure 11. Déclenchement de la lésion carieuse (**Kahouadji *et al.*, 2018**).

3.1.2 La gingivite

Plusieurs types de gingivites sont observées, dont la plus courante est la gingivite induite par la présence de plaque dentaire. C'est une infection du tissu gingival, où la bactérie est responsable de l'inflammation du tissu. Les symptômes comprennent une rougeur, une apparence enflée et des saignements des gencives (**Figure 12**). Ici, aucune perte d'attache n'est observée, ni aucune atteinte osseuse n'est mise en évidence. En revanche, si cette infection n'est pas traitée au début quand elle est au stade réversible, elle s'aggrave en maladie parodontale appelée parodontite (**Chandrasoma et Taylor, 2005; Noble, 2012 ; Arveux, 2016**).

3.1.3 La parodontite

La parodontite est une maladie infectieuse buccale initiée par des agents pathogènes parodontaux et influencée par la réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte, qui entraîne une destruction progressive des tissus parodontaux, comme la gencive, le ligament parodontal et l'os alvéolaire (**Figure 12**) (**Hajishengallis, 2015; Kinane et al., 2017**).

A l'issue de la formation des biofilms microbiens initiateurs de la parodontite, une réponse du système immunitaire de l'hôte est déclenchée. L'ampleur et le type de la réponse de l'hôte dépendent de l'hôte et des bactéries. Ainsi, une compréhension de l'interaction des cellules hôtes structurelles et défensives avec le biofilm de la plaque microbienne est essentielle pour découvrir l'étiologie des maladies parodontales et pour développer des thérapies adaptées. Ces dernières années, le concept selon lequel les bactéries peuvent être associées au développement d'un cancer a été bien documenté (**Inaba et al., 2014 ; Sztukowska et al., 2016**). Des études ont révélé que *P. gingivalis* était positivement corrélé aux stades cliniques, au degré de différenciation et aux métastases lymphatiques du cancer buccal. De plus, *P. gingivalis* a pu activer les voies classiques impliquées dans la tumorigenèse associée à l'inflammation, en induisant des gènes liés à la tumeur tels que NNMT, FLI1, GAS6, lncRNACCAT1, PDCD1LG2 et CD274. Tous ces résultats suggèrent que *P. gingivalis* pourrait être un facteur de risque pour le développement précoce et la progression du cancer buccal (**Könönen et al., 2019 ; Xu et al., 2018**).

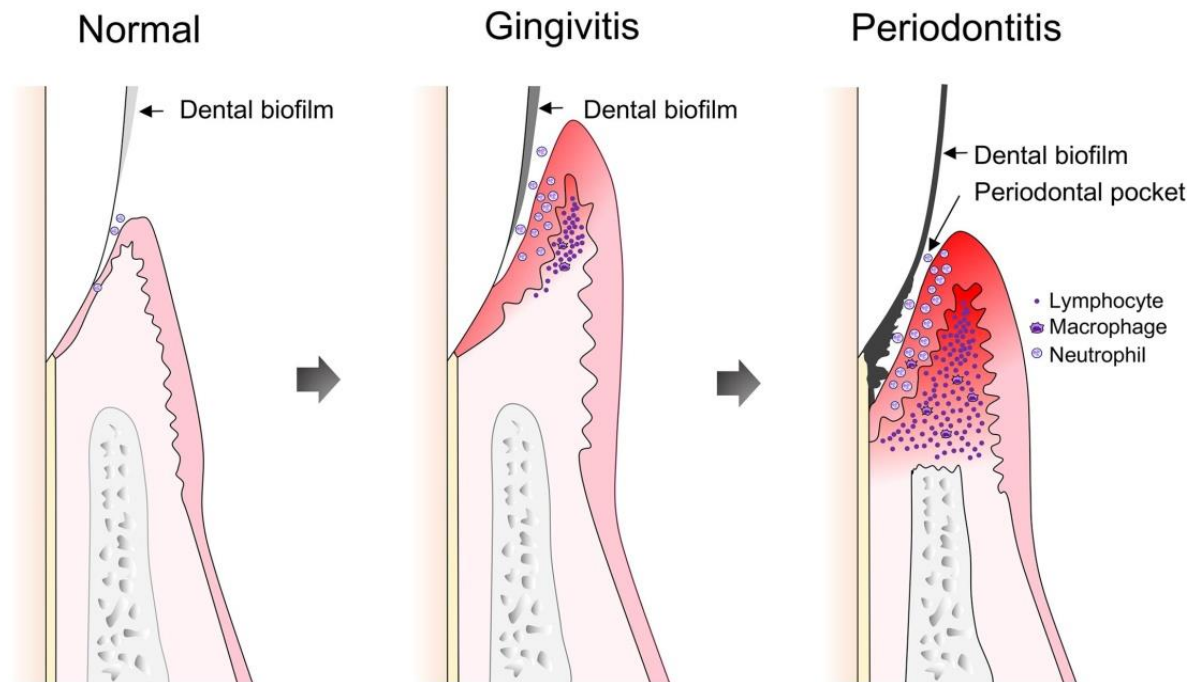


Figure 12. Développement de la gingivite et de la parodontite (Kriebel *et al.*, 2018).

3.1.4 Candidose buccal

La candidose buccale causée dans 95% des cas par *C. albicans* est l'une des pathologies buccales opportunistes les plus courantes, d'autres espèces, comme *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis* ou *Candida guilliermondii* peuvent également provoquer cette infection. La candidose est une maladie bénigne des muqueuses buccales, mais peut parfois être résistante au traitement ou devenir récurrente (Quindós *et al.*, 2019). La colonisation de *Candida* spp. des muqueuses se fait généralement dès la naissance (Waggoner-Fountain *et al.*, 1996). Cette levure fait partie du microbiote buccal chez environ 75% des individus sains. Dans des conditions particulières, *candida* peut passer de la forme inoffensive à la forme pathogène, provoquant par la suite une infection. Plusieurs types de candidoses ont été enregistrés, allant d'une forme asymptomatique à une forme très sévère comme la sensation de brûlure, douleur et saignements. La candidose est le résultat d'un déséquilibre au sein du microbiote buccal, provoqué par une mauvaise hygiène bucco-dentaire, des prothèses mal entretenues, le diabète, l'infection par le VIH et la consommation de médicaments tels que les antibiotiques, corticoïdes et immunodépresseurs (Mundula *et al.*, 2019) (Figure 13).

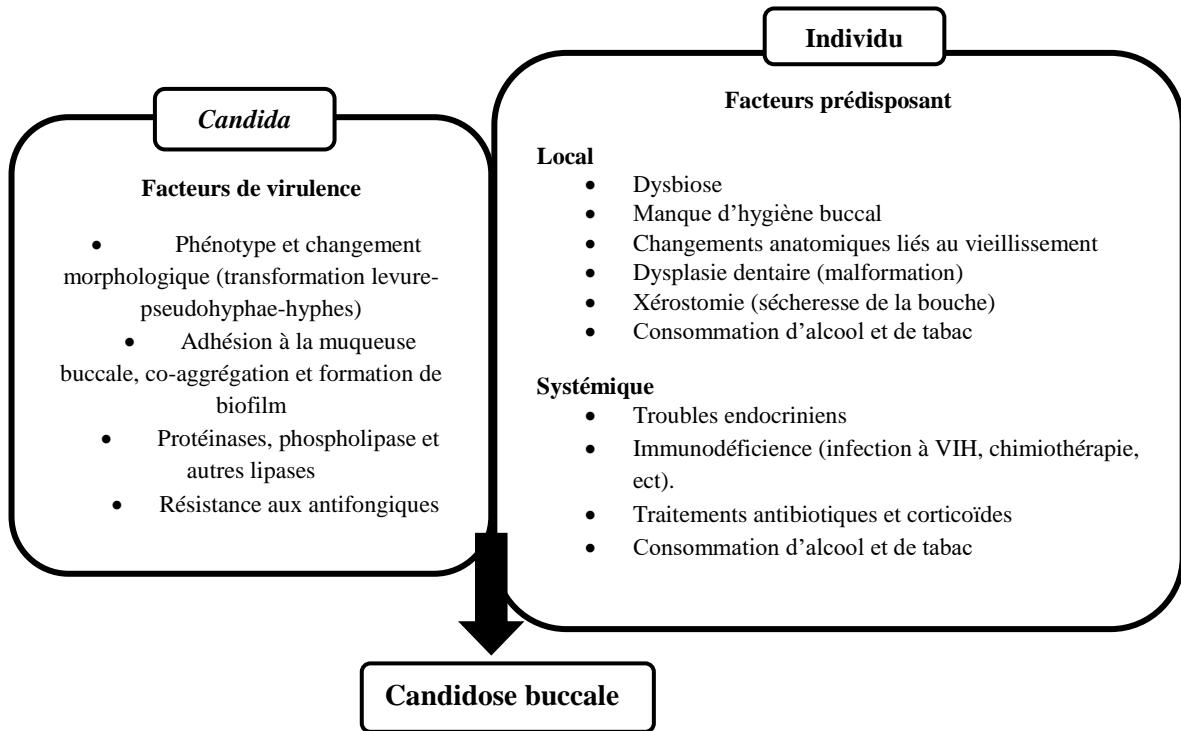


Figure 13. Facteurs impliqués dans la pathogenèse de la candidose buccale (**Quindós *et al.*, 2019**)

3.2 Biofilms microbiens et maladies systemiques

La virulence des biofilms oraux est habituellement limitée à la cavité buccale. Néanmoins, lorsque ces microorganismes ou leurs produits pénètrent dans les tissus conjonctifs ou la circulation sanguine, le risque de certaines maladies systémiques peut s'accroître tels que le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies respiratoires, l'obésité, le cancer du pancréas, la maladie d'Alzheimer et les avortements (**Dunavant *et al.*, 2006 ; Pucar *et al.*, 2007 ; Lalla et Papapanou, 2011**).

Des études effectuées sur des patients atteints de la maladie intestinale inflammatoire (MII), qui est une pathologie immuno-dysfonctionnelle de plus en plus répandue dans le monde, ont démontré une dysbiose dans la structure, la composition et la fonction du microbiote buccal, et ont désigné la possibilité du diagnostic et du pronostic de la MII basés sur le microbiote buccal. Les résultats ont signalé que les *Klebsiella* spp. du microbiote buccal colonisaient l'intestin et pouvait être à l'origine d'une inflammation intestinale chronique (**Atarashi *et al.*, 2017**).

4. Interactions bactériennes-fongiques au sein du biofilm buccal

Au sein d'un biofilm, il existe une coopération interspécifique entre les populations microbiennes. *C. albicans*, est le champignon le plus largement impliqué dans les infections buccales, il est également amplement détecté dans les plaques dentaires des individus ayant des lésions carieuses (**Elias et Banin, 2012; Yang et al., 2012**).

C. albicans adhère principalement à la muqueuse buccale ainsi qu'aux surfaces acryliques, elle peut se co-agréger et interagir avec certaines bactéries buccales telles que *S. mutans*, *S. gordonii*, *P. gingivalis* et *P. aeruginosa*, elles vont communiquer par signalisation pour provoquer des infections des muqueuses. *C. albicans* va jouer le rôle de pont entre la muqueuse et les bactéries qui n'ont pas le potentiel d'adhérer aux muqueuses, évitant ainsi leurs éliminations par le flux salivaire ainsi que leurs déglutitions, les rendant plus résistantes aux antibiotiques (**Kolenbrander et al., 2010; Pereira-Cenci et al., 2008; Jarosz et al., 2009 ; Silverman et al., 2010**).

L'adhérence entre les bactéries et *C. albicans* est possible grâce aux glycoprotéines des surfaces cellulaires comme la Als3p, qui n'est présente que sur la paroi cellulaire hyphale, ces glycoprotéines sont essentielles à la co-adhésion des communautés microbiennes mixtes dans les biofilms et sur les muqueuses (**Harriott et Noverr, 2009; Peters et al., 2012**). *C. albicans* peut favoriser ou réprimer la croissance de certaines bactéries, en effet elle a la capacité de changer les conditions environnementales en augmentant le pH, ce qui va permettre la croissance de beaucoup d'espèces bactériennes. En plus de sa capacité à produire des métabolites secondaires qui ont une action antimicrobienne, par exemple le farnéol qui réprime les facteurs de virulence de *S. mutans*. D'un autre côté, *E. faecalis* inhibe la morphogénèse hyphale de la levure, ces deux souches ont une influence négative l'une sur l'autre (**Cruz et al., 2013 ; Fernandes et al., 2018**). Ainsi, les champignons et les bactéries, produisent des métabolites responsables de changements de l'environnement, ce qui les affectes mutuellement (**Krom et al., 2014**).

5. La résistance du biofilm aux antimicrobiens

Les infections liées au biofilm constituent un problème de santé grave, représentant 65 à 80% de toutes les infections (**Macià et al., 2018**). La résistance des biofilms aux antibiotiques et aux agents antimicrobiens conduit à des infections chroniques, en effet les cellules qui vivent en communauté sont jusqu'à 1000 fois plus tolérantes aux antibiotiques que les cellules planctoniques (**Lewis, 2001**). Par exemple, la concentration en chlorhexidine et fluorure d'amine nécessaire à éradiquer *Streptococcus sobrinus* vivant en biofilm, était 300 et 75 fois plus élevée respectivement, que les concentrations minimales bactéricides des cellules planctoniques. De même, pour *Streptococcus sanguinis*, où la concentration en chlorhexidine était 10 à 50 fois plus élevée pour tuer les cellules en biofilms par rapport aux cellules planctoniques (**Marsh, 2011**). Il a été démontré que les jeunes biofilms sont beaucoup plus sensibles aux antibiotiques que des biofilms matures, soulignant l'intérêt des interventions précoces dans le traitement des infections à biofilms (**Ciofu et Tolker-Nielsen, 2019**). Plusieurs facteurs ont un rôle dans la résistance du biofilm aux antibiotiques, dont on peut citer :

5.1 La matrice d'exopolysaccharide (EPS)

La matrice d'EPS est considérée comme primordiale à l'existence du mode de vie en biofilm, elle permet la pleine expression de la virulence des bactéries pathogènes, et elle limite également la diffusion des agents antimicrobiens (**Branda et al., 2005**), elle constitue la majorité de la structure du biofilm et fournit l'architecture physique et la solidité du biofilm (**Hall-Stoodley et al., 2004 ; Flemming et Wingender, 2010**). La matrice protège les bactéries intégrées et crée des niches adéquates, ce qui permet aux microorganismes d'interférer les uns avec les autres, de s'adapter, et de modifier l'environnement local. Les principaux constituants de la matrice sont l'eau, une grande variété de protéines qui ont un rôle structurelle et enzymatique, des glycoprotéines et des glycolipides et, dans certains cas de l'ADN extracellulaire (ADNe) qui permet l'adhésion, l'agrégation et l'échange d'informations génétiques. Le pourcentage de la constitution de la matrice d'un biofilm en EPS varie selon les organismes présents et de l'environnement physicochimique avoisinant.

Le composant primordial de la matrice sont les polysaccharides, plusieurs sont spécifiques à la souche, ils peuvent être hydrophiles ou hydrophobes ce qui permet de définir l'agissement de la matrice à l'interface (**Fabbri, 2016**). La matrice des biofilms cariogéniques est essentiellement composée de polysaccharides produits par les exoenzymes de *S. mutans*, qui sont reconnus comme facteurs de virulence primordial aux infections carieuses (**Bowen et**

Koo, 2011). *S. mutans* permet d'orchestrer l'évolution de biofilms cariogènes grâce aux exoenzymes, comme les glucosyltransférases (Gtfs), qui sont des constituants de la pellicule et qui ont la capacité de se lier aux surfaces microbiennes. Ces enzymes vont métaboliser le saccharose ou l'amidon en glucanes, qui fournissent une abondance de sites de liaison primaires et forment le cœur de la matrice dans les biofilms cariogéniques (**Koo et al., 2013**).

5.2 Le quorum sensing

La détection de quorum (QS) est un processus de communication de cellule à cellule bactérienne qui implique la production, la détection et la réponse à des molécules de signalisation extracellulaires appelées autoinducteurs (AI). Au fur et à mesure que la population bactérienne augmente, les AI s'accumulent dans l'environnement, ce qui procure aux bactéries des informations sur leur densité pour pouvoir changer collectivement l'expression des gènes (**Figure 14**). Le QS contrôle les gènes dont l'expression est bénéfique quand elle est exécutée par des groupes bactériens en synchronisation. Parmi les fonctions maîtrisées par le QS, on a la bioluminescence, la production d'antibiotiques, la sporulation, la compétence, la formation de biofilm et la sécrétion de facteurs de virulence (**Rutherford et Bassler., 2012**).

Il existe différents types de molécules de signalisation parmi lesquelles : l'autoinducteur-2 (AI-2) et le CSP (Competence-stimulating peptide). Le premier fait partie des molécules de signalisation les plus connus, dont la synthèse est catalysée par une enzyme LuxS codée par le gène luxS, qui est hautement conservé dans le génome de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif. Un bon nombre d'expérimentations suggèrent que les bactéries buccales ont un système de quorum-sensing qui dépend de LuxS/AI-2 (**Hojo, 2009**). L'AI-2 est produit par de nombreuses espèces notamment les streptocoques oraux parmi lesquelles *Streptococcus gordonii* et *Streptococcus mutans*, également *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* (**Houvion, 2014**).

D'autre part, la CSP est un petit peptide soluble constitué de 14 à 23 acides aminés, il est produit par plusieurs espèces de streptocoques oraux. Le rôle de la CSP consiste en la production de bactériocine, certains facteurs de virulence et la formation de biofilm. La CSP permet également d'améliorer la compétence génétique de la bactérie ce qui va lui permettre de pouvoir intégrer un ADN exogène dans les cellules (**Houvion, 2014**).

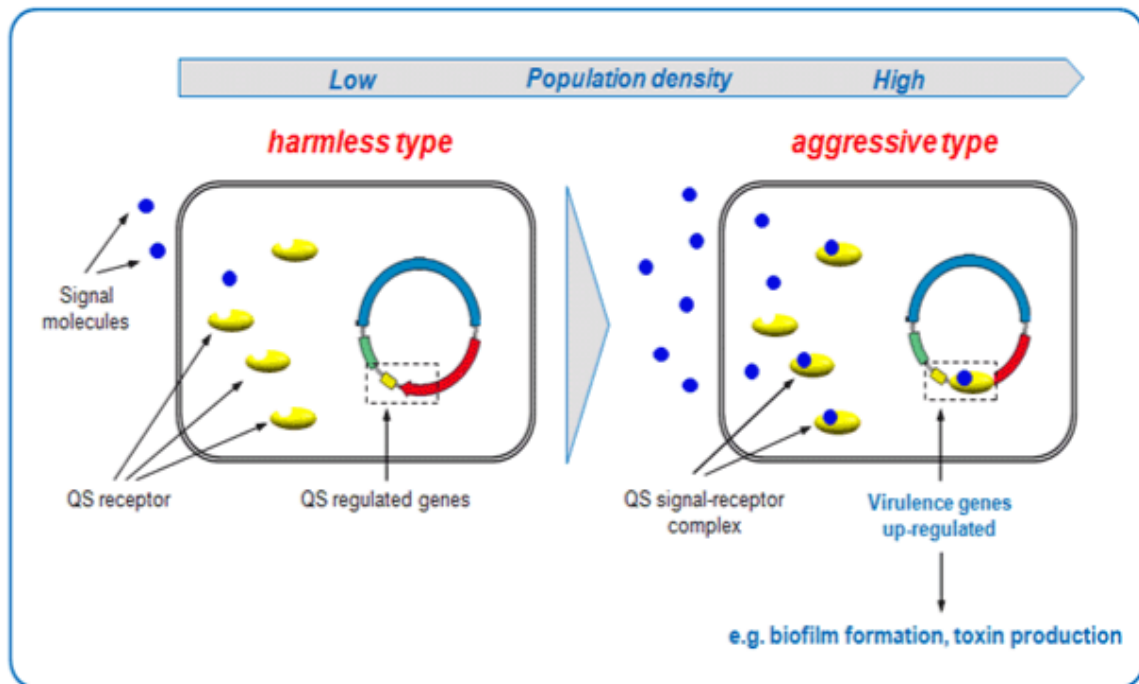


Figure 14. L'initiation du mécanisme de détection du quorum par rapport à la densité cellulaire. <http://www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm/>

5.3 Transfert de gène au sein du biofilm

Le quorum sensing, a des implications dans la pathogénèse par la production de facteurs de virulences chez les bactéries commensales, notamment par le transfert de gènes, qui peut transformer une bactérie non pathogène en une bactérie très virulente, il peut en suivre de grave problèmes de santé (Bello-López *et al.*, 2019) .

Il est bien connu que les biofilms multispécifiques sont plus résistants aux antimicrobiens que les biofilms monospécifiques, la vie sous forme de biofilm, favorise le contact des bactéries entre elles, ce qui facilite le transfert génétique par conjugaison, qui est essentiel à l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (Figure 15). De plus, lorsque les biofilms sont soumis à un biocide particulier, les bactéries pathogènes ayant en leur possession les gènes de résistances aux antimicrobiens, peuvent les transférer aux autres bactéries au sein de la même communauté, permettant ainsi l'évolution d'un phénotype de biofilm plus résistant (Fabbri, 2016; Roux et Ghigo, 2006).

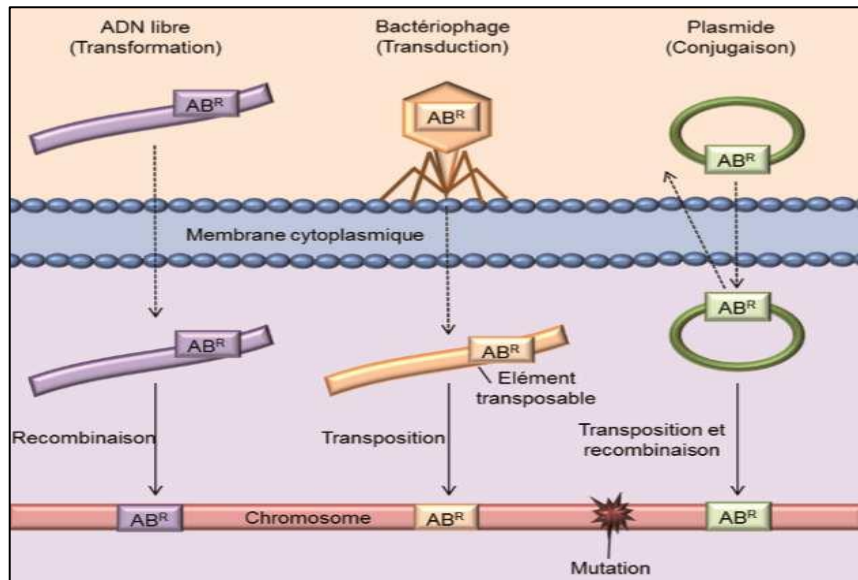


Figure 15. Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques. La résistance à un antibiotique peut se faire par : Mutation : au niveau du gène codant pour l'antibiotique sur le chromosome ; Transformation : par acquisition et incorporation de segment d'ADN résistant au niveau du chromosome ; Transduction : transfert de gènes de résistance lors d'une infection par un bactériophage ; Conjugaison : transfert de transposons conjugatifs et de plasmides. ABR : gène de résistance à un antibiotique (Muylaert et Mainil, 2012).

5.4 Présence de bactéries persistantes

Un autre mécanisme joue un rôle important dans la tolérance du biofilm aux antibiotiques, la présence de bactéries en dormance appelées cellules persistantes (persistor cells) (Lewis, 2007). Les bactéries persistantes représentent seulement 1% de la population, leur génome est identique à celui des autres bactéries. Elles ne se multiplient pas, mais reprennent une division normale d'une manière vraisemblablement aléatoire et encore mal comprise. Dans le cas d'une infection liée à des bactéries planctoniques, le système immunitaire induit par ces dernières permet d'éradiquer ces cellules persistantes, tandis que, au sein d'un biofilm les cellules persistantes sont protégées du système immunitaire et survivent aux antibiotiques (Lebeaux et Ghigo, 2012).

Lorsque la concentration d'antibiotiques dépasse un certain seuil, seules les cellules persistantes peuvent survivre. Ces cellules sont temporairement en dormance et quand l'effet des antibiotiques diminue, ces cellules vont donner naissance à une population similairement sensible à celle d'origine et vont également créer des cellules persistances en faible concentration, ce qui permet la reconstitution du biofilm et à la récurrence de l'infection. Leur indifférence à la présence d'antibiotiques peut s'expliquer par un arrêt global des processus indispensables à la croissance active, les processus mêmes visés par les antibiotiques n'étant plus opérationnels et donc plus sujets à inhibition (Fauvart *et al.*, 2011).

5.5 La pompe à efflux

L'élément bactérien responsable d'efflux actif est appelé « transporteur » ou « pompe » d'efflux. Il s'agit de protéines incrustées dans la membrane cytoplasmique qui participent à l'homéostasie cellulaire, elle restreint certaines molécules de s'accumuler en les exportant activement en dehors de la cellule bactérienne, notamment les antibiotiques, les détergents, les colorants, les toxines ainsi que les déchets métaboliques. Les gènes de la pompe à efflux sont portés soit sur les chromosomes soit sur les plasmides bactériens (**Bador, 2013 ; Alav et al., 2018**). Il ya deux types de transporteurs, il s'agit de pompes spécifiques qu'on appelle pompes SDR (pour specific- drug-resistance), ou des pompes qui agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour multiple-drug-resistance) (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Les transporteurs d'efflux sont regroupés en 5 familles selon la source d'énergie utilisée et selon des critères de taille et de structure protéique: les transporteurs primaires, il s'agit des ABC transporteurs (ATP-binding-casette), les transporteurs secondaires, qui utilisent le potentiel électrochimique membranaire; on a les SMR (Small Multidrug Resistance), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance/ Nodulation/ cell Division), MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). De ce fait, il ya des pompes à efflux qui utilisent leur énergie par hydrolyse de l'ATP (ABC), ou par dissipation d'un gradient de protons (SMR, MFS, RND) ou d'ions Na⁺ (MATE) (**Aires, 2011**) (**Figure 16**).

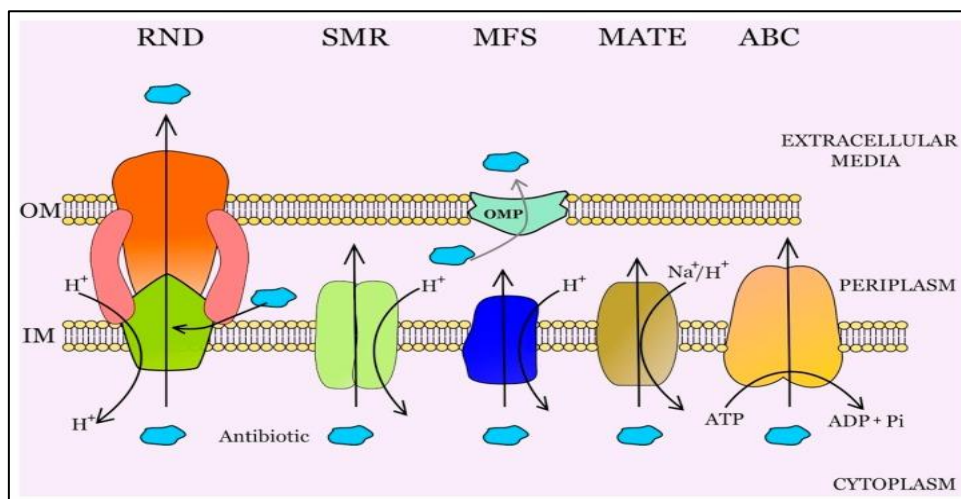


Figure 16. Schéma représentant les 5 familles de transporteurs d'efflux bactériens : RND, SMR, MFS, MATE et ABC (**Blanco *et al.*, 2016**).

6. Agents antibiofilm naturels

La nature continue de donner de nouveaux composés aux structures et activités biologiques intéressantes. Ces composés naturels ont servi d'échafaudages pour le développement d'une multitude d'agents thérapeutiques synthétiques. Actuellement, de nombreux chercheurs concentrent leurs études sur la découverte de nouveaux composés capables d'inhiber les biofilms, en effet, une variété de molécules dérivées de plantes naturelles ou d'extraits d'herbes médicinales ainsi que les mécanismes sous-jacents de la fonction antibiofilm ont été identifiés (**Rabin *et al.*, 2015**).

Les polyphénols représentent une classe de produits naturels végétales, qui jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agents pathogènes microbiens. La recherche de l'activité antibiofilm sur les polyphénols a révélé, outre leur activité destructrice sur les bactéries, des activités plus «douces» conduisant à la suppression du biofilm en affectant les mécanismes de régulation bactériens, sans effet sur leur croissance (**Slobodníková *et al.*, 2016**). En effet, les effets antibiofilm des produits naturels consistent en l'annulation de l'adhésion et de l'attachement des cellules, l'interruption de la synthèse de la matrice extracellulaire et la diminution de la production des facteurs de virulence, bloquant ainsi le réseau QS et le développement du biofilm (**Lu *et al.*, 2019**) (**Figure 17**). Les chapitres suivants vont se consacrer entre autre sur l'activité des polyphénols contre les agents microbiens responsables des caries dentaires et des maladies parodontales.

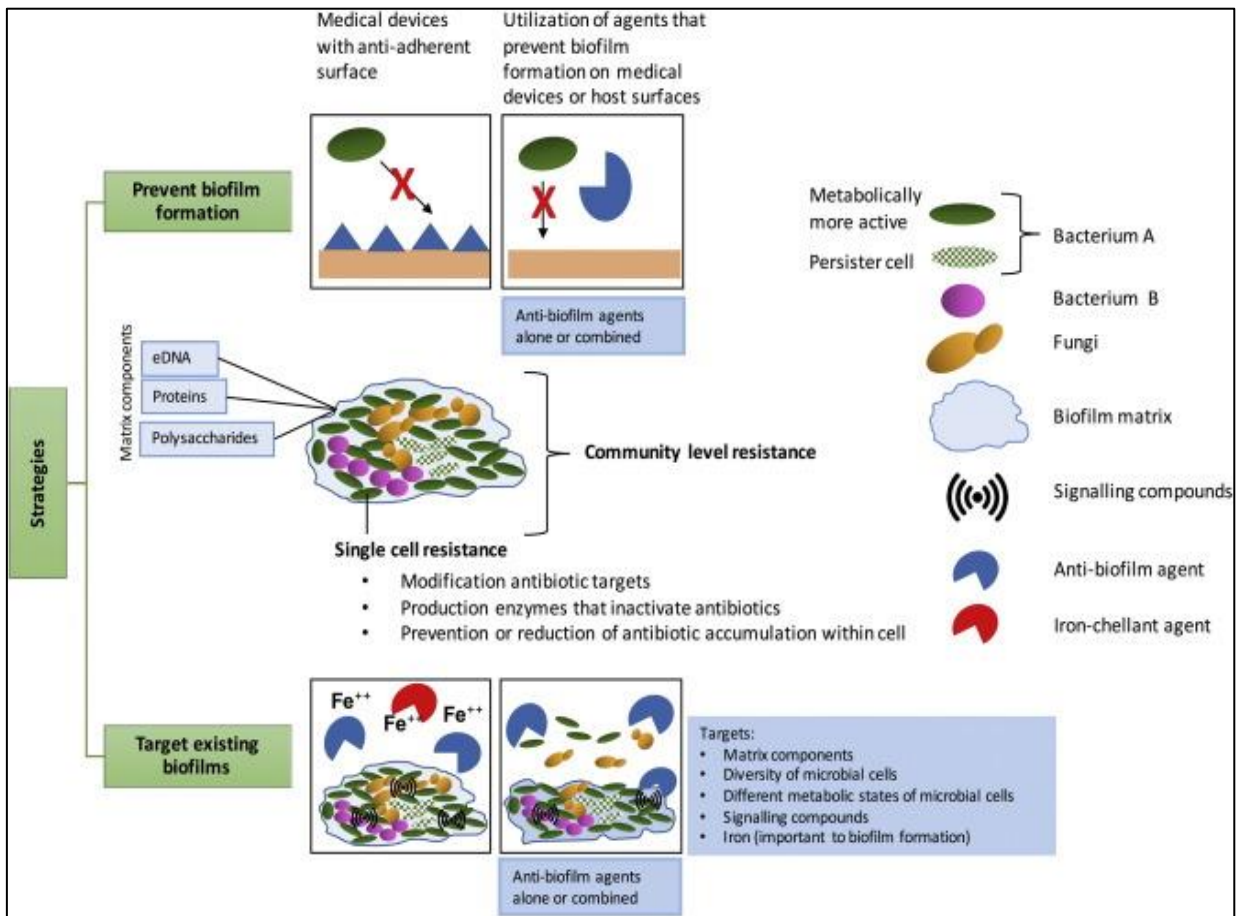


Figure 17. Diagramme montrant un profil commun de biofilm, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et les stratégies antibiofilm possibles (Ribeiro *et al.*, 2016).

Partie

Expérimentale

Chapitre IV :

Matériel et Méthodes

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé durant notre étude est constitué des écorces du fruit de *Punica granatum* (grenade) et des graines de *Cuminum cyminum* (Cumin) (**Figure 18**), ces deux plantes ont été sélectionnées pour étudier l'effet de leurs extraits sur la croissance et la formation des biofilms des souches responsables des infections bucco-dentaires.

La raison de la sélection de ces deux plantes, était leurs richesses en composés phytochimiques avec une myriade de propriétés biologiques. La grenade et le cumin ont une riche histoire d'utilisation en médecine traditionnelle. Des recherches antérieures avaient montré que la grenade ainsi que le cumin avaient une activité antibactérienne, antifongique et antioxydante prometteuse (Abbaszadegan *et al.*, 2016; Nozohour *et al.*, 2018).



Figure 18. Écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum*.

1.1 Récolte du matériel végétal

La récolte de la grenade variété Sefri a été effectuée durant les mois de Septembre-Octobre 2016 et 2017 (**Figure 19** et **Figure 20**) dans la commune de Hassi Mamèche (wilaya de Mostaganem) située à 35 ° 55'52 "N, 0 ° 05'21" E, à une altitude de 85 m et avec une superficie de 2269 km². Les températures annuelles moyennes et les précipitations totales sont de 17.9° C et 347 mm (obtenues à partir de www.fr.climate-data.org). L'épice *Cuminum cyminum* a été achetée chez l'épicier sous forme de graines. L'identification des plantes a été faite par les professeurs Mr Mekhaldi Abdelkader et Mr Chadli Rabah de l'université de Mostaganem.

Les écorces de la grenade ont été séchées à l'étuve à 30°C pendant sept jours. Une fois séchées, ces écorces ainsi que les graines de cumin ont été réduites en poudre pour être soumises à l'extraction.



Figure 19. Le grenadier *Punica granatum* dans la région de Hassi Mameche.

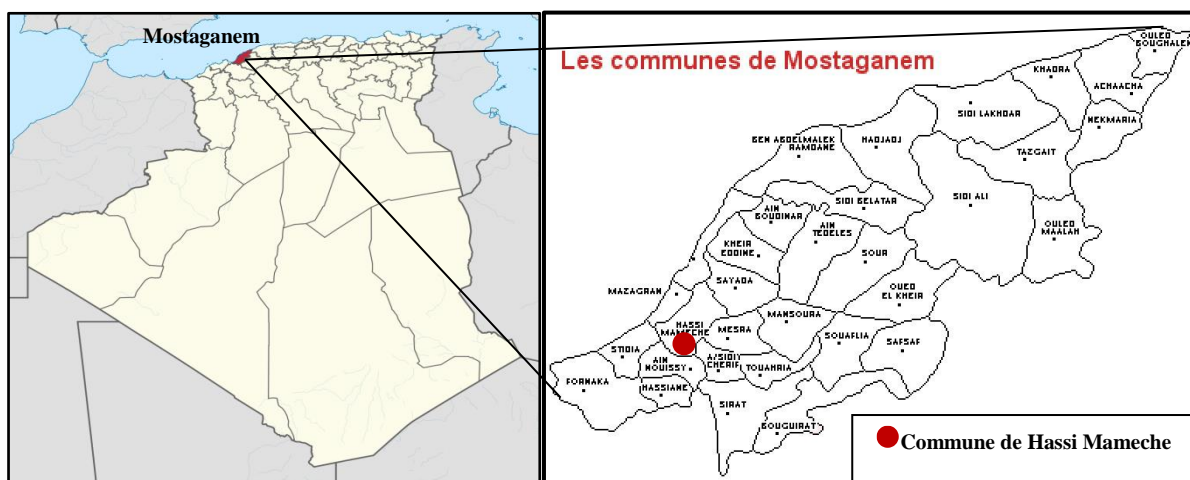


Figure 20. Carte géographique de la station de récolte de la grenade.

1.2 Extraction des composés phénoliques

1.2.1 Préparation des extraits bruts

L'extraction a été effectuée selon la méthode de Soares *et al.* (2009). Une quantité de 10 g de poudre végétale a été macérée dans 100 ml de chaque solvant d'extraction. Trois solvants à polarité croissante ont été ainsi testés : l'acétone aqueux, l'éthanol aqueux et le méthanol aqueux, avec des proportions de 70% (v/v). Les mélanges ont ensuite été agités pendant 24 heures à température ambiante.

Après cela, les solutions ont été filtrées par un papier filtre. Les filtrats de chaque extrait ont été combinés et concentrés en utilisant un rotavapor (Heidolph Laborota 4000) à 40°C. Les extraits bruts résultants ont été pesés et stockés à 4°C à l'abri de la lumière pour une analyse ultérieure (Figure 21).

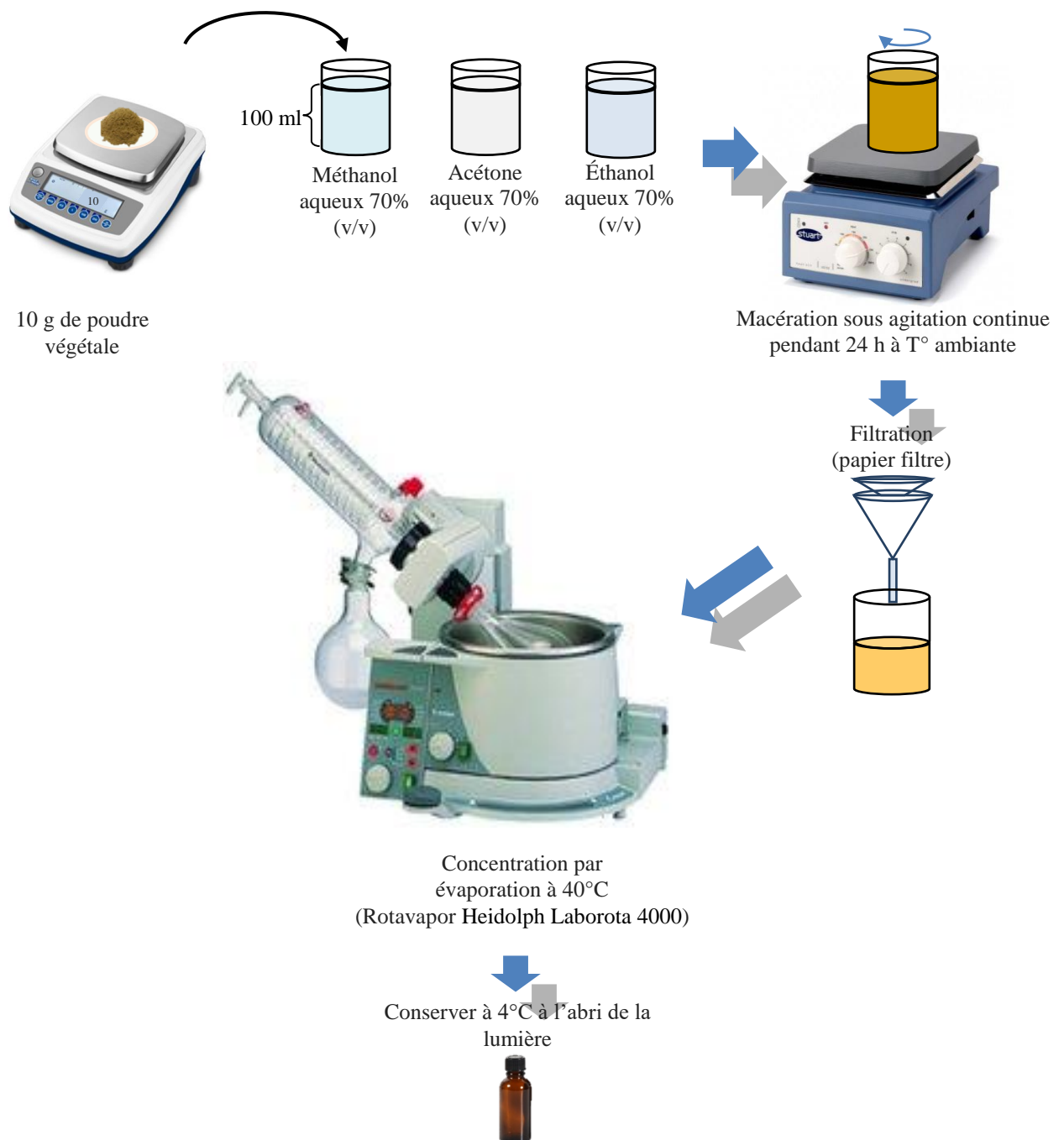


Figure 21. Différentes étapes de préparation des extraits bruts.

1.2.2 Le rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction (Abe *et al.*, 2010). Le rendement d'extraction des deux végétaux utilisés dans cette étude a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$RDT(\%) = \left(\frac{P_1 - P_2}{P_3} \right) * 100$$

P₁: poids du ballon après évaporation

P₂: poids du ballon vide

P₃: poids de la matière végétale de départ

1.3 Dosage des composés phénoliques

La détermination des composés phénoliques: polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et tanins condensés (TC) présents au niveau des plantes étudiées a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV- visible de type (6715 UV / VIS, Jenway).

1.3.1 Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

La teneur totale en polyphénols des extraits a été mesurée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par l'Organisation internationale de normalisation (ISO 14502-1:2005(E)). Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) qui se réduit en oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) lors de l'oxydation des polyphénols (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

Une solution stock à une concentration de 2 mg/ml d'extrait de chaque plante a été préparée dans de l'eau distillée, 1 ml de chaque solution est mélangé avec 5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10% (poids/volume). Au bout de 5 minutes, 4 ml d'une solution à 7.5% de carbonate de sodium ont été ajoutés au mélange, puis incubés pendant 60 minutes à température ambiante. Après incubation, l'absorbance a été déterminée à 765 nm. La teneur en composés phénoliques a été calculée par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (allant de 10 à 50 µg/ml) et les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (MS).

1.3.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT)

Les flavonoïdes totaux des échantillons ont été mesurés par le dosage spectrophotométrique du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) selon **Kumazawa *et al.* (2004)**. 0.5 ml d'une solution à 2% d' $AlCl_3$ (solution éthanolique) a été ajouté à 0.5 ml d'échantillons (2 mg/ml). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. La quercétine a été utilisée comme standard pour le traçage de la courbe d'étalonnage (allant de 0.125 à 40 μ g/ml). Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (EQ/g MS).

1.3.3 Détermination des tanins condensés (TC) (proanthocyanidines)

Selon **Price *et al.* (1978)** le dosage des tanins condensés se fait par la méthode colorimétrique basée sur la dépolymérisation des tanins condensés en présence d'acide sulfurique. Sous l'effet de la vanilline, ces tanins se transforment en anthocyanidols de couleur rouge spécifique (**Sun *et al.*, 1998**).

Un volume de 2.5 ml d'une solution d'acide sulfurique/méthanol à 1: 3 (v/v) et 2.5 ml d'une solution de vanilline à 1% (p/v) (solution méthanolique) ont été mélangées à 1 ml de l'extrait convenablement dilué dans de l'eau distillée (2 mg/ml). Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 15 minutes, l'absorbance de chaque tube a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm. La teneur en tanins est estimée en mg équivalent de la catéchine par gramme du poids de la matière sèche (EC/g MS) à partir de la courbe d'étalonnage.

Tous les échantillons ont été préparés en triples pour toutes les concentrations.

1.4 Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique de l'extrait par HPLC a été effectuée à l'aide d'un instrument Shimadzu équipé d'une pompe de chromatographie en phase liquide à haute pression (LC- 2030) avec un détecteur UV deutérium (LC-2030/2040 PDA). Les composés phénoliques ont été séparés sur une colonne Restek IBD ultra C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), en utilisant un mélange eau/acide acétique (0.075%) (solvant A) et méthanol/acide acétique (0.075%) (solvant B) à pH 3, avec un débit constant de 0.8 ml/min. La température de la colonne était de 35°C, le temps de rétention de chaque signal a été enregistré à une longueur

d'onde de 280 nm. Les composés phénoliques ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention à ceux d'étalons purs.

1.5 Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits a été évalué par deux techniques : Piégeage du radical libre DPPH et par la réduction du fer (FRAP).

1.5.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Cette technique consiste à mettre le radical DPPH, qui est un radical libre de couleur violette, en présence de molécules antioxydantes présentes dans nos différents extraits afin d'être réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (couleur jaune), en acceptant un atome d'hydrogène, entraînant une diminution de son absorbance (parejo *et al.*, 2002 ; Maataoui *et al.*, 2006) (Figure 22).

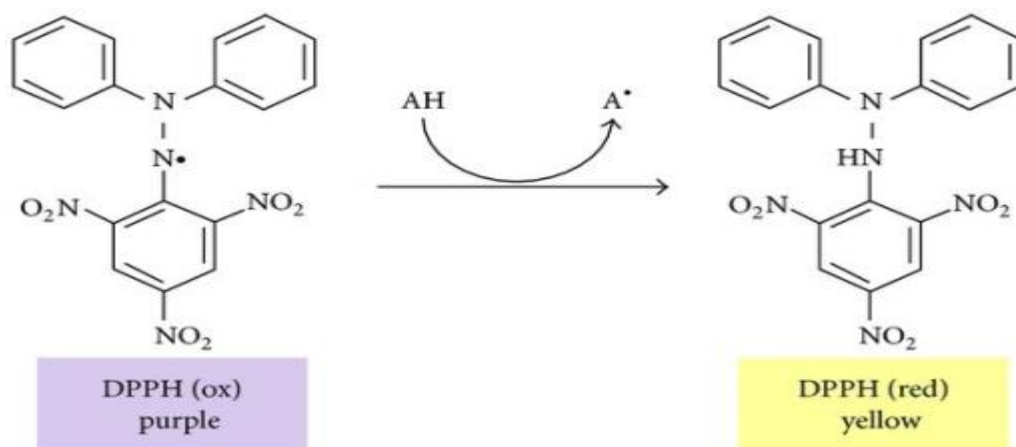


Figure 22. Réaction de réduction du radical DPPH par un antioxydant (Teixera *et al.*, 2013).

➤ Mise en œuvre pratique

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée en termes de capacité de piégeage du radical DPPH par la méthode modifiée de Sanchez-Moreno *et al.* (1998). 50 µl de chaque extrait à différentes concentrations allant de 25 à 1000 µg/ml est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH, fraîchement préparée à une concentration de 0.025 g/l. Le mélange a été vigoureusement secoué et laissé au repos pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle négatif a été préparé avec 50 µl de méthanol et 1950 µl de la solution du DPPH.

Le méthanol a été utilisé comme blanc de l'appareil. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage d'inhibition de la solution de DPPH et est calculée comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) * 100$$

A_c: Absorbance du contrôle négatif (absorbance de la solution de DPPH sans extrait ou acide ascorbique).

A_t: Absorbance du test effectué (absorbance de la solution de DPPH avec l'extrait ou l'acide ascorbique)

➤ **Calcul des CE₅₀**

La concentration efficace, est la concentration de l'échantillon testé ou de l'a. ascorbique nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les CE₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires, exponentielles ou logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés (programme Excel) (Scherer et Godoy, 2009).

1.5.2 Réduction du fer (FRAP) (Ferric reducing antioxidant power)

Cette technique consiste à mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺), ce qui induit un virement de la couleur jaune du fer ferrique au bleu-vert du fer ferreux (Amarowicz *et al.*, 2004). Une élévation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

➤ **Mise en oeuvre pratique:**

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). 2.5 ml d'une solution tampon de phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium à 1% (K₃ [Fe(CN)₆]) ont été mélangées à 1 ml de différentes concentrations d'extraits (100, 200, 300, 400 et 500 µg/ml) diluées dans de l'eau distillée. Après une incubation de 20 minutes à 50°C au bain-marie, 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% (p/v) ont été ajoutés au mélange pour stopper la réaction. Après centrifugation (Rotofix 32A) à 3000 tr/min pendant 10 minutes, 2.5 ml de surnageant est

mélangé à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de solution de chlorure ferrique à 0.1%. L'absorbance du mélange a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions opératoires mais en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif.

La concentration en extrait qui fournit 0.5 d'absorbance (CE_{50}) ou la concentration effective a été calculée à partir du graphique de l'absorbance à 700 nm contre la concentration en extrait (**Pereira *et al.*, 2007**).

2. Procédés d'études microbiologiques

2.1 Prélèvements

Le prélèvement des échantillons a été effectué au niveau du centre de santé Izza abdoullah de la wilaya de Mostaganem durant la période allant de février 2015 à octobre 2017 sur un total de 37 patients. Les patients participant à l'étude, sont des personnes des deux sexes venus faire des soins ou des extractions dentaires au niveau du centre de santé âgés de 4 à 61 ans, répondant aux critères suivants: présence de lésions carieuses, des maladies parodontales (gingivites, parodontites).

Les prélèvements ont été effectués sous l'assistance d'un dentiste à l'aide d'écouvillons stériles, plusieurs écouvillons peuvent être utilisés sur un même patient mais sur des sites de prélèvements différents. Les écouvillons ont été frottés sur les différentes surfaces de la dent pour prélever la plaque dentaire supragingival, tandis que pour les caries dentaires, l'écouvillon a été placé pendant deux minutes sur la lésion (**Borty *et al.*, 2015**). Les échantillons sont emmenés au laboratoire de microbiologie et biologie végétale dans l'heure qui suit le prélèvement pour être analysé.

2.2 Isolement

Au niveau du laboratoire, les écouvillons sont déposés dans des tubes contenant du bouillon nutritif ou du M17, pendant 24 heures à 37°C.

Plusieurs milieux de cultures sélectifs sont ensemencés à partir de ces suspensions préalablement homogénéisé pour l'isolement de différents genres microbiens :

- Des boîtes contenant du TSA (trypticase soy agar) additionnés de 5% de sang pour l'isolement des bactéries aérobies anaérobies facultatifs.

- Des boîtes contenant le milieu Mac Conckey pour l'isolement des bacilles aérobies à Gram négatif.
- Des boîtes contenant du milieu Chapman pour l'isolement des staphylocoques.
- Des boîtes contenant du milieu Sabouraud+chloramphenicol pour l'isolement de *Candida albicans* (Voir annexe).

L'incubation des boîtes se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures sous atmosphère aérobie ou anaérobie, selon les exigences.

2.3 Identification des souches

Après purification des isolats par plusieurs repiquages, un processus d'identification est réalisé par les méthodes conventionnelles de microbiologie.

2.3.1 Les souches bactériennes

2.3.1.1 Caractérisation morphologique des isolats

- ❖ **Etude macroscopique:** consiste à étudier à l'œil nu la forme, l'aspect, le contour, l'odeur et la pigmentation des colonies.
- ❖ **Etude microscopique:** consiste en un examen à l'état frais des bactéries vivantes entre lame et lamelle, et examen après la coloration de Gram sur frottis séchés et fixés (voir annexe).

2.3.1.2 Identification biochimique

❖ **Test de la catalase**

Les germes producteurs de catalase peuvent dissocier le peroxyde d'hydrogène toxique en oxygène et en eau (**Hart et Shears, 1999**), selon la réaction suivante :



Ce test consiste à distinguer les staphylocoques et les microcoques qui sont catalases positives, des streptocoques et entérocoques qui sont catalases négatives.

❖ **Test de l'oxydase**

Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif N-diméthylparaphénylène diamine, il permet de déterminer si un microorganisme possède le système

enzymatique (cytochrome c) lui permettant d'utiliser l'oxygène libre (O₂) comme accepteur final d'électron dans la chaîne respiratoire (**Joffin et Leyral, 2006**).

❖ **Activité hémolytique**

Dans le but de la recherche du type d'hémolyse, un ensemencement en stries a été réalisé sur la gélose (TSA) au sang. Après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C, les géloses ont été examinées sous un éclairage intense. Typiquement, trois formes de lyses sont observées :

Bêta-hémolyse: C'est une lyse complète des globules rouges du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra clair.

Alpha-hémolyse: C'est une lyse incomplète des globules rouges du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra verdâtre.

Hémolyse Gamma: il n'y a pas une lyse des cellules du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra normal. Dans ce cas il n'existe aucune évidence de lyse des globules rouges et aucune clarté ou aspect verdâtre n'est observée autour des colonies (**Koné, 2010**).

❖ **Utilisation des galeries API 20 Strep**

Les galeries API comportent 20 cupules contenant des substrats déshydratés, pour mettre en évidence des activités enzymatiques ou des fermentations de sucres (voir annexe). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur stérile avec une suspension très dense d'une opacité de 4 Mc Farland. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. L'identification est obtenue à partir du profil numérique en utilisant le logiciel d'identification apiweb.

2.3.1.3 Identification génotypique des souches bactériennes

L'identification moléculaire a été réalisée au laboratoire de DIAG-GENE (Angers, France). Quatre bactéries ont été sélectionnées pour cette caractérisation génotypique selon leur pathogénicité dans la cavité buccale et leur potentiel d'une bonne formation de biofilm, cette identification est un outil fiable et précis, développée pour la classification et l'identification des bactéries.

La première étape consiste en l'extraction de l'ADN génomique des isolats par la méthode de choc thermique, puis la quantité et la pureté de l'ADN sont mesurées par spectrophotomètre (Nanodrop). Le résultat quantitatif de l'ADN est déterminé en ng/ μ l, et la pureté de l'ADN est considérée comme acceptable lorsque le ratio des densités optiques DO 260/280 nm est compris entre 1.8 – 2.0.

La deuxième étape consiste en une amplification du gène d'ADN ribosomique 16S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), qui consiste à amplifier cette séquence d'ADN en utilisant deux amorces universelles (1492R et 27F), encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500 pb à l'aide de thermocycleur Biorad iCycler (Biorad, USA). 4 μ l d'ADN génomique sont amplifiés dans un volume de 25 μ l de mixture réactionnelle contenant tous les réactifs nécessaires pour l'amplification PCR résumés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Volume à Prélever
Eau ultra pure	10 μ l
Tampon de TaqPromega	5 μ l
MgCl ₂	1,5 μ l
Dntp	0,3 μ l
Amorce 27F	1,5 μ l
Amorce 1492R	1,5 μ l
Taq polymérase Promega	0,2 μ l
ADN génomique	5 μ l
Volume final	25 μ l

L'amplification par PCR consiste en trois étapes, répétées de nombreuses fois :

- La dénaturation de l'ADN par la chaleur à 95°C pendant 5 minutes; suivies de 35 cycles de dénaturation de 30 secondes à 95 °C.

- Hybridation des brins d'ADN à 55°C pendant 30 secondes à l'aide des amorces universelles 1492R (5'TACGGYTACCTTTTTTGTACGACT3') et 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCT CAG3')
- Extension des nouveaux brins d'ADN à 72°C pendant 45 secondes, à l'aide de nucléotides triphosphate et d'une ADN polymérase non sensible à la chaleur la Taq polymérase (enzyme extraite d'une archéobactérie vivant dans les sources chaudes : *Thermophilus aquaticus*).

A la fin des cycles, une extension finale est effectuée à 72°C pendant 7 minutes, suivis d'un refroidissement à 4°C.

Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1.5 % contenant du bromure d'éthidium pour confirmer la taille attendue (1500 pb) des bandes. Un volume de 5 µl d'échantillon (produits de PCR) de chaque isolat contenant du bleu de bromothymol est déposé dans un des puits du gel. Un marqueur de taille de 1 Kb a été déposé dans le puits de l'extrémité. La migration a été faite pendant 20 min à 100 volts afin de visualiser les bandes d'ADN et de vérifier leurs tailles.

Les amplicons purifiés des isolats ont été soumis à un séquençage automatisé effectué selon la technique de Sanger (**Sanger *et al.*, 1977**), en utilisant les amorces universelles. Les séquences obtenues à partir de nos 4 isolats ont été comparées aux séquences homologues contenues dans les banques de données de séquences à travers le portail NCBI en utilisant le programme BLAST de GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.2 Les souches fongiques

2.3.2.1 Examen direct à l'état frais

Il s'agit de mettre une partie de la colonie de *candida* prélevée à partir de la gélose SDA, sur une lame contenant une goutte d'eau distillée préalablement déposée, puis recouvrir avec une lamelle et observer sous microscope.

2.3.2.2 Test du tube germinatif

Ce test consiste en une technique standard pour identifier *Candida albicans*. Ce dernier implique l'induction de formation des tubes germinatifs lors d'une sous-culture dans du sérum humain.

Un petit inoculum à partir d'une colonie de *Candida* a été mis en suspension dans un tube à hémolyse contenant du sérum humain normal (0.3 à 0.5 ml). Le tube a été incubé à 42°C pendant 3 heures. Une goutte du mélange a été placée sur une lame en verre et recouverte d'une lamelle. La présence du tube germinatif a été examinée au microscope optique (Williams et Lewis, 2000; Saigal *et al.*, 2011).

2.3.2.3 Test de production de chlamydozoaires

Il existe deux espèces capables de produire des chlamydozoaires (*Candida albicans* et *Candida dubliniensis*). La présence de chlamydozoaires a été évaluée par la méthode de Braga de Souza *et al.* (2010) avec quelques modifications. Les isolats sont ensemencés en stries sur des boîtes contenant un milieu minéral ((NH₄)₂ SO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄ et agar agar) et recouverts de plusieurs lamelles stériles éparpillées sur la gélose et incubés pendant 48 à 72 heures à 29°C. Une observation microscopique à travers les lamelles, a été réalisée afin d'examiner la présence de chlamydozoaires.

2.3.2.4 Test de la croissance à 45°C

C'est une méthode simple de différenciation entre *Candida dubliniensis* et *Candida albicans* selon Pinjon *et al.* (1998). Une petite colonie de chaque isolat a été ensemencée en stries sur des boîtes contenant du SDA, une incubation a été effectuée à 45°C pendant 24 à 48 heures. Seule *C. albicans* a la capacité de croître à cette température.

2.3.2.5 API Candida

La bandelette API Candida est composée de 10 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser 12 tests d'identification. Les cupules sont ensemencées avec une suspension fongique d'opacité de 3 Mc Farland (voir annexe). Les galeries sont incubées pendant 18 à 24 heures en aérobiose. L'identification est obtenue en utilisant le logiciel apiweb.

A l'issue des différents procédés d'identification bactérienne et fongique, six souches bactériennes ainsi que deux souches fongiques ont été sélectionnées pour la suite de notre travail.

2.4 Antibiogramme et Antifongigramme

C'est un test de sensibilité des bactéries aux antibiotiques et des levures aux antifongiques, réalisé par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud dextrose agar (SDA) pour les levures. Les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du Comité de la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle algérienne (2005) suivant les recommandations de l'OMS et selon le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2018), concernant l'antifongigramme les recommandations de Clinical and laboratory standards institute (CLSI) (2009) ont été suivies.

A partir d'une culture pure de 18 à 20 heures sur un milieu d'isolement, préparer une suspension microbienne dans de l'eau physiologique stérile à 0.9 % NaCl, ajustée à 0.5 Mc Farland, soit une D.O de 0.08 à 0.1 (10^8 UFC/ml). L'ensemencement se fait par écouvillonnage sur toute la surface gélosée. Après quelques minutes de séchage, des disques d'antibiotiques appropriés ainsi que des disques imprégnés d'une solution d'antifongique ont ensuite été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des milieux respectifs. La lecture des résultats est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition après une durée d'incubation de 24 à 48 heures à 37°C (Bauer *et al* , 1966 ; NCCLS, 1997).

Les différents antibiotiques testés contre les bactéries sont listés dans le **Tableau 3**. Pour les antifongiques, trois solutions d'antifongiques ont été utilisées : Econazole (ECONZ), Clotrimazole (CTRIM) et Fluconazole (FLUCZ) avec une concentration de 50 µg par disque.

Tableau 3. Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque (µg)
Penicillines	Ampicilline	A	10
Aminosides	Gentamycine	GEN	15
	Amikacine	AK	30
Céphalosporines	Ceftazidime	CAZ	30
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
Macrolides- Lincosamides	Erythromycine	E	15
	Clindamycine	DA	2
Phénicolés	Chloramphenicol	C	30
Tetracyclines	Tétracycline	TE	30
Fluoroquinolones	Lévofloxacne	LEV	5
Sulfamides et associés	Triméthoprime- Sulfaméthoxazole	SXT	25

2.5 Evaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm

2.5.1 La formation de biofilm chez les souches bactériennes

2.5.1.1 La méthode du Rouge Congo

C'est une méthode qualitative simple qui permet de détecter la formation de biofilm sur un milieu solide, qui est le milieu Congo Red Agar (CRA). Sur ce dernier, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (Ziebuhr *et al.*, 2001).

La technique suivie est celle de Freeman *et al.* (1989) avec quelques modifications, le Congo Red a été préparé sous forme de solution concentrée avec de l'eau distillée et autoclavée (121°C pendant 15 minutes) séparément des autres composants du milieu, puis ajouté à la gélose en surfusion à 55°C. Le milieu de culture utilisé est le Mueller Hinton additionné de saccharose 50 g/l et de colorant Congo Red 0.8 g/l, les souches sont

ensemencées sur des boîtes préalablement coulées avec ce milieu puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.5.1.2 La méthode de crystal violet (en tubes)

2.5.1.2.1 Evaluation de la formation de biofilm en fonction du milieu de culture

Afin d'évaluer et de comparer la formation de biofilm de nos 6 souches bactériennes, nous avons effectué le test dans des tubes à hémolyse en utilisant 4 milieux différents (TSB, TSB + 1% glucose, TSB + 0.25% saccharose, TSB + 5% saccharose) (**Figure 23**).

Le test a été réalisé selon **Lim J *et al.* (2008)** avec quelques modifications, une colonie a été isolée à partir d'une boîte de 24 heures de chacune de nos différentes souches bactériennes et ensemencée dans du TSB à 37°C sous agitation pendant une nuit, puis la densité a été ajustée à 0.5 Mc Farland (entre 0.08 à 1 à une longueur d'onde de 600 nm). 200 µl de chacune de ces suspensions de nos différentes souches ont été inoculées dans une série de tubes à hémolyse contenant chacune 2 ml de : TSB (bouillon de trypticase de soja), TSB + 1% glucose, TSB + 0.25% saccharose, TSB + 5% saccharose. Les tubes sont incubés à 37°C/48 heures. Les essais ont été faits en trois répétitions.

Après la durée d'incubation, le biofilm est quantifié à l'aide de la technique du crystal violet (**Djordjovic *et al.*, 2002**). Le milieu de chaque tube est jeté et les tubes sont lavés 3 fois avec du PBS (tampon phosphate salin) ou de l'eau physiologique afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis laissés sécher à l'air libre pendant 20 min. 2 ml de crystal violet à 0.1% (p/v) sont ajoutés à chaque tube pendant 20 min, puis les tubes sont rincés abondamment pour éliminer l'excès de colorant et laissés sécher de nouveau à l'air pendant 20 min. Après séchage, 2 ml d'éthanol à 95% est ensuite ajouté dans chaque tube afin de solubiliser le colorant lié aux cellules adhérentes et laissé incubé pendant environ 30 min, le contenu de chaque tube a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

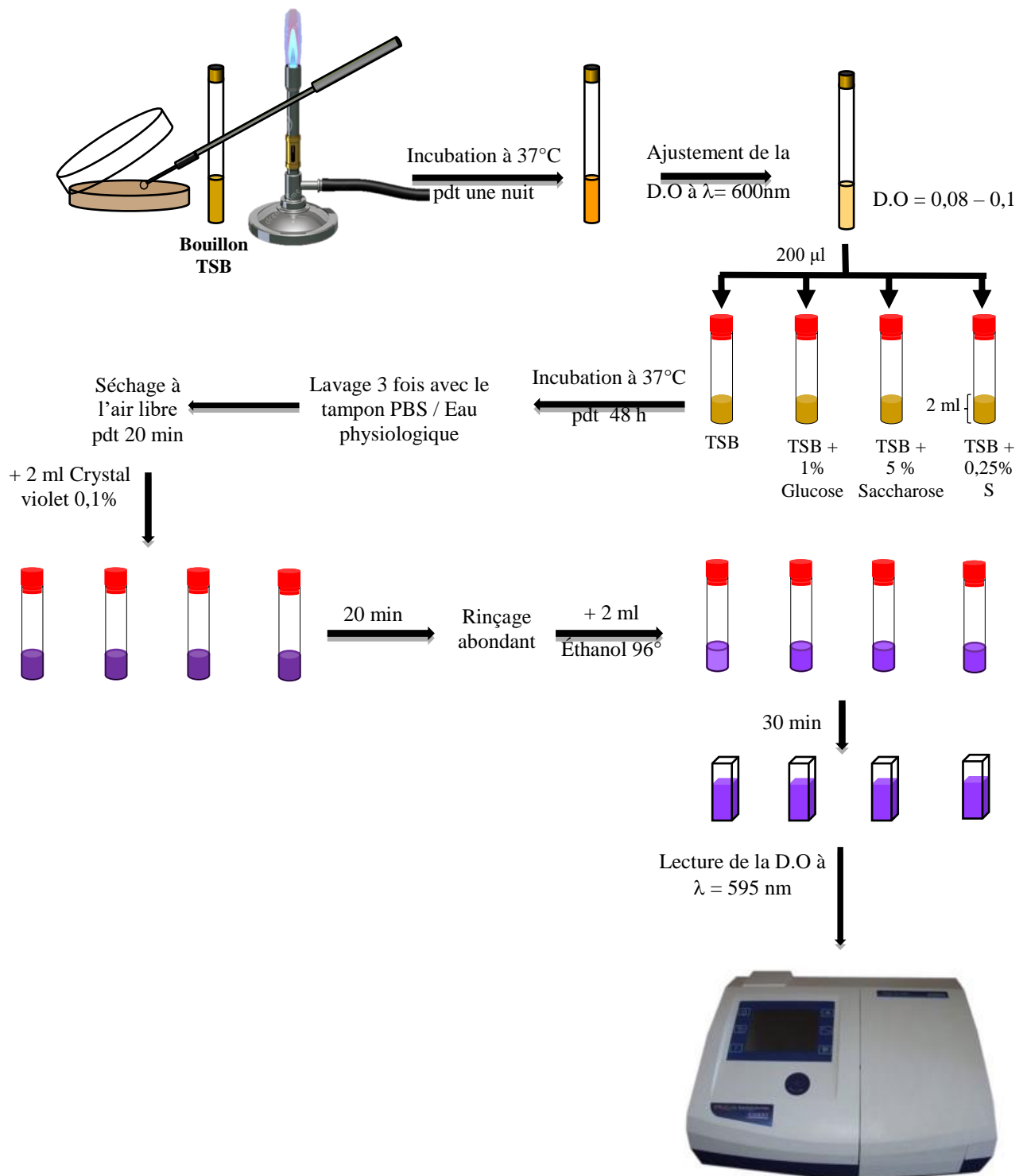


Figure 23. Évaluation de la formation de biofilm des souches bactériennes en fonction du milieu de culture.

2.5.1.2.2 Evaluation de la formation de biofilm en fonction du temps et des isolats testés

Nos six souches bactériennes ont été ensemencées selon le protocole suivi pour l'évaluation de la formation de biofilm en fonction du milieu de culture. Brièvement, nous avons inoculés des tubes à hémolyse avec 2 ml d'une culture jeune ajusté à 10^8 UFC/ml (à 600 nm). Le milieu utilisé est le TSB+ 5% saccharose, les tubes sont ensuite incubés à 37°C à différents temps d'incubation (2 h, 4 h, 6 h, 24 h et 72 h).

A l'issue de chaque période d'incubation, chaque tube correspondant est vidé de la culture microbienne, puis les tubes sont colorés avec du cristal violet à 0.1% (w/v) pendant 20 min. La formation du biofilm est quantifiée après solubilisation avec de l'éthanol à 95% à une longueur d'onde de 595 nm (**Djordjovic et al., 2002**).

2.5.2 La formation de biofilm chez les souches fongiques

Une colonie de chaque souche de *C. albicans* est ensemencée dans du YPD à 37°C/18 heures, puis les suspensions fongiques ont été ajustées avec du PBS à une densité de 0.38 (10^7 UFC/ml à 520 nm). Cette concentration cellulaire a été choisie car des recherches antérieures ont démontré que la formation de biofilm est optimale à cette densité (**Kuhn et al., 2002**).

Dans un premier lieu 1 ml de nos différentes suspensions fongiques ont été pipetées dans des tubes à hémolyse et incubées pendant 1h30 min à 37°C sous agitation (75 rpm) pour permettre l'adhésion. Après la phase d'adhésion, le contenu de chaque tube est jeté, puis les tubes sont remplis avec 1ml de YPD, les tubes sont incubés dans les mêmes conditions que précédemment pendant 66 heures, et où le milieu de culture est jeté quotidiennement et remplacé par du milieu frais (**Kuhn et al., 2002**). Après cette durée d'incubation, le biofilm est quantifié par la mesure colorimétrique de l'incorporation du crystal violet par les cellules adhérees (**Djordjovic et al., 2002**) (**Figure 24**).

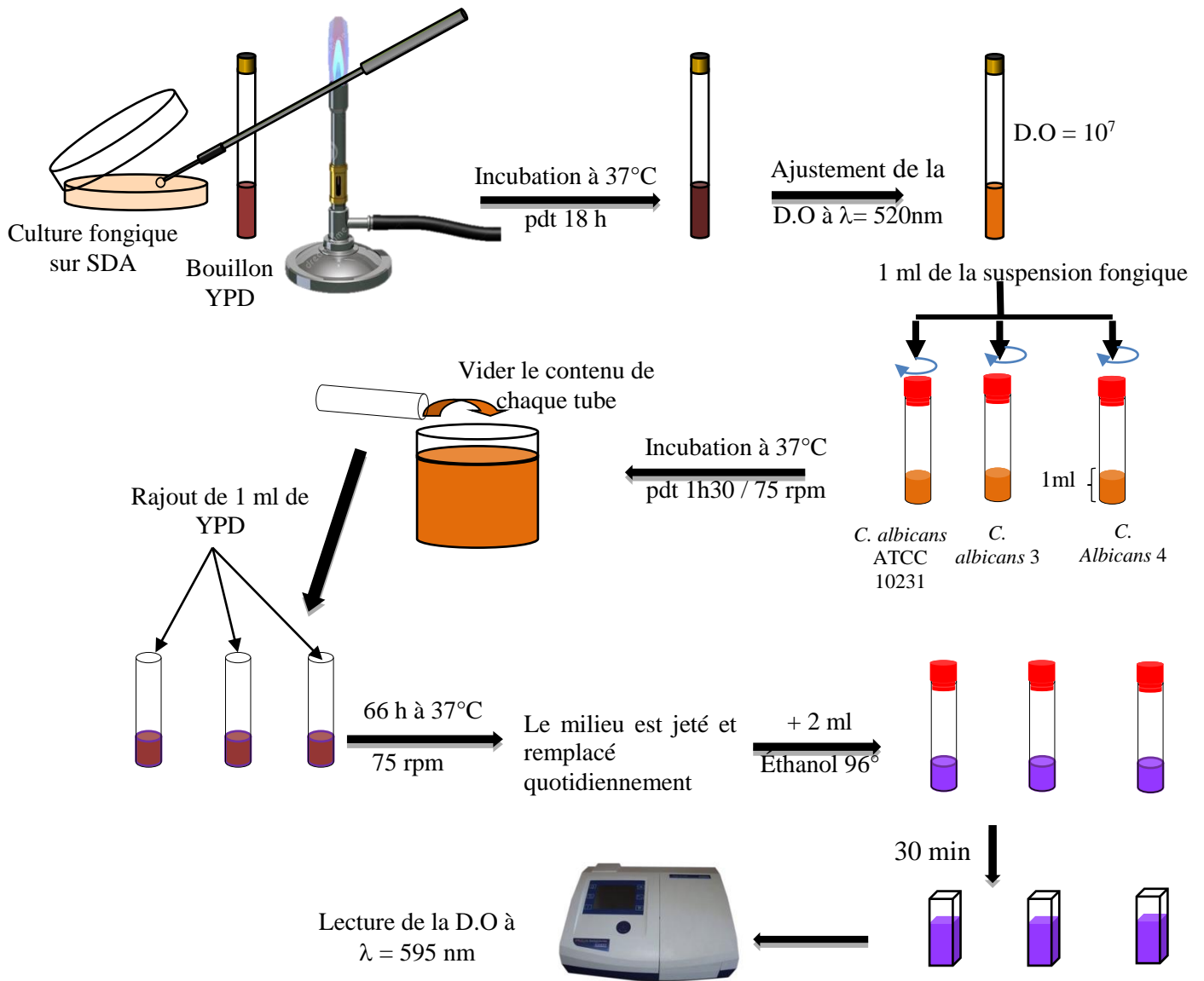


Figure 24. Évaluation de la formation de biofilm des souches fongiques.

2.6 L'activité antimicrobienne des extraits de plantes contre les pathogènes bucco-dentaires

2.6.1 L'effet antimicrobien par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des puits)

L'activité antimicrobienne des différents extraits végétaux a été évaluée contre 6 souches bactériennes (*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter bugandensis*) et 3 levures (*Candida albicans* 3, *Candida albicans* 4) dont une de référence *Candida albicans* ATCC 10231. Les extraits testés sont des extraits éthanoliques, méthanoliques et acétoniques des deux plantes utilisées : écorces de grenades et graines de cumins.

L'activité antimicrobienne des différents extraits préparés a été déterminée par la méthode de diffusion de puits selon **Perez et al. (1990)**. Des boîtes contenant du milieu Mueller-Hinton (MH) et du Sabouraud Dextrose agar (SDA) pour les bactéries et les levures respectivement, ont été aseptiquement ensemencés par écouvillonnage par les suspensions bactériennes et fongiques ajustées à 0.5 Mc Farland. Des puits d'environ 6 mm de diamètre ont été creusés dans des conditions stériles et remplie par 50 µl des différents extraits bruts à une concentration de 200 mg/ml de DMSO, ce dernier est utilisé pour sa faible activité antimicrobienne (**Gachkar et al., 2007**). Les boîtes sont laissées à la température ambiante pendant environs 2 heures pour permettre la diffusion de l'extrait, cette dernière est dépendante de la diffusibilité du composé dans la gélose, de la durée et de la distance de migration de l'extrait et de sa concentration (**Cooper, 1955**). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h à 48 h en aérobiose ou anaérobiose selon les exigences, en fonction du gradient de concentration établi par les différents extraits dans la gélose, une inhibition de croissance microbienne est induite. Cette inhibition a pour conséquence la formation d'un halo autour du puits. Le diamètre de cette zone d'inhibition quantifie l'activité antimicrobienne de l'extrait.

2.6.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les valeurs des CMI qui représentent les plus faibles concentrations d'extrait empêchant la croissance visible du microorganisme ont été déterminées par la méthode de microdilution dans des microplaques à 96 puits (**Figure 25**) (**Gulluce *et al.*, 2007**). La solution stock de chaque extrait a été préparée dans 10% DMSO (10 ml DMSO+ 90 ml E.D), à raison d'une concentration de 200 mg/ml. Puis, une série d'autres dilutions sont préparées à partir de cette solution stock par progression géométrique de raison 2. La gamme de concentrations finales des extraits va de 200 à 0.002 mg/ml pour la grenade (selon les souches) et de 200 à 0.4 mg/ml pour le cumin.

90 µl de bouillon nutritif (B.N) et 10 µl de l'inoculum ont été répartis dans chaque puits de la microplaque. 100 µl de la solution stock de l'extrait (200 mg/ml) est ajouté dans les puits de la première ligne de la microplaque, puis 100 µl des différentes dilutions sont ajoutés successivement dans les lignes qui suivent.

La dernière ligne recevra 195 µl de B.N et 5 µl de l'inoculum et qui va servir de témoin négatif. Le volume final de chaque puits est de 200 µl. Les microplaques sont incubées pendant 24 h à 37 °C, et la lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation du changement de turbidité dans les tubes après incubation et par comparaison avec les contrôles négatifs. La CMI a été donc la concentration du premier puits à partir duquel aucun trouble n'a été observé à l'œil nu (**Choukchou-Braham *et al.*, 2010**). Les essais sont effectués en triple pour chacune des concentrations d'extraits utilisées.

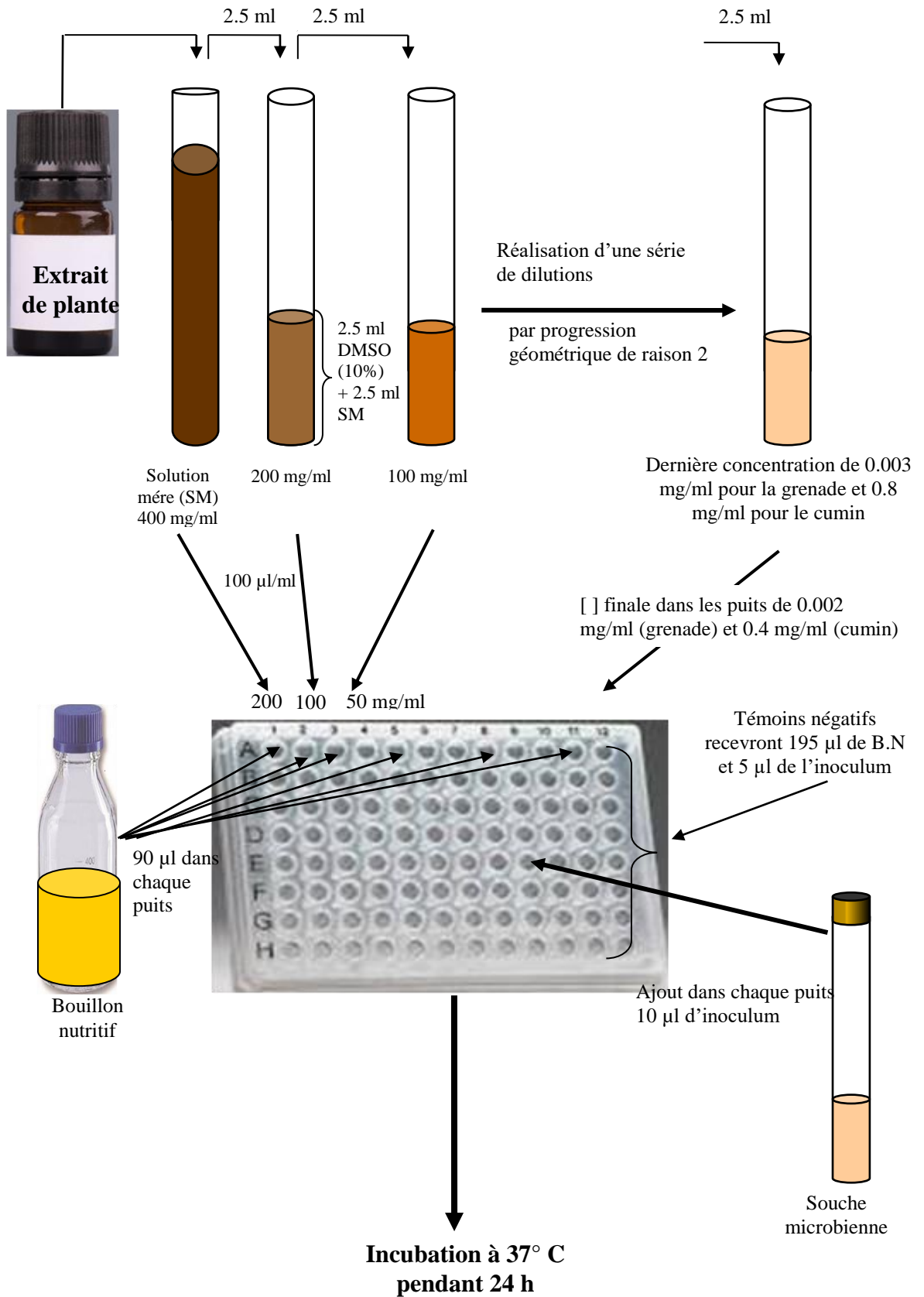


Figure 25. Détermination de la CMI par microdilution

2.6.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0.01% de germes survivants. Des boîtes contenant du MH et SDA ont été ensemencées par le contenu des puits dépourvus de trouble, à l'aide d'une anse l'ensemencement se fait par des stries parallèles à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La CMB et la CMF correspondent à la concentration de l'extrait du puits qui sur la gélose n'a montré aucune croissance ou 0.01% de croissance (Bolou *et al.*, 2011 ; Lima *et al.*, 2014 ; Dolatabadi *et al.*, 2019).

2.7 Effet des extraits végétaux sur la formation de biofilm microbiens

Dans cette étude un extrait de chaque plante (extrait éthanolique pour l'écorce de grenade et l'extrait acétonique pour le cumin) a été sélectionné pour évaluer son potentiel antibiofilm contre 4 souches bactériennes (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter bugandensis* et *Klebsiella oxytoca*) pour la grenade et deux souches bactériennes (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*) pour le cumin ainsi que deux souches fongiques (*C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* 3). La capacité de l'extrait à inhiber la formation de biofilms d'agents pathogènes oraux a été testée par la méthode en tubes, selon la méthode adoptée par Cramton *et al.*, (1999), avec quelques modifications. Chaque tube à hémolyse stérile a été ensemencé par 1 ml de suspension microbienne ajustée avec du TSB+5% saccharose (10^8 UFC/ml à 600 nm) pour les bactéries et du YPD (10^7 UFC/ml à 520 nm) pour les levures. Ensuite chaque tube a été rempli avec 1 ml de l'extrait végétal avec une concentration finale dans chaque tube selon une gamme de concentration précise (CMI, 50% CMI, 25% CMI, 12.5% CMI, 6.25% CMI). Le tube de contrôle va recevoir 1 ml d'eau distillée et 1 ml de souche microbienne. Tous les tubes sont incubés à 37°C pendant 48 heures (Figure 26).

Après incubation, le biofilm a été analysé à l'aide de la méthode de coloration au cristal violet (Djordjovic *et al.*, 2002) décrite précédemment. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition suivant la formule suivante: $[(DO \text{ de la croissance du contrôle} - DO \text{ de l'échantillon}) / DO \text{ de la croissance du contrôle}] \times 100$. (Chaieb *et al.*, 2011).

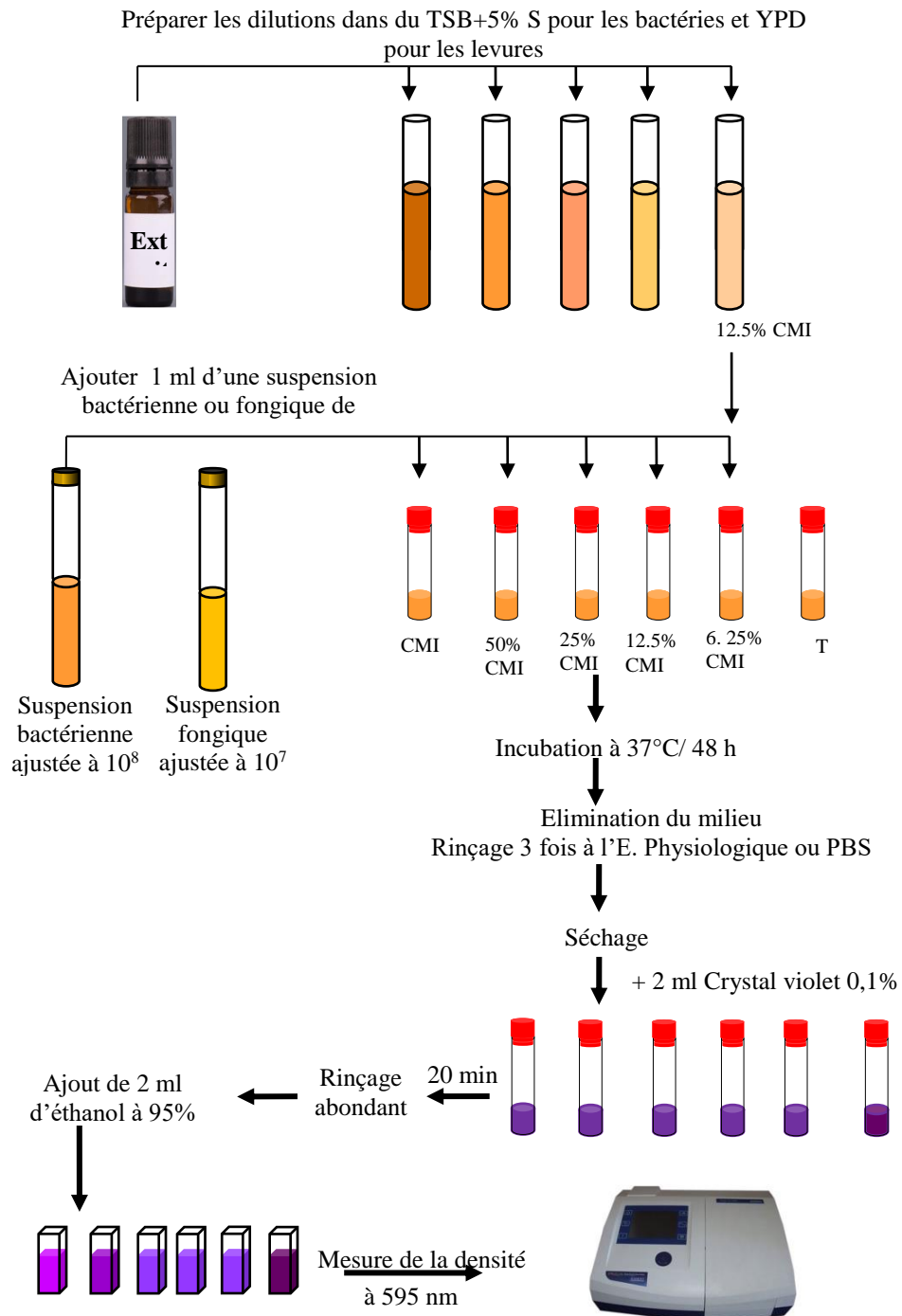


Figure 26. Etapes du protocole de la formation de biofilm en tubes

- Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'écart type. L'étude statistique a été effectuée en utilisant le logiciel SPSS 25 par analyse de variance (ANOVA). Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives au seuil de probabilité de 5 % ($p < 0.05$)

Chapitre V :

Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Matériel végétal

1.1 Rendement des extraits bruts

La préparation des extraits à partir d'écorces de grenades et des graines de cumin a été réalisée par macération, et ceci en utilisant trois différents solvants à polarité croissante : l'acétone (70%), éthanol (70%) et le méthanol (70%).

Le rendement qui a été déterminé par rapport au poids total du matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 27**.

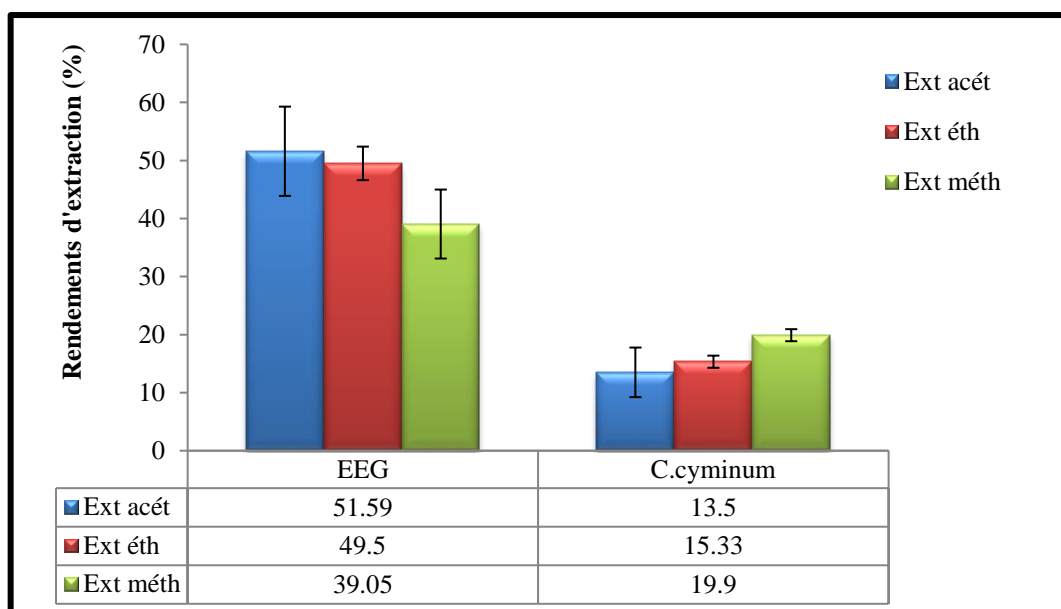


Figure 27. Rendements d'extraction (%) obtenus pour les différents extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum*.

Ext acét : extrait hydro-acétonique, Ext éth : extrait hydro-éthanolique, Ext méth : extrait hydro-méthanolique, EEG : extrait d'écorces de grenade.

Les résultats montrent que les rendements obtenus avec les extraits d'écorces de grenades sont supérieurs à ceux des extraits de cumin. Ce qui semble concorder avec les résultats de **Mostafa et al. (2018)**, qui ont également constaté que le rendement de l'extrait d'écorces de grenade (EEG) était beaucoup plus supérieur à celui de l'extrait de *C. cyminum*.

D'après nos résultats, on peut noter que le rendement varie selon le solvant utilisé. Pour l'EEG, le meilleur rendement a été obtenu avec l'extrait acétonique (51.59%) suivi par

l'extrait éthanolique (49.5%). Une étude antérieure a pu démontrer un rendement d'extraction de l'extrait éthanolique d'écorces de grenade (27.5%) inférieur à nos résultats (**Singh et Immanuel, 2014**).

Quand au cumin, le meilleur rendement a été enregistré avec l'extrait méthanolique (19.9%). Une étude faite par **Al Juhaimi et Ghafoor (2013)**, a permis d'obtenir un rendement d'extraction d'un extrait éthanolique (à 70%) de *Cuminum cyminum* d'une valeur de 10.22%, qui est légèrement inférieur à notre valeur (15.3%).

Le rendement semble être lié aux facteurs génétiques des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées. La nature et le volume du solvant, la masse de la poudre, le temps de contact avec le solvant et le nombre d'étapes d'extraction sont aussi des facteurs influençant ces rendements (**Hadjadj, 2010**).

1.2 Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et proanthocyanidines

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage, exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique, mg équivalent quercétine et mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche (**Figures 28, 29 et 30**).

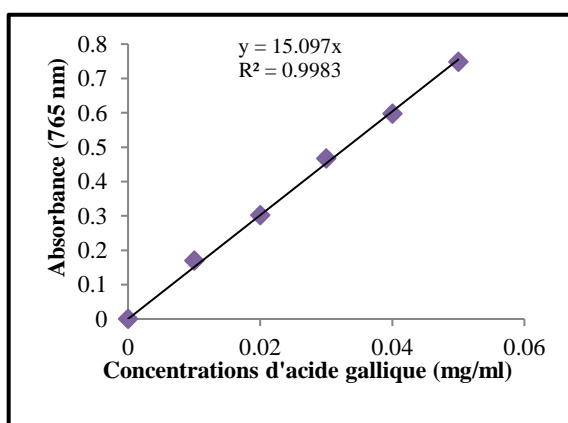


Figure 28. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.01 à 0.05 mg/ml) pour le dosage des phénols totaux.

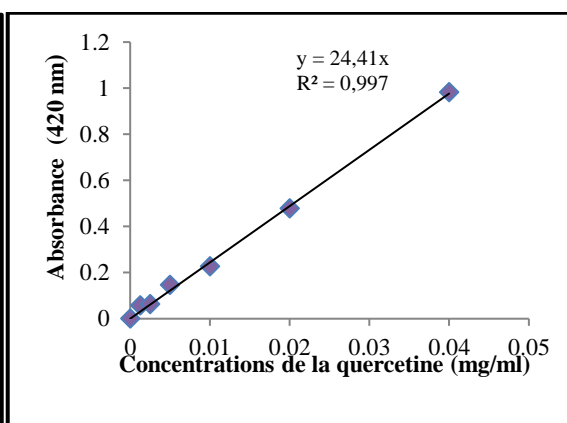


Figure 29. Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.00125 à 0.04 mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes.

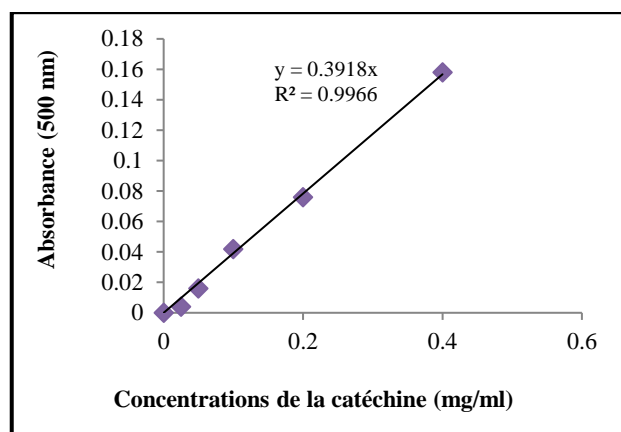


Figure 30. Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.025 à 0.4 mg/ml) pour le dosage des tanins.

Les données du **Tableau 4** résument les contenus en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits à 70% acétone, 70% éthanol et 70% méthanol des écorces de grenade et des graines de cumin.

Tableau 4. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits d'écorces de grenade et des graines de cumin

Extraits de plantes	Polyphénols totaux mg EAG/g MS	Flavonoïdes totaux mg EQ/g MS	Tanins condensés mg EC/g MS
<i>Punica granatum</i>			
Acétone 70%	176.67± 3.06	60± 20	220± 17.32
Ethanol 70%	204.67± 15.26	67.67 ± 1.53	145± 50
Méthanol 70%	80.67± 1.15	54.67± 4.62	115± 13.23
<i>Cuminum cyminum</i>			
Acétone 70%	42± 3.46	24.49± 1.24	34.95± 8.71
Ethanol 70%	32.74± 1.08	22.49± 0.34	34.1± 0.74
Méthanol 70%	30± 4.01	14.09± 0.8	25.15± 0.73

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures± standard de déviation. Acétone 70%: extrait hydro-acétonique ; Ethanol 70%: extrait hydro-éthanolique, Méthanol 70%: extrait hydro-méthanolique.

Les teneurs totales en polyphénols des EEG varient considérablement et sont comprises entre 80.67 ± 1.15 et 204.67 ± 15.26 mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g de matière sèche (MS). La teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été obtenue avec de l'éthanol à 70%. De ce fait, en ce qui concerne le rendement d'extraction en polyphénols, les solvants utilisés dans la présente étude peuvent être classés dans l'ordre décroissant suivant: éthanol 70% (204.67 ± 15.26 mg EAG/g MS), acétone 70% (176.67 ± 3.06 mg EAG/g MS) et méthanol à 70% (80.67 ± 1.15 mg EAG/g MS). Nos résultats sont en accord avec **Elfalleh et al. (2012)** et **Shinde et al. (2015)** qui ont rapporté que la teneur totale en phénols des écorces de grenade est respectivement de 85.60 ± 4.87 et 212 ± 20.55 mg EAG/g MS. **Ali et al. (2016)** ont enregistré des teneurs en polyphénols d'une valeur de 103.2 ± 2.77 mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique d'écorces de grenade qui est légèrement supérieur à notre résultat (80.67 ± 1.15 mg EAG/ g MS). De plus, l'éthanol est connu comme un bon solvant pour l'extraction des polyphénols (**Dai et Mumper, 2010**).

La teneur totale en flavonoïdes dans les EEG varie de 54.67 ± 4.62 à 67.67 ± 1.53 mg équivalent quercétine EQ/g MS. **Kennas et Amellal-Chibane. (2019)** ont enregistré des valeurs en flavonoïdes de 11.5 ± 0.54 à 53.85 ± 1.95 µg QE/mg MS qui représentent des teneurs plus basses que nos résultats. En revanche, nos résultats sont inférieurs à ceux d'**Ali et al. (2016)**, où une valeur de 132.4 ± 2.69 mg Rutine/g MS a été constatée. La classification des solvants selon leur efficacité d'extraction est similaire pour les polyphénols et les flavonoïdes. L'extrait éthanolique a montré la valeur la plus élevée de la teneur en flavonoïdes, tandis que la valeur la plus basse a été obtenue par l'extrait méthanolique, de ce fait l'éthanol reste le meilleur extracteur des composés phénoliques pour l'écorce de grenade. Divers solvants sont utilisés dans l'extraction des composés actifs des plantes, car ils jouent un rôle primordial dans l'extraction d'un constituant particulier, en effet, la nature du solvant détermine le type de composé qui y sera extrait (**Alam et al., 2020**).

D'après les résultats, il est évident que l'EEG est riche en proanthocyanidine et varie de 115 ± 13.23 à 220 ± 17.32 mg EC/g MS, le niveau le plus élevé des tanins condensés a été observé avec l'extrait acétonique. Ces teneurs élevés en tanins de l'EEG sont conformes à la littérature (**Machado et al., 2002**; **Voravuthikunchai et al., 2005**; **Al zoreky, 2009**). À ce sujet, **Wang et al. (2011)** ont constaté que les teneurs en proanthocyanidines des extraits éthanolique et acétonique étaient plus élevées que celle de l'extrait méthanolique. De plus, **Vijayalakshmi et al. (2017)** ont révélé la présence de la teneur en tanin total la plus élevée dans l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade. Ceci pourrait être expliqué, entre autres que

l'acétone possède une propriété de solubilisation des proanthocyanidines qui ne sont pas solubles dans le méthanol (Nacz et Sahidi, 2004).

Concernant l'extrait de cumin (**Tableau 5**), nous remarquons que la teneur en polyphénols varie de 30 ± 4.01 à 42 ± 3.46 mg EAG/g MS, la valeur la plus élevée a été enregistrée avec l'extrait acétonique. Pour la teneur en flavonoïdes et en tanins, la plus grande teneur a été également constatée avec l'extrait acétonique avec des valeurs de l'ordre de 24.49 ± 1.24 mg EQ/g MS et 34.95 ± 8.71 mg EC/g MS respectivement.

Nos résultats sont en concordance avec **Bettaieb et al. (2012)** où la plus grande teneur en polyphénols a été observée avec l'extrait acétonique à 80%, ce dernier a donné un meilleur rendement en polyphénols que l'extrait éthanolique et méthanolique. Une autre étude a permis d'enregistrer une plus grande teneur en polyphénols avec l'extrait méthanolique (35.5 mg EAG/g MS) (**El-Ghorab et al., 2007**), ce qui est légèrement supérieur à notre résultat trouvé (30 ± 4.01 mg EAG/g MS), **Hinneburg et al. (2006)** ont observé un taux de polyphénols de 37.4 ± 0.32 mg GAE/g pour les extraits aqueux. En revanche, d'autres études ont constaté des valeurs en polyphénols inférieures aux nôtres notamment celles réalisées par **Thippeswamy et Naidu (2005)**, **Shan et al. (2005)**, où les valeurs enregistrées pour les extraits méthanoliques étaient de l'ordre de 9 mg EAG/g MS et 2.3 mg EAG/g MS respectivement, **Queralt et al. (2014)** ont rapporté 4.98 mg EAG/g MS et **Demir et Korukluoglu. (2020)** ont trouvé des teneurs de 7 mg EAG/g MS et 3.70 mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique et éthanolique respectivement.

Bettaieb et al. (2012), ont aussi rapporté que l'extrait acétonique était le plus riche en flavonoïdes en comparaison avec les autres extraits mais avec une valeur inférieure à la nôtre. Différents types de facteurs peuvent influencer la variation de la récupération des composés phénoliques des produits naturels, tels que le type de plante, la nature des composés à extraire et l'efficacité des solvants d'extraction pour dissoudre ces composés (**Roudsari et al., 2007 ; Shabir et al., 2011**), également, l'utilisation de solvants mixtes (solvant + E.D) entraîne un enrichissement des extraits en polyphénols, ceci est dû à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits (**Trabelsi et al., 2010 ; Mohammedi et Atik, 2011**).

En ce qui concerne les tanins, le cumin est connu pour sa teneur significative en ces composés, les meilleures valeurs ont été enregistrées avec l'acétone, le même résultat a été obtenue avec **Bettaieb et al. (2012)** mais avec des valeurs supérieures aux nôtres (de 30.92 à 83.23 mg EC/g MS). Des études antérieures, ont démontré que l'acétone aqueux est le solvant

le plus efficace pour les échantillons riches en tanins (Naczek et Sahidi, 2004). De même, des travaux réalisés par Seigler *et al.* (1986) ont affirmé que l'extraction à partir des plantes a donné le meilleur rendement avec 70% acétone.

En comparant les extraits des deux plantes, il est évident que l'écorce de grenade est beaucoup plus riche en composés phénoliques que les graines de cumin. En effet, toutes les plantes de la famille Ombellifères (Apiacée) dont fait partie *C. cyminum* présentent une teneur très basse en polyphénols (Wojdylo *et al.*, 2007 ; Athamena *et al.*, 2010).

1.3 Analyses des extraits par HPLC

Dans cette expérimentation, un seul extrait de chaque plante a été choisi pour être analysé par HPLC (extrait éthanolique pour l'écorce du fruit de *P. granatum* et l'extrait acétonique pour *C. cyminum*), le choix s'est fait sur la base de la richesse de ces extraits en composés phénoliques.

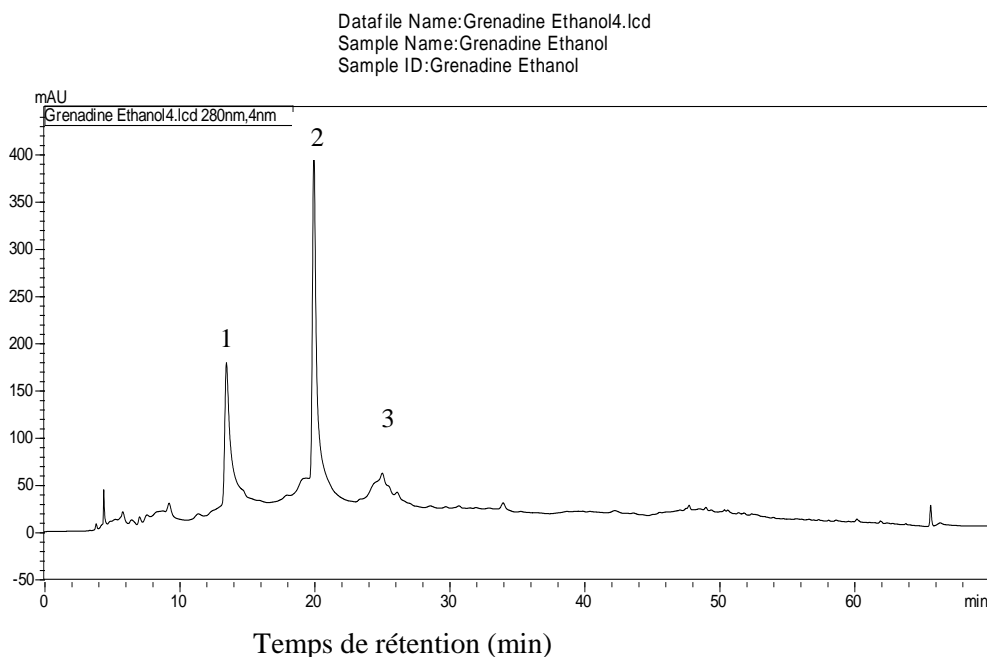


Figure 31. Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de l'écorce du fruit de *Punica granatum* enregistré à 280 nm.

Le pic 1: peduncalagine ; Le pic 2: punicalagine ; Le pic 3: punigluconine.

Tableau 5. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait éthanolique de l'écorce du fruit de *Punica granatum*.

N°	Temps de rétention	Surface	% de surface	λ max	Molécule
1	13.518	6316204	23.430	258 376	Péduncalagine
2	19.994	9826613	36.451	257 378	Punicalagine
3	25.065	2557316	9.486	269 374	Punigluconine

Afin d'identifier les composants de l'EEG, l'analyse HPLC a été réalisée sur l'extrait éthanolique (**Figure 31** et **Tableau 5**), qui s'est montré le plus riche en composés phénoliques. Les résultats ont révélé la présence de tanins sous forme de péduncalagine, punicalagine et punigluconine respectivement, par comparaison avec le temps de rétention et les spectres UV des standards. Dans la présente étude, la punicalagine a été déterminée comme prédominante dans l'extrait, elle constitue 36.451% du total des composés extraits, suivie de la péduncalagine (23.430%) et de la punigluconine (9.486%). La pelure de grenade est une riche source d'ellagitanins, en particulier la punicalagine, l'acide gallique, l'acide ellagique (**Gil et al., 2000; Cerda et al., 2003**). La punicalagine, qui appartient à la classe des tanins hydrolysables, est le composant le plus abondant et est caractéristique de la pelure de grenade (**Seeram et al., 2006; Bakkalbaşı et al., 2009**). Nos résultats sont en corrélation avec d'autres études, **Kwak et al. (2005)** et **Middha et al. (2013)** ont révélé la présence de punicalagine en tant qu'ellagitanine majeur dans les écorces de grenades. D'autres auteurs (**Çam et Hişil, 2010 ; Choi et al., 2011**) ont trouvé en plus de la punicalagine d'autres composés tels que l'acide ellagique et l'acide gallique. De plus, l'analyse HPLC des extraits méthanoliques de pelures de grenades réalisée par **Ali et al. (2014)** a révélé la présence de pyrogallol, d'acide chlorogénique, d'acide coumarique, d'acide férulique, d'acide cinnamique, d'acide benzoïque, de catéchine, de rutine, d'acacétine, de génistéine et de kaempférol. Ces variations dans les résultats sont probablement dues au solvant utilisé, qui aurait un impact sur la composition des extraits et également à la technique d'extraction (**Elfalleh et al., 2012**), plusieurs autres facteurs (environnementaux, transformation et post-récolte) peuvent également influencer la composition des pelures (**Houston, 2005**).

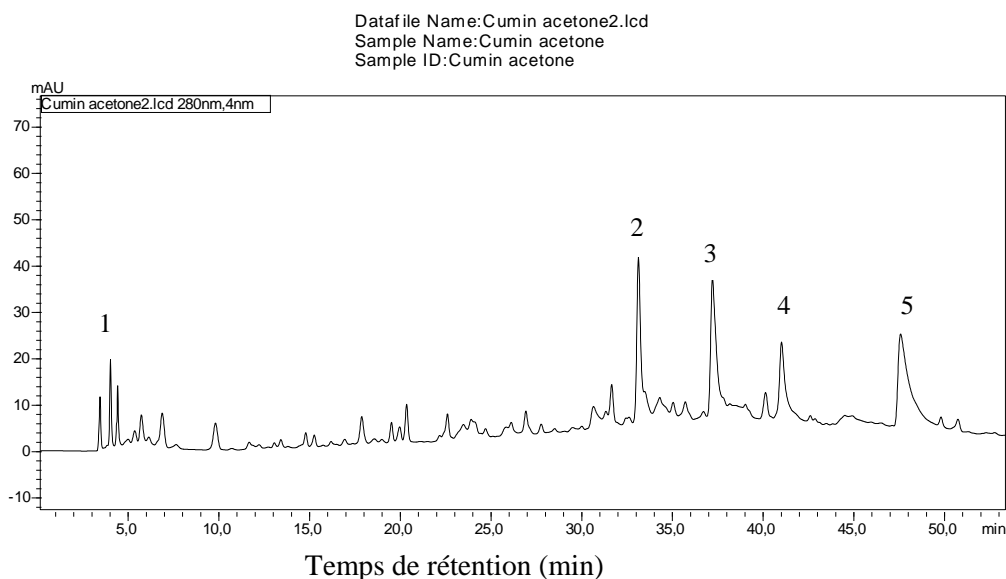


Figure 32. Profil chromatographique de l'extrait acétonique de *Cuminum cyminum*.

Le pic 1: Acide p-coumarique ; Le pic 2: Apigénine glucuronide; Le pic 3: Apigénine-7-o-glucoside ; le pic 4 : Apigénine ; le pic 5 : Diosmine.

Tableau 6. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait acétonique de *Cuminum cyminum*.

N°	Temps de rétention	Surface	% de surface	λ max	Molécule
1	4.476	105713	1.697	308	Acide p-coumarique
2	33.181	556322	8.930	266 335	Apigénine glucuronide
3	37.263	641487	10.298	265 336	Apigénine-7-o-glucoside
4	41.070	421388	6.764	265 333	Apigénine
5	47.634	934054	14.994	266 337	Diosmine

La **Figure 32** et le **Tableau 6** révèlent la quantité maximale (%) et le temps de rétention de l'échantillon de *Cuminum cyminum* identifiés dans l'extrait acétonique par HPLC. Le profil chromatographique montre la présence de plusieurs pics, dont cinq ont pu être identifiés. Tous les composés phénoliques ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et de leurs caractéristiques par rapport à ceux des standards utilisés. Les résultats montrent la présence d'acide phénolique; l'acide p-coumarique, dont la présence a été

également démontrée par **Bettaib et al. (2012)** dans l'extrait acétonique de *C. cyminum*. Des flavonoïdes ont été détectés dans notre extrait comme la diosmine qui est le composé le plus abondant, en plus de la présence de plusieurs apigénines. Les analyses réalisées par **Akroum et al. (2010)** ont également mis en évidence la présence d'apigénines. Peu de travaux ont été réalisés concernant la composition en polyphénols des graines de cumin ; **Tashtoush et al. (2016)** ont révélé que les acides gallique, vanillique et chlorogénique étaient dominant dans les graines de cumin. Des travaux réalisés par **Bettaib et al. (2012)** ont révélé la présence en grandes proportions de la luteoline, l'acide syringique et l'acide cinnamique pour le cumin tunisien, contrairement au cumin indien qui était riche en trans-2- dihydrocinnamique acide et flavone. La différence en composition des composés phénoliques peut différer, sous l'influence de plusieurs facteurs, notamment la partie de la plante, la génétique, l'origine géographique ainsi que la période de récolte, la méthode d'extraction et les conditions de stockage (**Bettaib et al., 2012**).

1.4 Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de plantes a été réalisée par deux techniques à savoir : Piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

1.4.1 Piégeage du radical libre DPPH

Le test de DPPH est utilisé pour mesurer la capacité des antioxydants présents dans les extraits de plantes, à piéger les radicaux libres de la solution DPPH en faisant don d'atomes d'hydrogène ou d'électrons, qui convertit les radicaux libres en produits plus stables (**Roudsari, 2007; Sajid et al., 2012**). Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des extraits éthanolique 70%, acétonique 70% et méthanolique 70% d'écorces de grenade et des graines de cumin. L'activité de piégeage du DPPH dans une solution d'EEG et extrait de cumin a été déterminée en pourcentage et comparée à un standard : l'acide ascorbique. La diminution de l'absorbance du radical DPPH est causée par la réaction entre ce dernier et les antioxydants présents dans nos solutions de mélanges DDPH et EEG / extrait de cumin, qui induit le changement de couleur du mélange du violet au jaune.

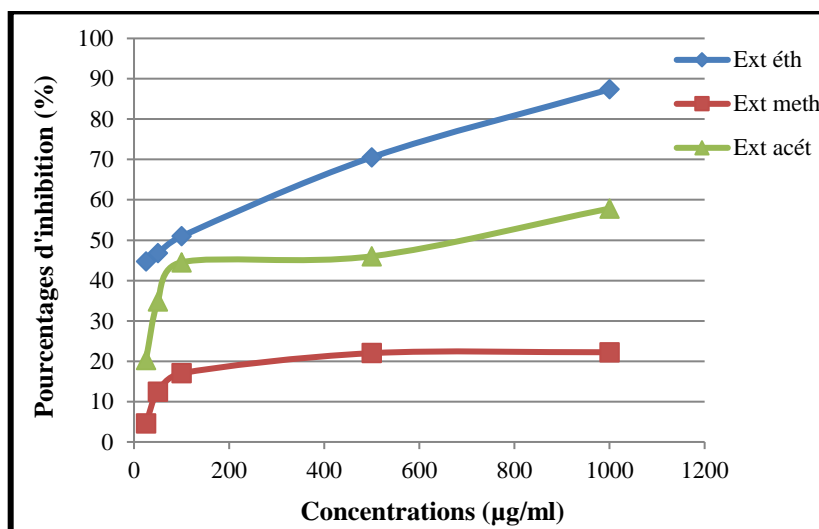


Figure 33. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique des écorces de grenades.

Ext éth : extrait hydro-éthanolique, Ext méth : extrait hydro-méthanolique, Ext acét : extrait hydro-acétonique.

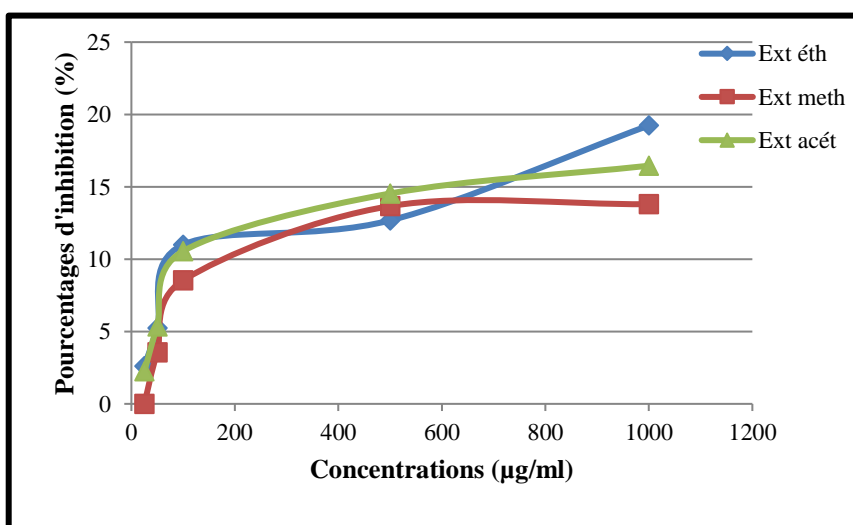


Figure 34. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits acétonique, méthanolique et éthanolique de *Cuminum cyminum*.

Ext éth : extrait hydro-éthanolique, Ext méth : extrait hydro-méthanolique, Ext acét : extrait hydro-acétonique.

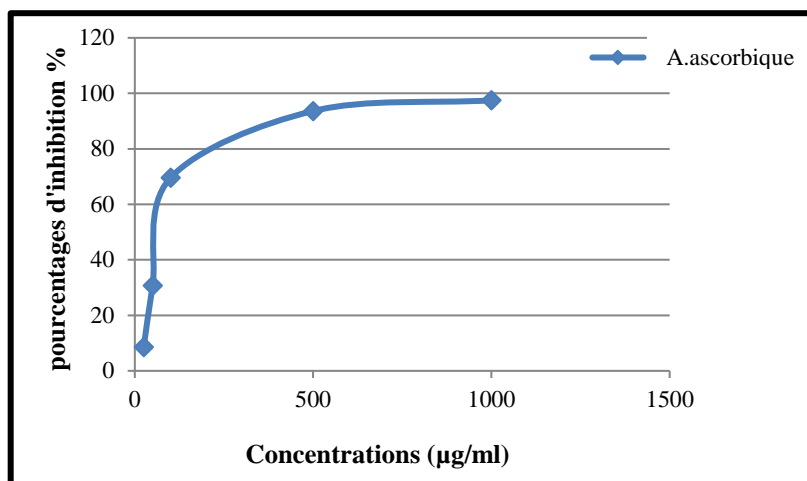


Figure 35. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

Les profils de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques obtenus, révèlent que les extraits hydroalcooliques testés ont montré une activité dose-dépendante, de plus, cette activité varie considérablement en fonction du solvant testé, comme indiqué dans les **Figures 33** et **34**.

Concernant l'EEG, l'activité de piégeage la plus élevée ($87.37 \pm 1.36\%$) était présentée par l'extrait éthanolique, suivis par l'extrait acétonique ($57.84 \pm 4.85\%$) (**Figure 33**), néanmoins, leurs activités de piégeage des radicaux DPPH est statistiquement similaire ($p > 0.05$), alors que l'EEG méthanolique avait la propriété antioxydante la plus faible ($22.23 \pm 0.76\%$) et est significativement différente de l'EEG éthanolique ($p = 0.043$). Par rapport au standard l'acide ascorbique (**Figure 35**), l'activité de piégeage des radicaux DPPH de l'EEG éthanolique était plus élevée à des concentrations allant de 25 µg/ml à 50 µg/ml, cependant, son activité antiradicalaire était inférieure à celle de l'acide ascorbique à des concentrations allant de 100 µg/ml à 1000 µg/ml, néanmoins aucune différence significative n'a été observée entre l'extrait éthanolique et l'acide ascorbique ($p > 0.05$). Ces résultats montrent que l'écorce de grenade possède un grand potentiel antioxydant surtout dans le cas de sa macération avec l'éthanol, cet effet peut être attribué à sa richesse en polyphénols et en tanins. Dans le test DPPH, l'activité de piégeage de l'extrait varie selon la méthodologie d'extraction et de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction, cela pourrait être dû à la solubilité ou à l'insolubilité de différents composés antioxydants trouvés dans l'extrait, avec différentes caractéristiques chimiques et polarités dans un solvant particulier (**Bushra et al., 2009**; **Boeing et al., 2014**). Dans la présente étude, l'éthanol s'est révélé être un meilleur solvant que l'acétone et le méthanol, les résultats sont conformes à ceux de **Malviya et al. (2014)**, qui ont

signalé que la meilleure activité antioxydante d'écorces de grenades a été trouvée dans l'extrait macéré avec 70% éthanol: 30% eau et avec 100% eau.

La **Figure 34** indique une augmentation des pourcentages d'inhibition de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Cuminum cyminum*. À la plus faible concentration (25 µg/ml) les extraits éthanolique et acétonique ont présenté des pourcentages d'inhibition presque identiques 2.6 % et 2.25 % respectivement, tandis que pour l'extrait méthanolique aucune activité antioxydante n'a été enregistrée. À la plus grande concentration (1000 µg/ml), les pourcentages d'inhibition étaient de l'ordre de 16.44 %, 13.87% et 17.75 % pour l'extrait acétonique, méthanolique et éthanolique respectivement. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Asimi et al. (2013)**, dont le pourcentage d'inhibition à une concentration de 1000 µg/ml était de 9.43%. D'après nos résultats on peut dire que l'espèce *C. cyminum* possède un pouvoir antioxydant modéré, l'activité antiradicalaire des trois extraits de cumin reste significativement inférieur ($p= 0.01$) par rapport au contrôle positif l'acide ascorbique, quand à l'analyse des trois extraits entre eux, aucune différence significative n'a été démontrée dans le pouvoir antioxydant ($p > 0.05$).

Tableau 7. Valeurs de la concentration efficace 50 (CE₅₀) des extraits d'écorces de grenades, des graines de cumin et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH.

Extrait	Ecorce du fruit de <i>Punica granatum</i>			<i>Cuminum cyminum</i>			A. ascorbique
	70% acétone	70% éthanol	70% méthanol	70% acétone	70% éthanol	70% méthanol	
CE ₅₀ (µg/ml)	510± 20	220± 14	700± 37	940±42	960±50	1180±102	200± 26

Les valeurs sont exprimées en moyenne de trois répétitions. CE₅₀: la concentration efficace. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

La concentration efficace (CE₅₀) qui est la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration du radical libre, est inversement lié à l'activité antioxydante d'un composé donné, plus la valeur de CE₅₀ est faible, plus la capacité antioxydante du composé est élevée (**Dung et al., 2008**), elle permet d'évaluer l'efficacité de nos différents extraits.

D'après le **Tableau 7**, les valeurs des CE_{50} obtenues pour les extraits de grenades étaient comprises entre $220 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ et $700 \pm 37 \mu\text{g/ml}$. La CE_{50} de l'EEG éthanolique avait la valeur la plus faible ($220 \pm 14 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux autres extraits. Une analyse faite par **Barathikannan et al. (2016)** a enregistré une CE_{50} d'écorces de grenade d'une valeur de $302.43 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ qui est assez proche de nos résultats, en revanche **Ali et al. (2014)** ont constaté une CE_{50} de l'extrait méthanolique d'une valeur de $14.75 \mu\text{g/ml}$ qui est très inférieur à notre résultat, de même pour **Kennas et Amellal-Chibane. (2019)** qui durant l'activité de piégeage du DPPH par les pelures de grenades ont enregistré des valeurs de CE_{50} de l'ordre de $76.75 \pm 2.59 \mu\text{g/ml}$, $85.37 \pm 7.05 \mu\text{g/ml}$, $147.83 \pm 5.03 \mu\text{g/ml}$, $160.01 \pm 7.28 \mu\text{g/ml}$, $183.71 \pm 8.71 \mu\text{g/ml}$ et $394.87 \pm 17.35 \mu\text{g/ml}$ pour les extraits éthanolique, 50% eau: 50% méthanol, méthanolique, acétonique, eau et l'acide ascorbique respectivement.

D'un autre côté, concernant les différents extraits de cumin, les valeurs trouvées sont comprises entre $940 \pm 42 \mu\text{g/ml}$ et $1180 \pm 102 \mu\text{g/ml}$, la CE_{50} la plus faible a été enregistrée avec l'extrait acétonique. De même les travaux réalisés par **Bettaib et al. (2012)**, ont révélé la plus faible valeur de CE_{50} avec l'extrait acétonique de cumin à 80% mais avec des valeurs inférieures aux nôtres et qui sont comprises entre $6.24 \mu\text{g/ml}$ à $236 \mu\text{g/ml}$, **Tuekaew et al. (2014)** ont également trouvé une CE_{50} de l'extrait éthanolique de cumin de l'ordre de $419.86 \pm 18.88 \mu\text{g/ml}$ qui est plus basse que notre résultat. En revanche **Demir et Korukluoglu. (2020)** ont trouvé des valeurs de CE_{50} d'une valeur de $1480 \mu\text{g/ml}$ qui est légèrement supérieur à la notre ($1180 \mu\text{g/ml}$) et $3250 \mu\text{g/ml}$ (supérieur à notre résultat $960 \mu\text{g/ml}$) pour l'extrait méthanolique et éthanolique respectivement. En comparant les valeurs de CE_{50} des différents extraits avec celle de l'acide ascorbique, la CE_{50} de l'EEG éthanolique est proche de celle du contrôle positif, quand aux CE_{50} des extraits de cumin elles sont beaucoup plus supérieures que celle de l'acide ascorbique, ce qui confirme la faible activité antioxydante de ces derniers par rapport aux extraits de grenades et à l'acide ascorbique.

Dans cette étude, une relation positive existe entre les teneurs en polyphénols, flavonoïdes, tanins et l'activité antioxydante de nos extraits. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été démontrée par l'EEG éthanolique à 70%, qui a également montré les concentrations les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes. De même, l'extrait méthanolique de grenade présentait les concentrations les plus faibles en polyphénols, en flavonoïdes et en activité antioxydante. Quand au cumin, l'extrait acétonique qui a montré l'activité antiradicalaire la plus forte, a montré également les teneurs les plus élevées en composés phénoliques. Ceci peut être dû au fait que les polyphénols semblent être des

donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale (Turkmen *et al.*, 2007). D'autres études antérieures ont également révélé que l'activité de piégeage des radicaux libres est extrêmement affectée par les composants phénoliques de l'extrait de plante (Abdel Moneim, 2013).

1.4.2 Réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits de plantes est lié à leur capacité de transfert d'électrons et à réduire Fe^{+3} en Fe^{+2} , il peut servir d'indicateur d'une potentielle activité antioxydante. Les **Figures 36 et 37** montrent le pouvoir réducteur de tous les extraits qui est exprimé en absorbance et ceci d'une manière dépendante de la concentration. Dans cette expérience, en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert pâle et en bleu.

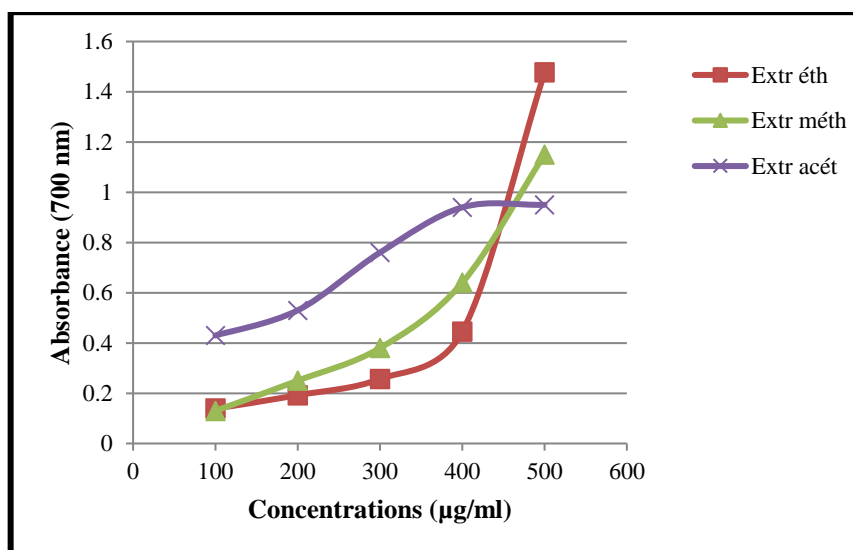


Figure 36. Pouvoir réducteur des extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum*.

Extr éth: extrait hydro-éthanolique; Extr méth: extrait hydro-méthanolique; Extr acét: extrait hydro-acétonique.

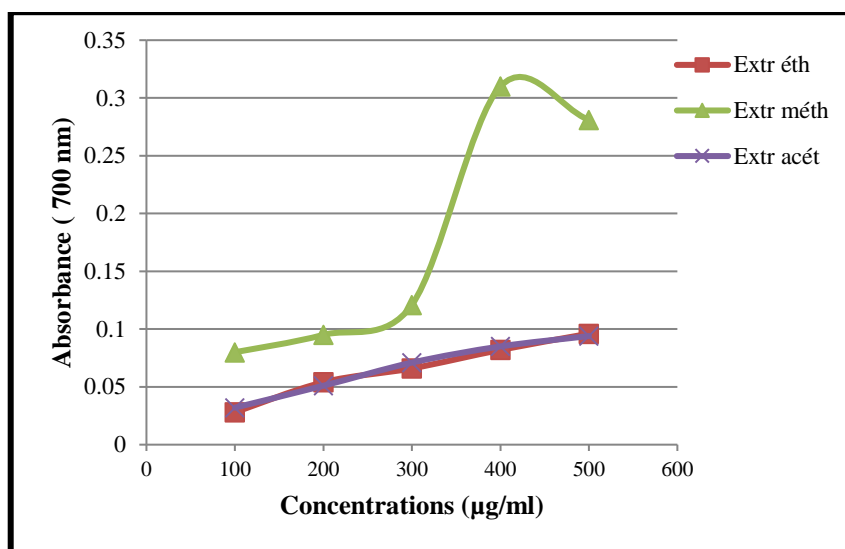


Figure 37. Pouvoir réducteur des extraits de *Cuminum cyminum*.

Extr éth: extrait hydro-éthanolique; Extr méth: extrait hydro-méthanolique; Extr acét: extrait hydro-acétonique.

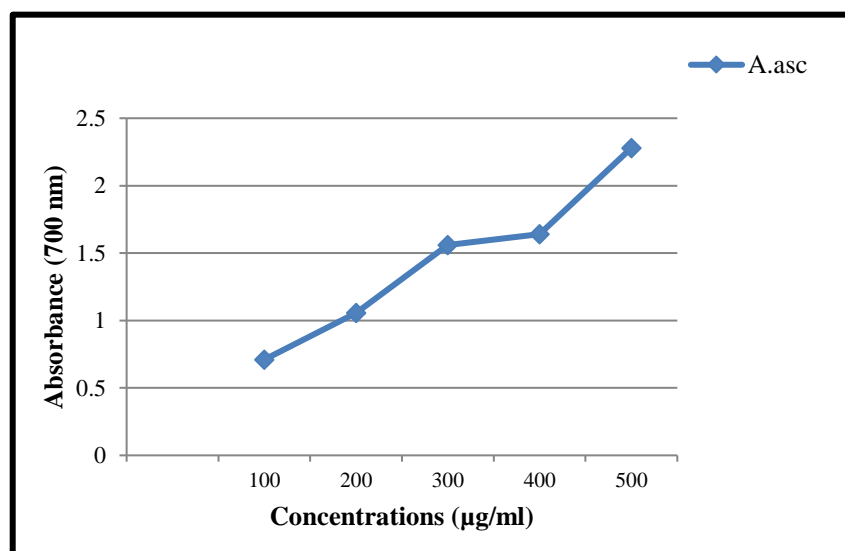


Figure 38. Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

A.asc : acide ascorbique.

Nous remarquons que les extraits de grenades ont présenté de bien plus fortes activités que celles de *C. cyminum* (**Figure 36 et 37**). Ceci est reflété par l'obtention de densités optiques (DO) élevées qui sont comprises entre 0,13 et 1,48 à 700 nm pour les extraits de grenades. L'EEG acétonique a donné les meilleures absorbances pour toutes les concentrations testées en comparant avec l'extrait éthanolique et méthanolique à l'exception de la plus grande concentration (500 µg/ml), où c'est l'extrait éthanolique qui a montré la plus forte activité antioxydante. Des résultats similaires ont été rapportés par **Thitipramote et al. (2019)**, où les EEG acétonique et éthanolique présentaient les composés bioactifs les plus élevés et la plus forte activité antioxydante dans le dosage du pouvoir réducteur ferrique.

D'autres auteurs ont trouvé les meilleurs résultats de l'activité antioxydante dans les EEG méthanoliques (Li *et al.*, 2006; Pagliarulo *et al.*, 2016), les différences de résultats peuvent être attribuées au type de variété de la grenade, au temps de stockage, à la date de récolte, aux conditions climatiques et la méthode d'extraction, ainsi qu'à la concentration du solvant (Moure *et al.*, 2001; Robards, 2003; Pinelo *et al.*, 2004). Dans cette étude, aucune différence significative entre l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique et l'extrait acétonique n'a été observée ($p > 0.05$), contrairement aux extraits éthanoliques et méthanoliques ($p < 0.05$). En comparant entre les solvants, aucune différence significative dans l'activité n'a été enregistrée ($p > 0.05$).

Pour les extraits de cumin (**Figure 37**), le pouvoir réducteur des extraits acétonique, éthanolique et méthanolique à différentes concentrations a montré une gamme de valeurs d'absorbance allant de 0.03 pour l'extrait éthanolique à la plus faible concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) à une absorbance de 0.31 pour l'extrait méthanolique à une concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$. L'extrait méthanolique s'est révélé avoir la plus forte capacité antioxydante et ceci sans avoir une différence significative dans l'activité avec les autres extraits ($p > 0.05$). En revanche, l'acide ascorbique avec des valeurs d'absorbance de 0.71 à 2.28 a été plus active que tous les extraits de *C. cuminum* ($p < 0.05$).

Il est à noter, que dans la même méthode, une petite différence de polarité du solvant peut fournir des réponses différentes dans l'activité antioxydante (Santos et Gonçalves, 2016). Le cumin est connu pour avoir des propriétés antioxydantes, en réduisant la susceptibilité de l'oxydation des lipides (Athamena, 2009).

La détermination de la CE_{50} permet d'évaluer l'efficacité des extraits et d'apprécier encore mieux les résultats. Nous remarquons que la capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux est variable entre les différents extraits des deux plantes. En effet, selon le **Tableau 8**, les extraits de grenades présentent les valeurs les plus faibles en CE_{50} et ceci surtout avec l'extrait éthanolique, pour les extraits de cumin, la plus basse CE_{50} a été enregistrée avec l'extrait méthanolique. Cependant, ces concentrations restent élevées par rapport à celle de l'acide ascorbique (58 $\mu\text{g/ml}$).

Tableau 8. Valeurs de la concentration efficace 50 (CE₅₀) des extraits d'écorces de grenades, des graines de cumin et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP.

Extrait	Ecorce du fruit de <i>Punica granatum</i>			<i>Cuminum cyminum</i>			A. ascorbique
	70% acétone	70% éthanol	70% méthanol	70% acétone	70% éthanol	70% méthanol	
CE ₅₀ (µg/ml)	150± 0.7	110± 06	190± 21	3040±47	2950±25	820±36	58± 0.9

Il est bien connu que la capacité antioxydante des aliments est dérivée de l'action synergique d'une grande variété d'antioxydants. Pour cela, il est généralement nécessaire de combiner plusieurs méthodes afin d'évaluer *in vitro*, la capacité antioxydante des denrées alimentaires (**Santos et Gonçalves, 2016**). De ce fait, nous avons utilisés deux techniques à savoir le test de DPPH et de FRAP, car ils sont parmi les tests les plus utilisés pour l'évaluation de l'activité en sujet, et ceci afin d'obtenir des informations complètes sur la réponse des composés présents dans les échantillons testés dans différentes conditions expérimentales. En comparant les résultats des deux techniques, tout d'abord pour les extraits de grenades nous pouvons dire que les résultats sont proches, car par le test de DPPH c'est l'extrait éthanolique qui a montré la plus forte activité suivie de près par l'extrait acétonique, concernant le test de FRAP c'est l'extrait acétonique qui s'est révélé le plus fort mais suivie de très près par l'extrait éthanolique.

En revanche, pour les extraits de *C. cyminum*, par le test de DPPH la plus grande activité a été enregistrée avec l'extrait acétonique et la plus faible par l'extrait méthanolique, tandis que pour le test de FRAP, c'est l'extrait méthanolique qui a montré le plus fort pouvoir antiradicalaire, sachant que c'est ce dernier qui a démontré les teneurs les plus faibles en composés phénoliques. Dans ce cas, nous remarquons l'absence de corrélation entre le pouvoir antioxydant et les teneurs en polyphénols, cette confirmation est largement répandue dans la littérature (**Sun et Ho, 2005**). Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols qui exhibe une activité antioxydante puissante (**Moure et al., 2001**), ce résultat concorde également avec **Miliauskas et al. (2004)** qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre. **Hinneburg et al. (2006)** ont constaté que l'hydrodistillat du cumin a une activité antioxydante, qui varie selon

le type d'essai utilisé. De même, **Gachkar et al. (2007)** ont constaté aussi que l'activité antioxydante diffère selon le test utilisé. L'huile essentielle du romarin est meilleure que celle du cumin dans le test de DPPH, tandis que celle du cumin est meilleure dans l'essai de blanchissement du β -carotène (**Athamena, 2010**).

2. Isolement et identification des souches microbiennes

2.1 Isolement et identification des souches bactériennes

Durant notre étude, des échantillons ont été prélevés sur 37 patients hommes, femmes et enfants de différents groupes d'âges, tous les échantillons ont été cultivés sur différents milieux de cultures (gélose au sang, Mac Conckey et chapman), des méthodes conventionnelles ont été utilisées pour l'isolement et l'identification de ces souches. Plusieurs colonies différentes ont poussées sur les différents milieux, une diversité dans la taille, la forme et la couleur a été observée, plusieurs repiquages sur la gélose nutritive ont été effectués pour obtenir des cultures pures. Une sélection de souches a été faite, sur la base d'une coloration de Gram ainsi que de tests biochimiques (catalase, oxydase, vogue proskauer, methyl red, fermentation de différents sucres et le test d'hémolyse sur la gélose au sang, ainsi que le test API 20 Strep pour les cocci Gram+ catalase -). Un criblage de ces isolats bactériens a été réalisé suivant leurs capacités de formation de biofilm, qui à la fin a abouti à une sélection de 6 bactéries pour la suite de notre étude.

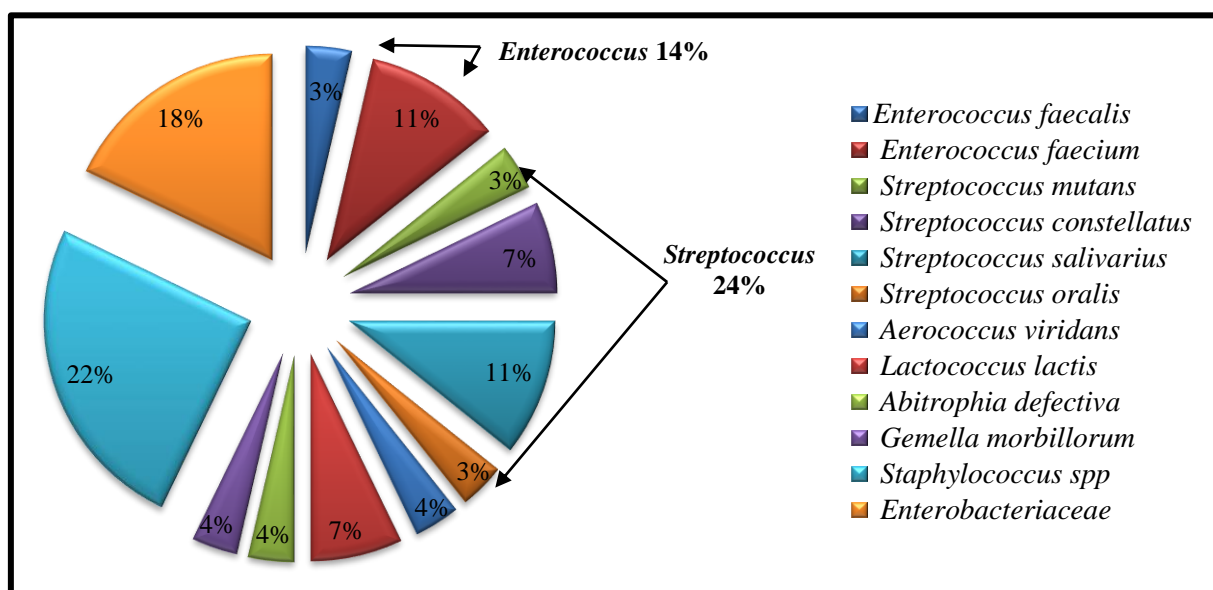


Figure 39. Répartition de différentes souches bactériennes isolées.

D'après les résultats de la **Figure 39**, il est clair que les bactéries cocci Gram+ sont les plus abondantes (82%) (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Abitrophia*, *Gemella* et *Staphylococcus*), parmi lesquelles le genre le plus isolé est celui des streptocoques (24%), suivie des staphylocoques (22%), puis des entérocoques (14%). Les bactéries Gram- sont minoritaires avec une proportion de 18% et qui sont représentées par les entérobactéries, ce qui est en accord avec les résultats d'une étude antérieure (**Rozkiewicz, 2006**).

Des études réalisées sur la microflore des plaques supragingivales et sous-gingivales d'échantillons appartenant à des adultes "sains" indemnes de caries de l'ouest Algérien et des adultes cariés, a confirmée la présence de certaines espèces retrouvées également dans notre étude: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus acidomonimus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus sp.*, *Aerococcus viridians*, *Lactococcus lactis*, *Klebsiella pneumonia*, *Aeromonas hydrophila*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *Propionibacterium propionicum*, *Prevotella sp.*, *Fusobacterium mortiferum*, *Capnocytophaga sp.*, *Bacteroides sp.* et *Porphyromonas assacharolytica* (**Ziouani et al., 2015 ; Hoceini, 2017**). En plus de la présence de différents genres de champignons comme *Candida*, *Cladosporium*, *Saccharomycetales*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Cryptococcus* (**Dekaboruah et al., 2020**).

Le microbiote buccal est un domaine de recherche passionnant et en expansion, il est essentiel à la santé car il peut provoquer des maladies buccales et systémiques. Ce microbiote est contenu dans des biofilms dans toute la cavité buccale, son équilibre peut être interrompu sous l'influence de certains changements écologiques, ce qui va permettre aux pathogènes de proliférer et de provoquer des maladies. Les formes graves de maladies buccales peuvent amener des maladies systémiques à différents sites du corps (**Zarco et al., 2012 ; Deo et Deshmukh, 2019**).

Parmi les bactéries buccales, *Streptococcus* et *Enterococcus* qui sont deux membres importants car elles peuvent changer leur mode de vie, de la microflore bénéfique à la surface de la cavité buccale et de l'oropharynx, à des agents pathogènes destructeurs lorsqu'ils ont accès aux tissus buccaux et à la circulation sanguine quand l'homéostasie est rompue (**Rahman et al., 2015**). Les streptocoques buccaux représentent environ 20 % du total des bactéries buccales, elles comportent des bactéries inoffensives et dangereuses. Chaque espèce

présente des propriétés spécifiques pour coloniser les différents sites buccaux soumis à différents changements. Quand un déséquilibre s'installe au sein de la microflore, des streptocoques commensaux peuvent devenir des pathogènes opportunistes initiateurs de maladies et de dommages chez l'hôte (**Nicolas et Lavoie, 2011**). Les streptocoques buccaux sont organisés en 4 groupes : mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattii*), salivarius (*S. salivarius*, *S. vestibularis*), anginosus (*S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. anginosus*) et mitis (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. mitis*,...) (**Guillaume et Marc, 2011**).

Streptococcus mutans a un rôle majeur dans la formation des caries dentaires, il transforme les sucres alimentaires en acides ce qui induit à la diminution du pH, en parallèle des bactéries productrices de bases tels que *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus oralis* neutralisent l'acide pour maintenir la santé bucco-dentaire, cette dernière est entravée lorsqu'un déséquilibre s'installe entre les bactéries productrices de bases et d'acides (**Sonkusale et Tale, 2015**). La souche *S. mutans*, a un rôle dans le développement de maladies systémiques, notamment la maladie inflammatoire de l'intestin, la néphropathie à immunoglobulines et l'hémorragie intracérébrale (**Tonomura et al., 2019**). Des niveaux accrus de *Streptococcus mutans* sont considérés comme de solides prédicteurs de futures caries. Des études ont démontré que d'autres streptocoques oraux pourraient également contribuer à ces infections carieuses, de plus les streptocoques oraux peuvent aussi provoquer les maladies parodontales, qui affectent les gencives et les os soutenant la dent (**Chhatwal et Graham, 2017**), ils peuvent notamment accéder à la pulpe de la dent et à la région autour de la racine, et se multiplier dans l'espace confiné pour produire un abcès. Un large éventail d'espèces peut être isolé de l'abcès dentaire; parmi les plus courantes, les streptocoques du groupe anginosus notamment *Streptococcus constellatus*, qu'on retrouve dans les abcès profonds chez les patients immunodéprimés (**Carrère et al., 2008**). De nombreuses preuves ont démontré l'implication des streptocoques dans d'autres abcès, notamment les abcès péri-amygdaliens qui sont des infections graves pouvant entraîner des complications potentiellement mortelles, des abcès pulmonaires et cérébraux qui sont associés à une mortalité élevée. De plus, les Streptocoques du groupe anginosus ont également été identifiés comme la cause des abcès hépatiques (**Chhatwal et Graham, 2017**).

Les staphylocoques ne sont généralement pas isolés de la cavité buccale et lorsqu'ils s'y trouvent, ils sont considérés comme faisant partie du microbiote transitoire (**Loberto et al., 2004**). Ils sont des résidents communs de la flore nasale, ils peuvent donc systématiquement passer dans la bouche, la contamination par la flore cutanée est également

possible; les espèces de *Staphylococcus* pouvaient survivre dans la flore buccale car il a été démontré que *S. aureus* et *S. epidermidis* étaient isolés en continu de cultures collectées de la bouche (Güçlü *et al.*, 2007 ; Ohara-Nemoto *et al.*, 2008). Chez les individus immunodéprimés, ces micro-organismes peuvent apparaître en plus grand nombre. Les patients atteints de maladie parodontale représentent des réservoirs possibles de ces bactéries opportunistes dans la cavité buccale (Loberto *et al.*, 2004). De plus *Staphylococcus epidermidis* peut être un agent de la gingivite et des infections endodontiques (Zawadzki *et al.*, 2016).

Parmi les souches bactériennes à Gram positif, *Enterococcus faecalis* et *E. faecium*, fréquentes dans le gros intestin humain et sporadiquement présentes dans la bouche saine, ont été fréquemment isolées des cavités buccales de populations analysées, et chez des patients ayant des troubles du système masticateur (Perkowski *et al.*, 2012 ; Zawadzki *et al.*, 2016). Des travaux algériens ont rapportés la présence de l'*Enterococcus* chez les sujets cariés (Hoceini *et al.*, 2016). Ces bactéries peuvent devenir opportunistes et provoquer de graves infections, surtout chez les personnes immunodéprimées et les personnes âgées (Zawadzki *et al.*, 2016). Il a été démontré qu'*E. faecalis* est fréquemment détecté dans les infections endodontiques persistantes, il semble également être l'une des bactéries les plus courantes dans les infections endodontiques primaires (Amalia *et al.*, 2019). En effet, les entérocoques sont associés à l'infection de la pulpe nécrotique, aux infections des canaux radiculaires et à la parodontite. Les facteurs de virulence d'*E. faecalis* et *E. faecium* sont la production de gélatinase, l'hémolyse et la formation de biofilm. De plus, la virulence entérococcique est en corrélation avec la colonisation du tissu hôte, la compétition avec d'autres bactéries, la modulation des mécanismes de défense de l'hôte, l'invasion et la formation d'abcès à partir de toxines ou de processus inflammatoires (Durgesh *et al.*, 2016).

D'autres genres apparentés aux Streptocoques, mais moins étudiés, *Abiotrophia*, *Gemella* et *Granulicatella* sont également extrêmement communs, ils sont fréquemment détectés dans la bouche (Dewhirst *et al.*, 2010). Les *Abiotrophia* spp. ont été appelés streptocoques variant sur le plan nutritionnel, en raison de leur exigence nutritionnelle fastidieuses pour la croissance, ils étaient décrits comme des streptocoques viridans «non groupables». Ces derniers tendent à former des colonies satellites autour de *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries, y compris certaines Enterobacteriaceae et streptocoques (Ince *et al.*, 2002). Concernant *Gemella*, cette bactérie s'est avérée présente dans la plaque dentaire des enfants ayant des dents cariées (Hoceini, 2017).

La souche *Aerococcus viridans* a également été isolée par **Hoceini et al. (2016)**, sur des échantillons de plaques supragingivales avec une proportion de 6% chez les personnes saines contre 22% chez des personnes avec caries, cette bactérie n'est présente qu'en très petit nombre dans les voies respiratoires supérieures des personnes normales, et elle peut être présente en petite quantité sur une peau normale. Il n'y a eu aucun rapport sur l'isolement de cette bactérie de la plaque dentaire avant les études de **ziouani et al. (2015)** qui ont révélé la présence d'une fréquence importante d'*A. viridans* dans les plaques supragingivales d'adultes algériens (**Hoceini et al., 2016**).

Les entérobactéries sont considérées comme des organismes transitoires de la cavité buccale. Ce sont des organismes pathogènes pouvant provoquer des maladies systémiques. Des études suggèrent que les entérobactéries peuvent provoquer une cellulite post-extractionnelle, une ostéomyélite (inflammation de l'os) et également une bactériémie entraînant une morbidité et une mortalité. Des recherches, ont dévoilées que la manipulation chirurgicale chez les patients infectés par des entérobactéries peut conduire à des infections localisées, telles que la gingivite et des infections systémiques conduisant même à une endocardite infectieuse (**Sreela et al., 2017**).

2.1.1 Caractérisation morphologique des isolats

❖ Etude macroscopique

Six souches qui ont présentées une formation significative de biofilm, ont été sélectionnées pour la poursuite de notre travail (**Tableau 9**). Une incubation a été réalisée de 24 heures à 37°C sur Mac conkey agar et sur gélose nutritive en aérobiose pour les entérobactéries, et de 48 heures en anaérobiose et aérobiose pour les cocci catalase⁻ sur la gélose M17 et cocci catalase⁺ sur milieu Chapman respectivement, les résultats sont illustrés sur les **Figures (40, 41, 42, 43, 44 et 45)**.

Tableau 9. Résultats de l'identification phénotypique des isolats.

Isolats	Aspect des colonies sur gélose
<i>Streptococcus mutans</i>	Petites colonies rondes translucides
<i>Gemella morbillorum</i>	Moyennes colonies crémeuses
<i>Enterococcus faecalis</i>	Petites colonies rondes, lisses à contour régulier
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colonies de taille moyenne, blanches, opaques et plates
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Grandes colonies, larges sous forme de dôme très muqueuses, luisantes
<i>Enterobacter bugandensis</i>	Colonies circulaires, de taille moyenne, légèrement mucoïde, de couleur rose



Figure 40. Aspect macroscopique de *Streptococcus mutans* sur M17



Figure 41. Aspect macroscopique d'*Enterococcus faecalis* sur M17



Figure 42. Aspect macroscopique de *Gemella morbillorum* sur M17

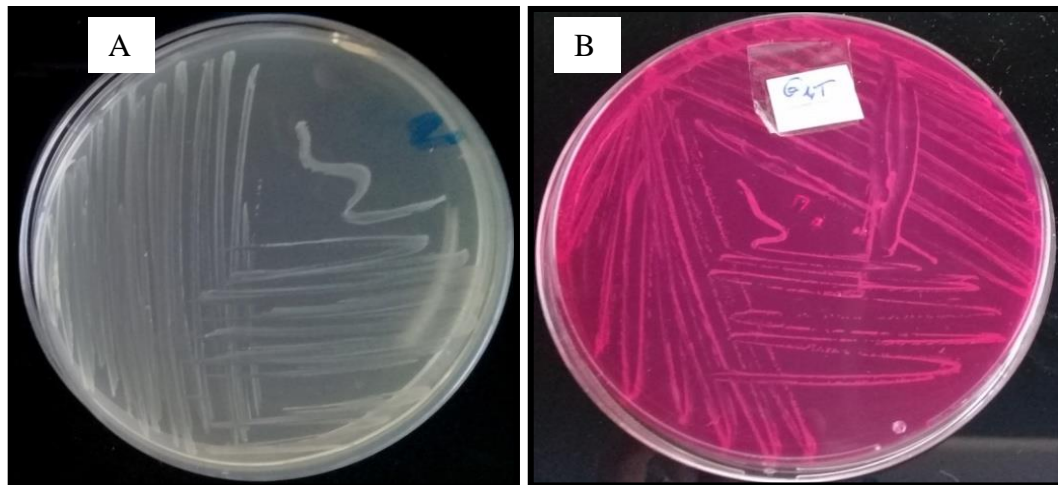


Figure 43. Aspect macroscopique de *Staphylococcus epidermidis* sur gélose nutritive (A) et Chapman (B).



Figure 44. Aspect macroscopique de *Klebsiella oxytoca* sur la gélose nutritive.

Figure 45. Aspect macroscopique d'*Enterobacter bugandensis* sur gélose Mac conkey.

❖ Etude microscopique

Le **Tableau 10** illustre les résultats de la coloration de Gram sur nos 6 souches bactériennes.

Tableau 10. Résultats de l'identification microscopique des isolats.

Isolats	Gram	Forme et mode de regroupement	Mobilité
<i>Streptococcus mutans</i>	+	Cocci en paires et en petites à moyennes chainettes	Immobile
<i>Gemella morbillorum</i>	+	Cocci en paires, en chainettes moyennes	Immobile
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cocci en paires et en chainettes	Immobile
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	Cocci en paires, amas, rarement en chainette	Immobile
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Petit bâtonnets en paires	Immobile
<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	Coccobacille, en paire, rarement en chainette	Mobile

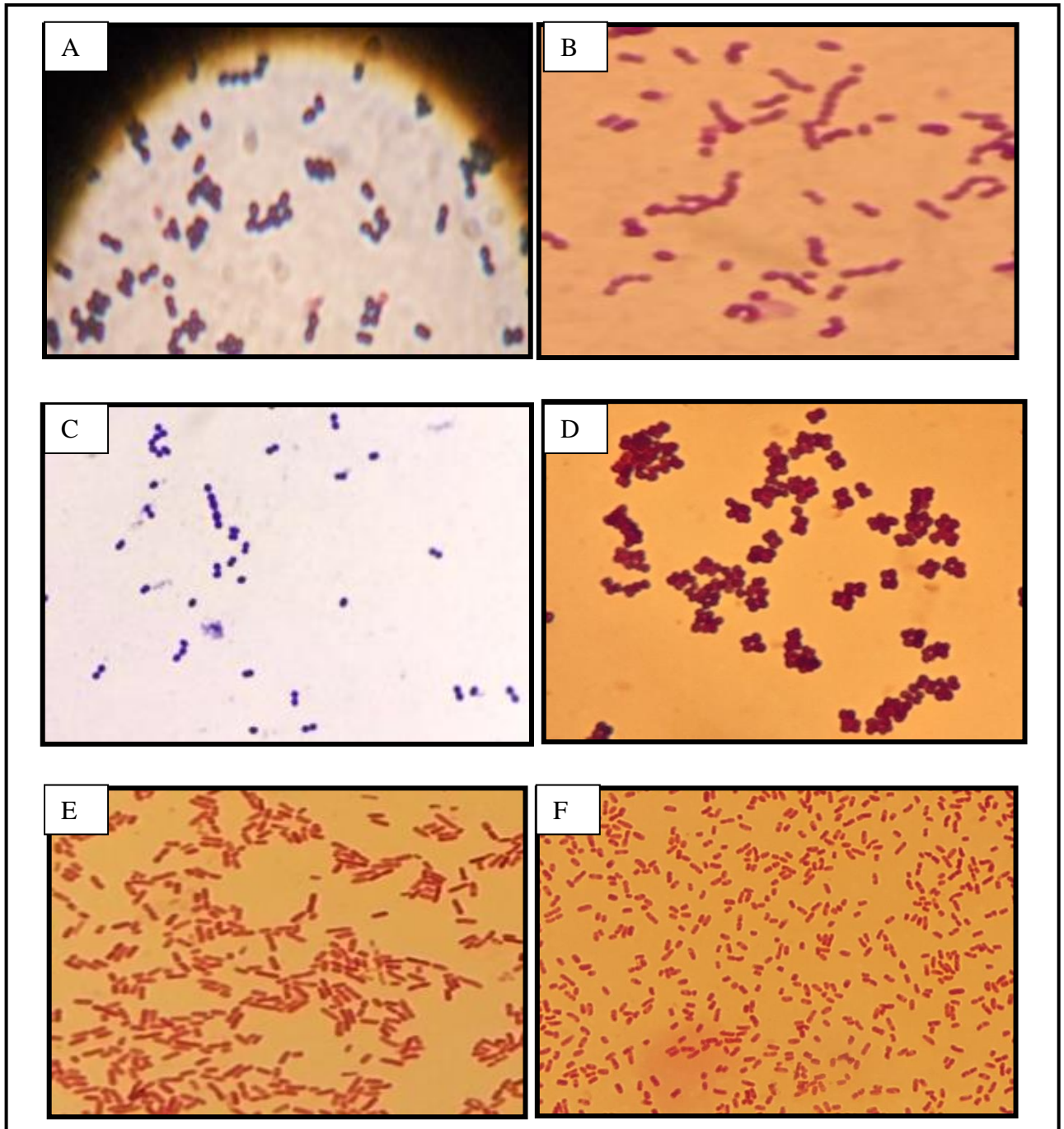


Figure 46. Aspects microscopiques des différentes souches bactériennes.

A : *S. mutans*, B : *G. morbillorum*, C : *E. faecalis*, D : *S. epidermidis*, E : *K. oxytoca*, F : *E. bugandensis*

2.1.2 Identification biochimique

Quelques tests biochimiques ont été réalisés sur nos souches (le test de la catalase, le test d'oxydase, Vogue proskauer) le test d'hémolyse réalisé sur la gélose au sang (**Tableau 11**), ainsi que la galerie API 20 Strep pour les cocci Gram+ catalase -.

Tableau 11. Résultats de quelques tests biochimiques

Isolats	V.P	Catalase	Oxydase	Type d'hémolyse
<i>Streptococcus mutans</i>	+	-	-	Alpha (α)
<i>Gemella morbillorum</i>	-	-	-	Alpha (α)
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	Béta (B)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	-	Alpha (α)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	Gamma (γ)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	+	+	-	Alpha (α)

Béta (B) : hémolyse totale, Alpha (α) : hémolyse partielle, Gamma (γ) : absence d'hémolyse.

Les résultats obtenus à partir des galeries API 20 Strep, sont indiqués dans **la Figure 47**, les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

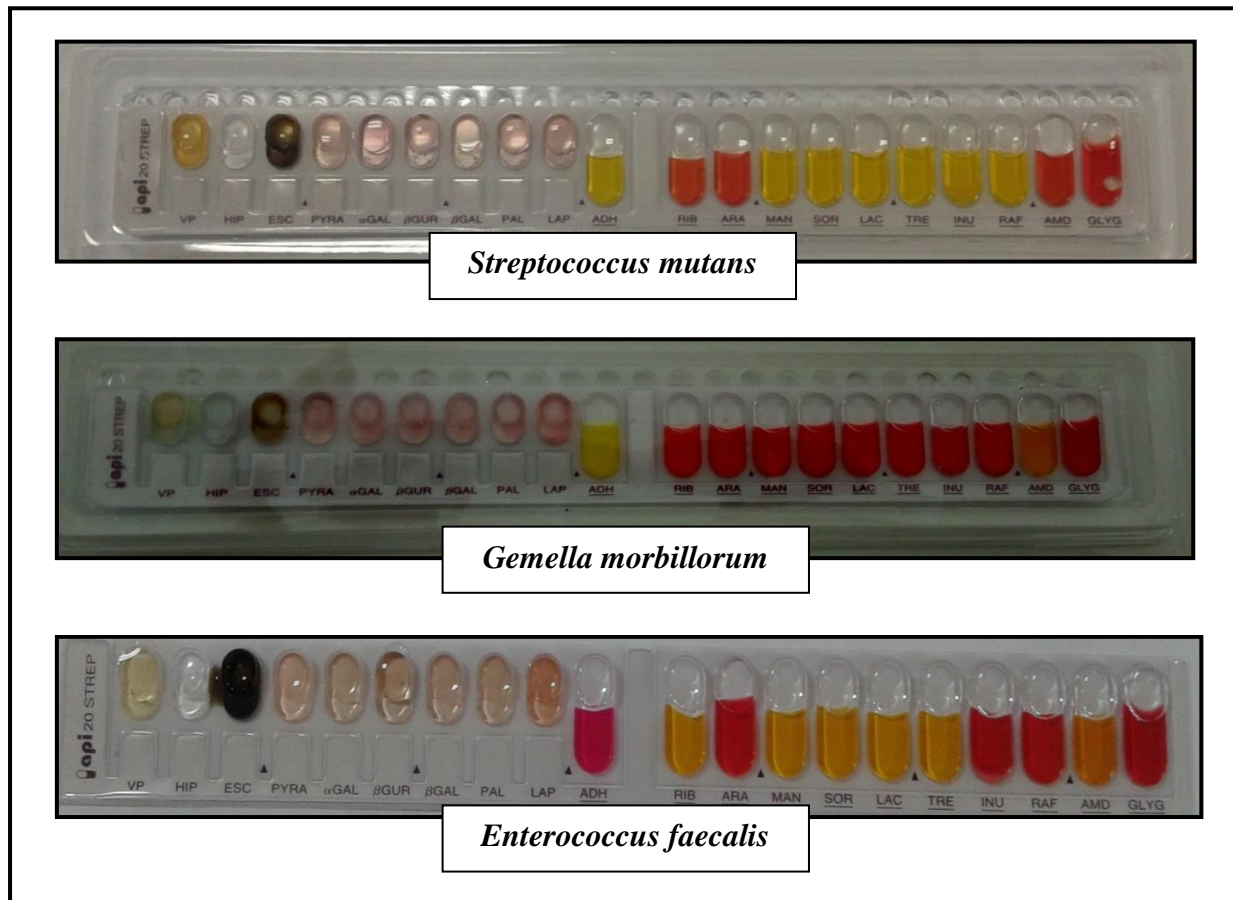


Figure 47. Résultats des tests biochimiques des galeries API 20 Strep.

2.1.3 Identification géotypique des souches bactériennes

Une sélection de 4 souches a été faite pour cette analyse. Les tests d'identification classiques basés sur la morphologie et les tests biochimiques ont été confirmés par une identification moléculaire pour un résultat plus précis. Le mélange des fragments de produits PCR est par la suite séparé par électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 48**).

Les séquences 16S de l'ADNr de nos 4 isolats (chaque isolat a été amplifié et séquencé par deux exemplaires) ont été alignées et comparées par le programme « BLAST » (Basic Local Alignment Search Tool) en utilisant la banque de données NCBI (National Center of Biotechnology and Information) afin de déterminer les séquences connues les plus proches et leurs affiliations phylogénétiques.

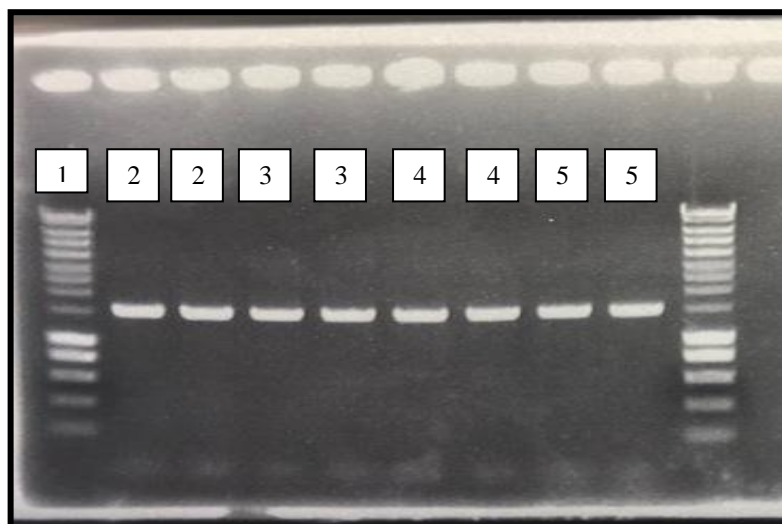


Figure 48. Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification de l'ADN 16s de nos 4 isolats bactériens (2-5).

1 : Marqueur de taille d'ADN ; 2-5 : nos 4 isolats en deux exemplaires.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de similarité avec les souches les plus proches, et sont résumés comme suit :

- Le test de BLAST effectué pour la séquence 16s de l'ADNr de l'isolat 2 a montré une similitude de 99% avec la souche *Staphylococcus epidermidis*.
- Le test de BLAST effectué pour la séquence 16s de l'ADNr de l'isolat 3 avec une homologie de 99,7% avec la souche *Enterococcus faecalis*.
- Le test de BLAST effectuée pour la séquence 16s de l'ADNr de l'isolat 4 a montré une similitude de 99 % avec la souche *Klebsiella oxytoca*.
- Le test de BLAST effectué pour la séquence 16s de l'ADNr de l'isolat 5 a montré une similitude de 99% *Enterobacter bugandensis*.

2.2 Identification des souches fongiques

Les résultats de la **Figure 49** montrent que dans la répartition des espèces, une prédominance de *Candida albicans* par rapport aux autres espèces a été observée.

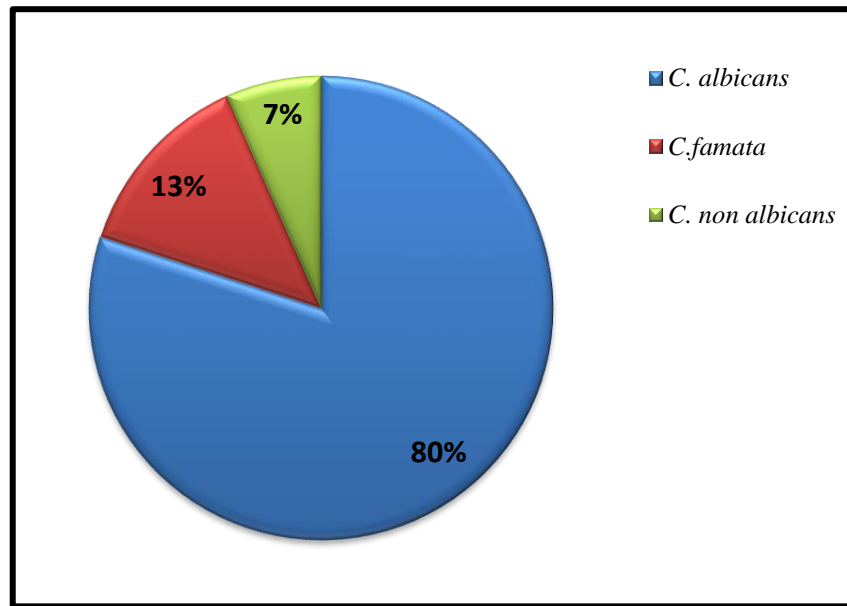


Figure 49. Répartition des différentes espèces de *Candida* isolées

2.2.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique des colonies des espèces de *Candida* cultivées en aérobiose à 37°C sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol montre qu'il s'agit de colonies crémeuses, lisses, rondes et bombées (*C. albicans* et *C. famata*) et d'autres rigides et mats (non *C. albicans*) (**Figure 50**).

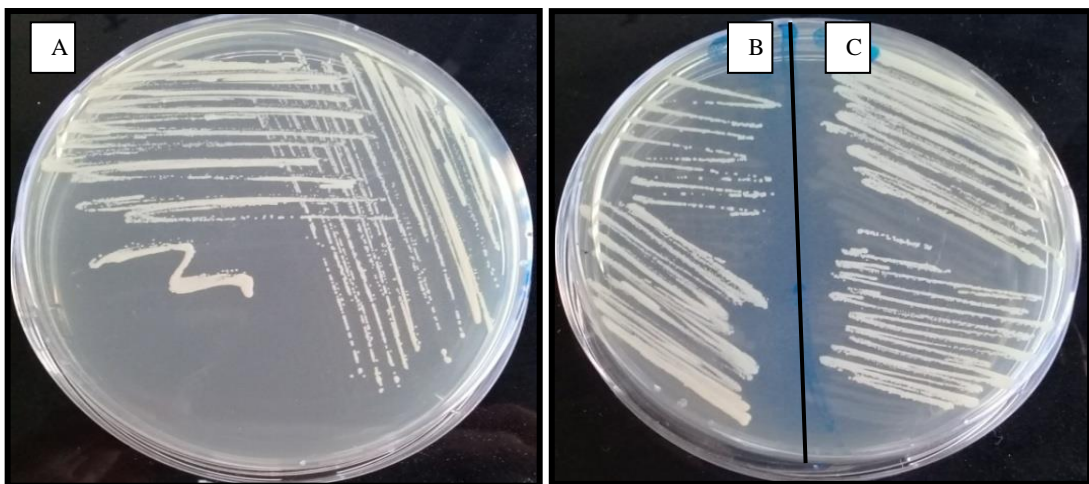


Figure 50. Aspect macroscopique de *Candida albicans* ATCC 10231(A), *Candida albicans* 4 (B) et *Candida albicans* 3(C) sur gélose Sabouraud.

2.2.2 Examen microscopique

Les souches de *Candida* apparaissent sous microscope à l'état frais et après une coloration à la fushine sous forme de blastospores, qui représentent des cellules rondes à ovoïdes, avec parfois la présence de bourgeons (**Figure 51**).

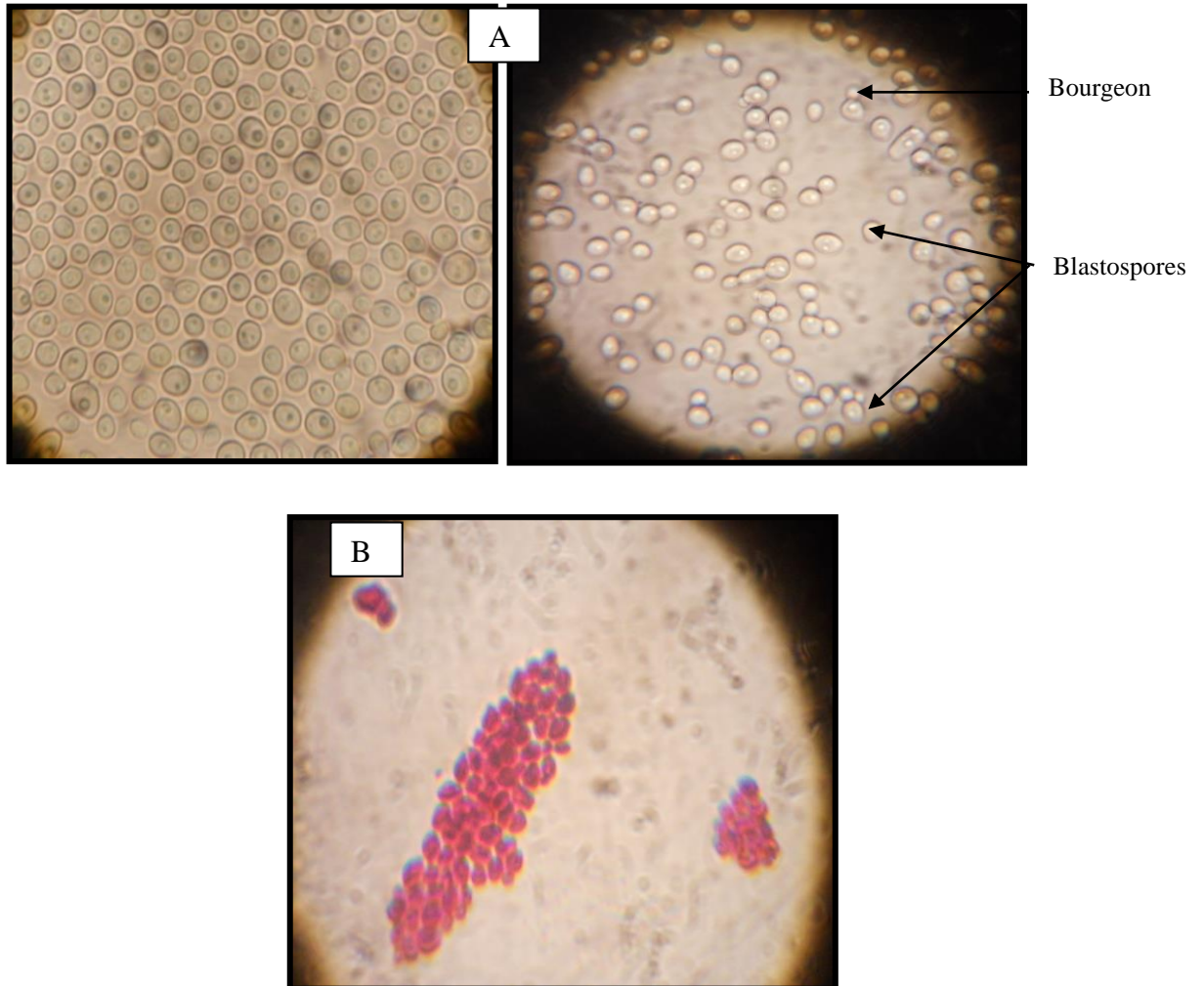


Figure 51. Aspects microscopiques des souches de *Candida albicans*.

A : Examen direct par état frais, B : Observation microscopique des cellules de *Candida* colorées à la fushine au microscope optique.

2.2.3 Tests d'identification de *Candida albicans*

Les différentes souches de levures isolées ont fait l'objet de divers tests d'identification (test de blastèse, test de chlamydosporulation et le test des galeries API *Candida*) pour la sélection des souches de *Candida albicans* pour la suite de notre étude.

Candida albicans peut exister sous différents stades morphologiques, la **Figure 52** montre la présence du tube germinatif après une sous-culture dans du sérum humain à 42°C

pendant 3 heures, pour le test de chlamydosporulation, on voit la présence de chlamydoespores qui sont des cellules sphériques volumineuses, terminales ou latérales. Les chlamydoespores sont la forme de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon au laboratoire, cette levure se caractérise par sa capacité à former des chlamydoespores et des filaments vrais ou hyphes qui jouent un rôle important dans sa virulence (**Gigou-cornet, 2006**). Toutes ces transitions morphologiques se mettent en place en réponse à des changements des conditions environnementales, et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différentes niches biologiques (**Euzeby, 1994**). La pathogenèse requiert une expression différentielle des facteurs de virulence à chaque nouvelle étape du processus, la capacité de la transformation rapide du phénotype chez *C. albicans* est un élément important dans le potentiel pathogène élevé de cette souche (**Belahcen El Ouali, 2016**).

C. albicans et *C. dubliniensis* sont les seules espèces capables de former les chlamydoespores, donc pour mieux préciser nos résultats, des tests d'assimilations de sucres et de réactions enzymatiques présents au niveau des galeries API Candida ont été réalisés. L'interprétation des résultats a été effectuée par le logiciel Api Web (bioMérieux, France) (**Figure 53**).

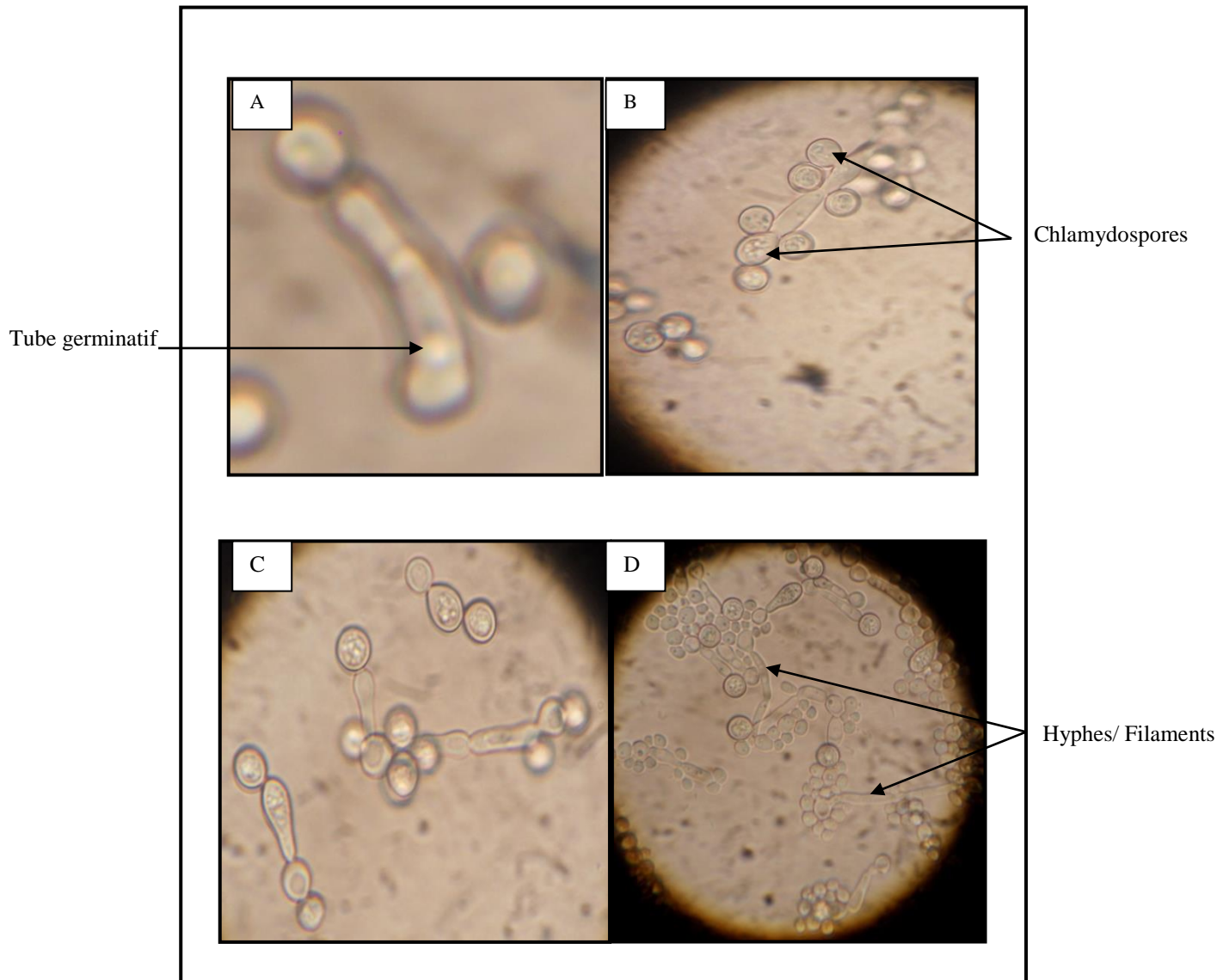


Figure 52. Différents aspects morphologiques sous microscope des levures du genre *Candida*.

A : Tube germinatif (test de blastèse). B,C,D : Chlamydo-spores terminales et formation de mycelium de *C. albicans* sur milieu minéral (test de chlamydo-spourulation).

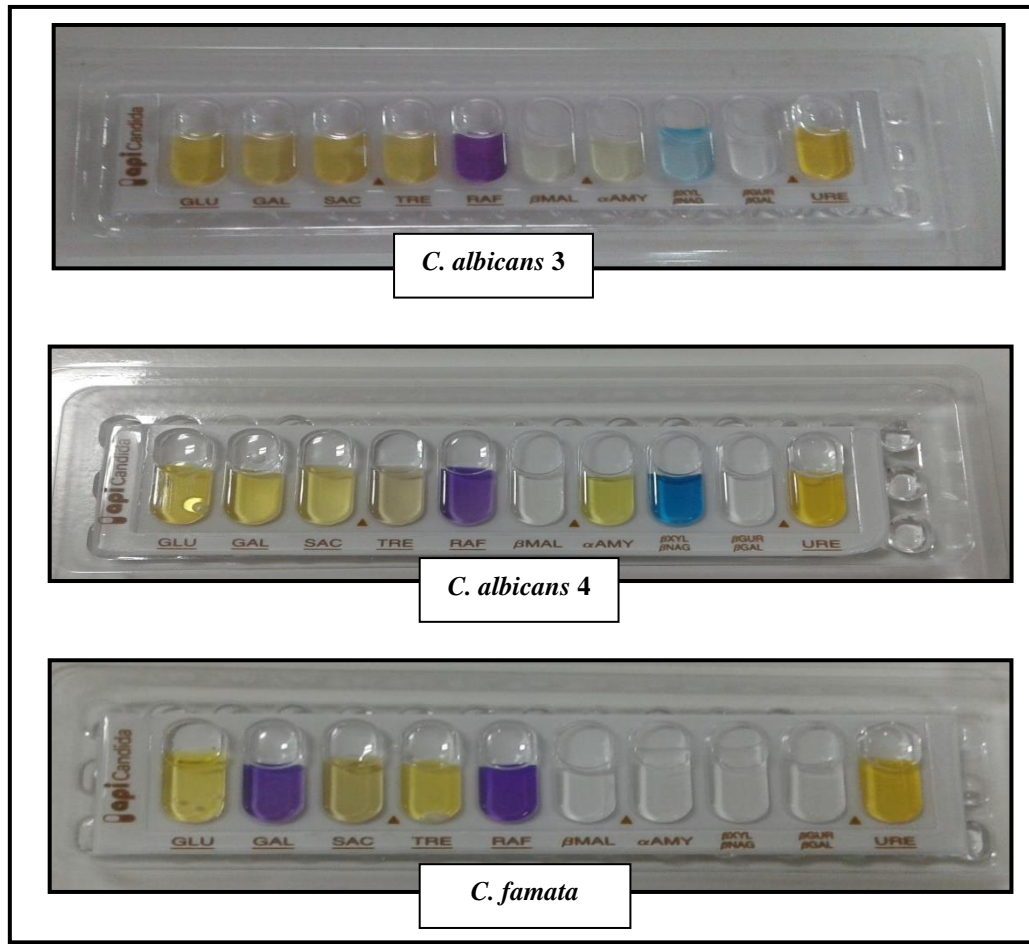


Figure 53. Test d'identification des souches de *Candida* par la galerie API Candida.

La candidose buccale est une infection opportuniste de la cavité buccale, elle est très répandue chez l'humain et elle est causée par la croissance accélérée des champignons unicellulaires du genre *Candida* (Abu-Elteen et Abu-Elteen, 1998). *C. albicans* est de loin le principal agent de la candidose buccale, représentant jusqu'à 95% des cas. Bien qu'il soit considéré comme un agent pathogène, *C. albicans* est un organisme commensal omniprésent qui colonise couramment la muqueuse buccale et est facilement isolé des cavités buccales des personnes saines (Vila et al., 2020). La population est en général porteuse asymptomatique de *C. albicans* avec une proportion de 20 à 69.1% (Patil et al., 2015).

La capacité de *Candida* à contourner son élimination via le flux salivaire et la déglutition des cellules attachées aux muqueuses de la bouche est un attribut de virulence clé d'où sa capacité à provoquer une infection (Williams et Lewis, 2011). Les espèces de *Candida* utilisent une multitude de mécanismes directs et indirects qui permettent l'interaction avec les cellules épithéliales de l'hôte. Dans des conditions convenablement prédisposantes, la colonisation commensale des muqueuses est suivie d'une infiltration pathogène et d'une

sécrétion d'enzymes hydrolytiques et de toxines, qui vont abaisser la fonction de la barrière des muqueuses, aidant ainsi à la progression de la maladie (**Richardson et al., 2018**). Quand *C. albicans* est sous forme commensale elle adhère aux cellules épithéliales buccales de façon réversible, et ceci par des récepteurs de la paroi cellulaire tels que les glycoprotéines comme les « ALS » (agglutinine like sequence), parmi les plus importants on trouve l'adhésine hyphal-spécifique Als3p, qui agit également comme un récepteur pour l'adhésion bactérienne aux hyphes de *C. albicans*, une autre adhésine majeure de la paroi hyphale est la (Hwp1). Il a été démontré que la suppression des gènes ALS3 ou HWP1 provoque une diminution de la virulence. *C. albicans* peut passer de sa morphologie à la forme filamenteuse invasive qui facilite la pénétration, dès qu'elle est attachée aux muqueuses de l'hôte (**Vila et al., 2020**).

C. albicans est de loin l'organisme fongique le plus fréquemment repéré sur les surfaces des muqueuses humaines, et il participe souvent à la formation de biofilms polymicrobiens sur les tissus mous et les surfaces acryliques, il est également fréquemment isolé à partir des caries dentaires (**De Carvalho et al., 2006 ; Yang et al., 2012**). *Candida* co-adhère *in vitro* avec de nombreuses bactéries commensales buccales, notamment avec les streptocoques du groupe viridans, et *in vivo* il améliore le portage fongique et l'infection des muqueuses. En présence de saccharose, l'interaction adhésive entre *S. mutans* et *candida* est accentuée (**Falsetta et al., 2014**).

2.3 Antibiogramme et antifongigramme

L'étude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques standards utilisés a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton et illustrée dans les **Figures 54, 55, 56, 57, 58, 59**.

L'observation des boîtes après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures nous a donné les résultats contenus dans le **Tableau 12**.

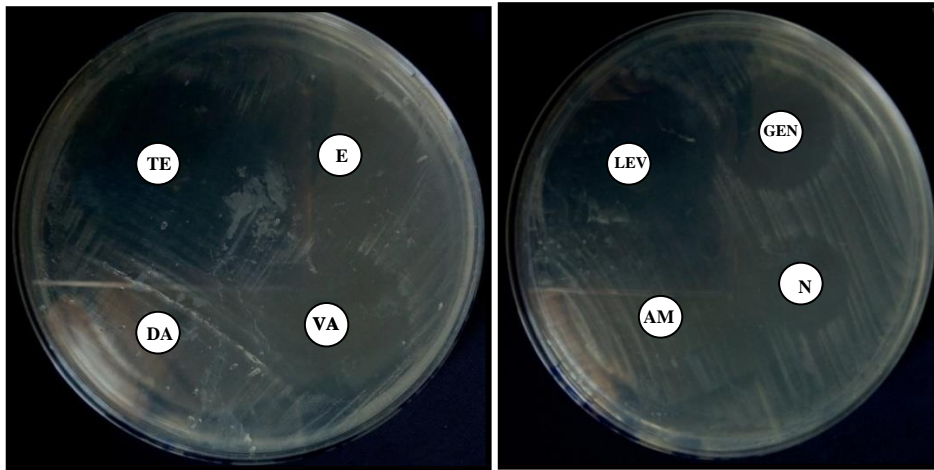


Figure 54. Résultats de l'antibiogramme de *Streptococcus mutans*.

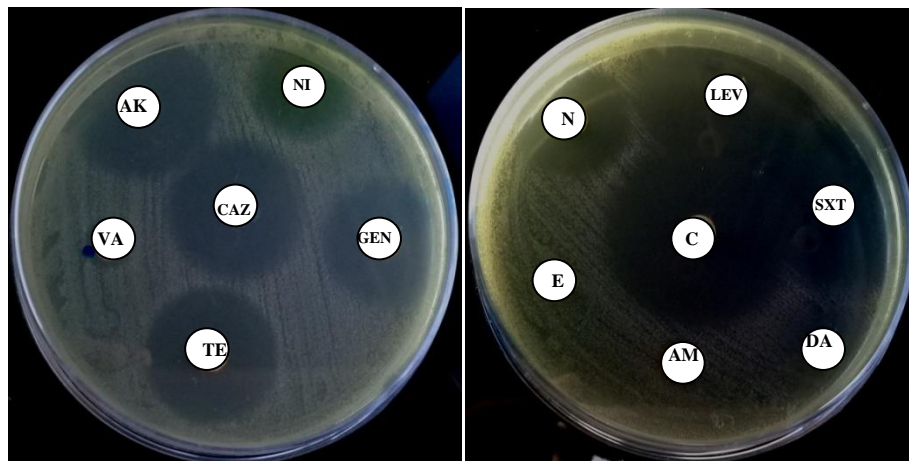


Figure 55. Résultats de l'antibiogramme de *Klebsiella oxytoca*.

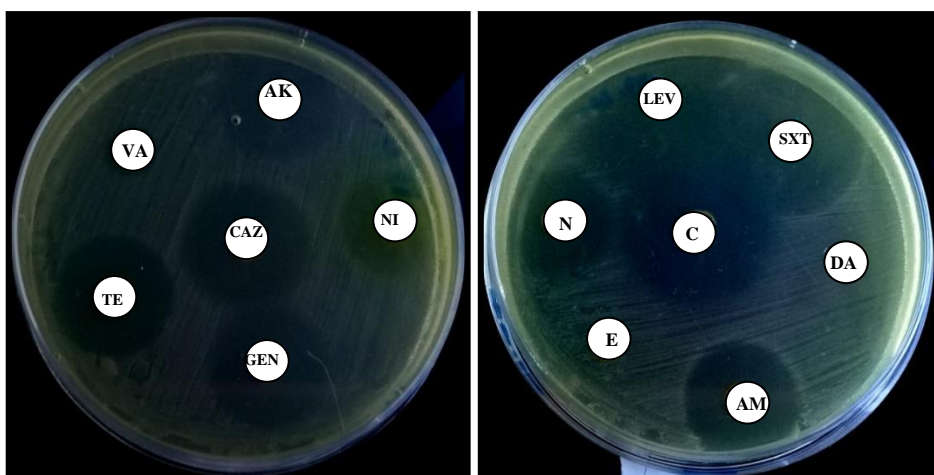


Figure 56. Résultats de l'antibiogramme d'*Enterobacter bugandensis*

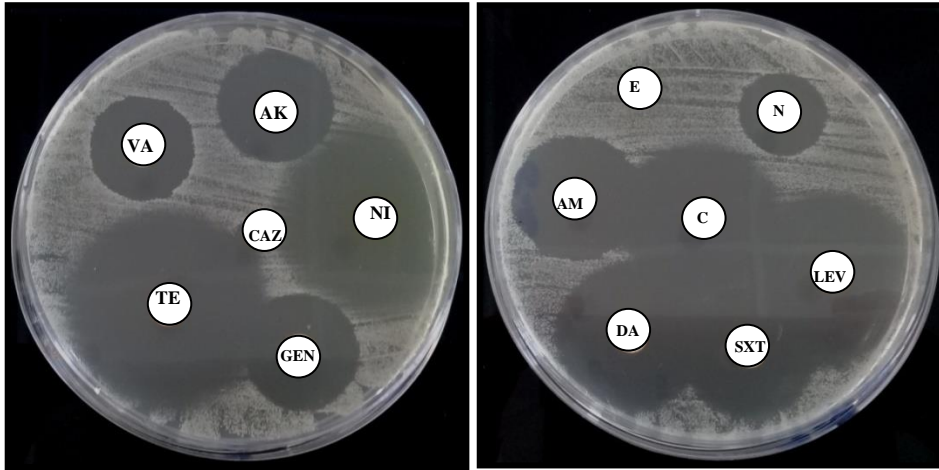


Figure 57. Résultats de l'antibiogramme de *Gemella morbillorum*

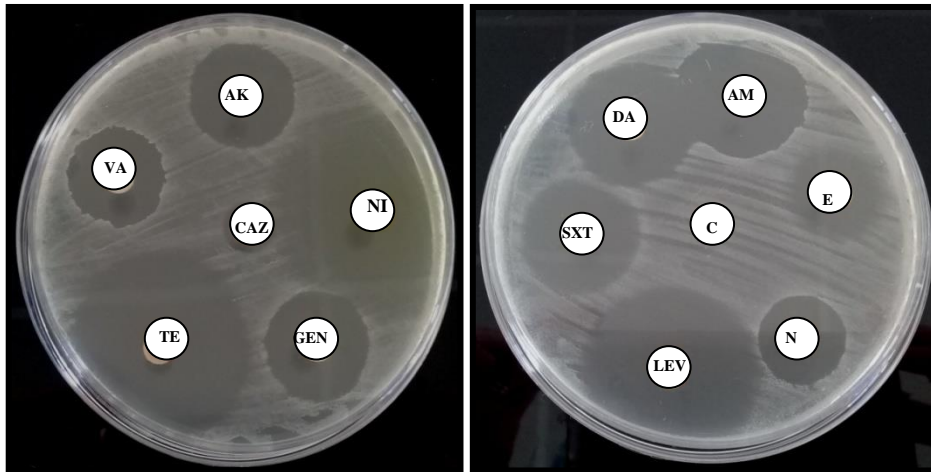


Figure 58. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*

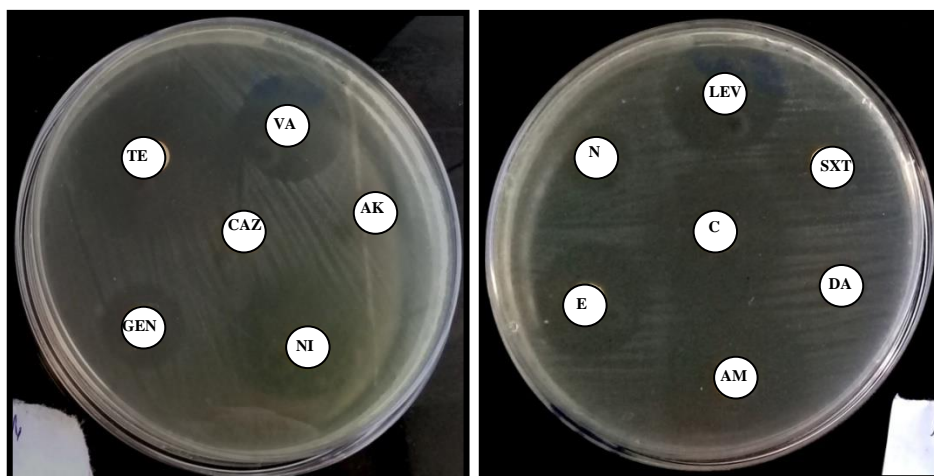


Figure 59. Résultats de l'antibiogramme d'*Enterococcus faecalis*

Tableau 12. Résultats de l'antibiogramme des isolats.

ATB Testés	<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>G. morbillorum</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>K. oxytoca</i>		<i>E. bugandensis</i>	
	DI (mm)	Résultat	DI (mm)	Résultat	DI (mm)	Résultat	DI (mm)	Résultat	DI (mm)	Résultat	DI (mm)	Résultat
Aminopenicillines A	0	R	30	S	24	S	25	S	0	RN	21	S
Ceftazidines CAZ	/	/	0	R	0	R	10	R	27	S	25	S
Glycopeptides VA	30	S	22	S	20	S	20	S	09	R	10	R
Aminosides AK GEN	/ 23	/ S	14 15	/ I	23 22	/ S	22 20	S S	29 25	S S	25 23	S S
Macrolides- Lincosamides E DA	30 34	S S	22 0	S R	0 28	R S	18 25	I S	0 13	R R	0 0	R R
Phénicolés C	/	/	27	S	30	S	0	R	36	S	29	S
Fluoroquinolones LEV	32	S	25	S	30	S	34	S	35	S	36	S
Sulfamides+ Trimethoprime SXT	/	/	0	/	25	/	22	S	35	S	31	S
Tetracyclines TE	32	S	34	S	40	S	34	S	25	S	22	S

S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant, RN : résistance naturelle. DI : diamètre d'inhibition, / : non déterminé

A: Ampicilline, CAZ: Ceftazidime, VA: Vancomycine, AK: Amikacine, GEN: Gentamicine, E: Erythromycine, DA: Clindamycine, C: Chloramphénicol, LEV: Levofloxacin, SXT: Sulfamides+Trimethoprime, TE : Tétracycline.

D'après le test de sensibilité aux antibiotiques, il est clair que les bactéries buccales utilisées dans cette étude ont des sensibilités variables vis-à-vis des divers antibiotiques utilisés.

Les résultats indiqués dans le **Tableau 12** ont montré que la souche de *S. mutans* s'est révélée la plus sensible, avec une seule résistance et ceci vis-à-vis de l'Ampicilline (A). Pour les souches *E. faecalis*, *G. morbillorum* et *S. epidermidis* deux résistances ont été observées et ceci simultanément envers la Ceftazidime (CAZ) et également envers la Clindamycine (DA), l'Erythromycine (E) et le Chloramphénicol respectivement. Les souches qui se sont montrées les plus résistantes sont les deux bactéries Gram- *K. oxytoca* et *E. bugandensis* avec chacune trois résistances envers la Vancomycine (VA), Erythromycine (E) et la Clindamycine (DA). Nous n'avons trouvé aucune bactérie résistante à l'Amikacine (AK), Gentamicine (GEN), Levofloxacin (LEV), Sulfamides+Trimethoprime (SXT) et la Tétracycline (TE).

Les antibiotiques qui ont donnés les plus grandes zones d'inhibition sont les suivants : la Clindamycine (DA) contre *S. mutans* avec une zone d'inhibition d'une valeur de 34 mm, le Chloramphénicol (C) contre *K. oxytoca* avec un diamètre de 36 mm, la Levofloxacin (LEV) contre *E. bugandensis*, *K. oxytoca* et *S. epidermidis* (36 mm, 35 mm et 34 mm respectivement), la Sulfamides+Trimethoprime (SXT) contre *K. oxytoca* (35 mm), et enfin la Tétracycline (TE) contre *G. morbillorum*, *E. faecalis* et *S. epidermidis* (40 mm, 34 mm et 34 mm, respectivement).

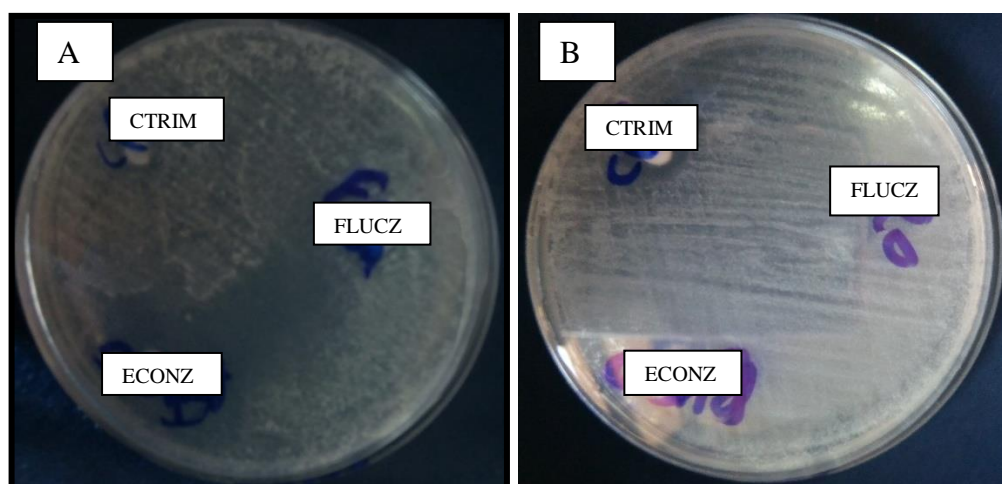


Figure 60. Résultats de l'antifongogramme de *Candida albicans* 3 (A) et *Candida albicans* 4 (B)

CTRIM: Clotrimazole, ECONZ: Econazole, FLUCZ: Fluconazole.

Tableau 13. Résultats de l'antifongigramme des souches de *Candida*.

Antifongiques utilisés	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		<i>Candida albicans</i> 3		<i>Candida albicans</i> 4	
	CTRIM 50µg/ml	20	S	0	R	0
ECONZ 50µg/ml	25	S	28	S	0	R
FLUCZ 50µg/ml	18	I	0	R	0	R

CTRIM: Clotrimazole, ECONZ: Econazole, FLUCZ: Fluconazole.

S: sensible, R: résistant, I: intermédiaire.

Concernant l'antifongigramme, la souche *Candida albicans* ATCC 10231 s'est avérée la plus sensible, où les trois antifongiques ont eu un effet sur sa croissance (**Tableau 13**). Nos trois antifongiques testés (Clotrimazole, Econazole et Fluconazole) n'ont eu aucun effet d'inhibition sur la levure *Candida albicans* 4, de ce fait cette dernière s'est montrée la plus résistante, suivie par *Candida albicans* 3 qui n'a été sensible qu'à l'antifongique Econazole avec une zone d'inhibition d'une valeur de 28 mm, donc d'après les résultats obtenus c'est l'Econazole qui s'est avéré le plus actif sur nos levures.

3. Évaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm

3.1 La formation de biofilm chez les souches bactériennes

3.1.1 La méthode du Rouge Congo

La caractérisation phénotypique du biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats sur le milieu RCA (Rouge Congo Agar). Les résultats ont révélé la présence de colonies rouges foncées pour les deux souches *E. faecalis* et *S. mutans* qui sont donc non productrice de slime. Contrairement aux 4 autres isolats (*G. morbillorum*, *S. epidermidis*, *E. bugandensis* et *K. oxytoca*) qui sont producteurs de slime, ce qui se manifeste par la formation de colonies noires sur le milieu Rouge Congo Agar (**Figure 61**).

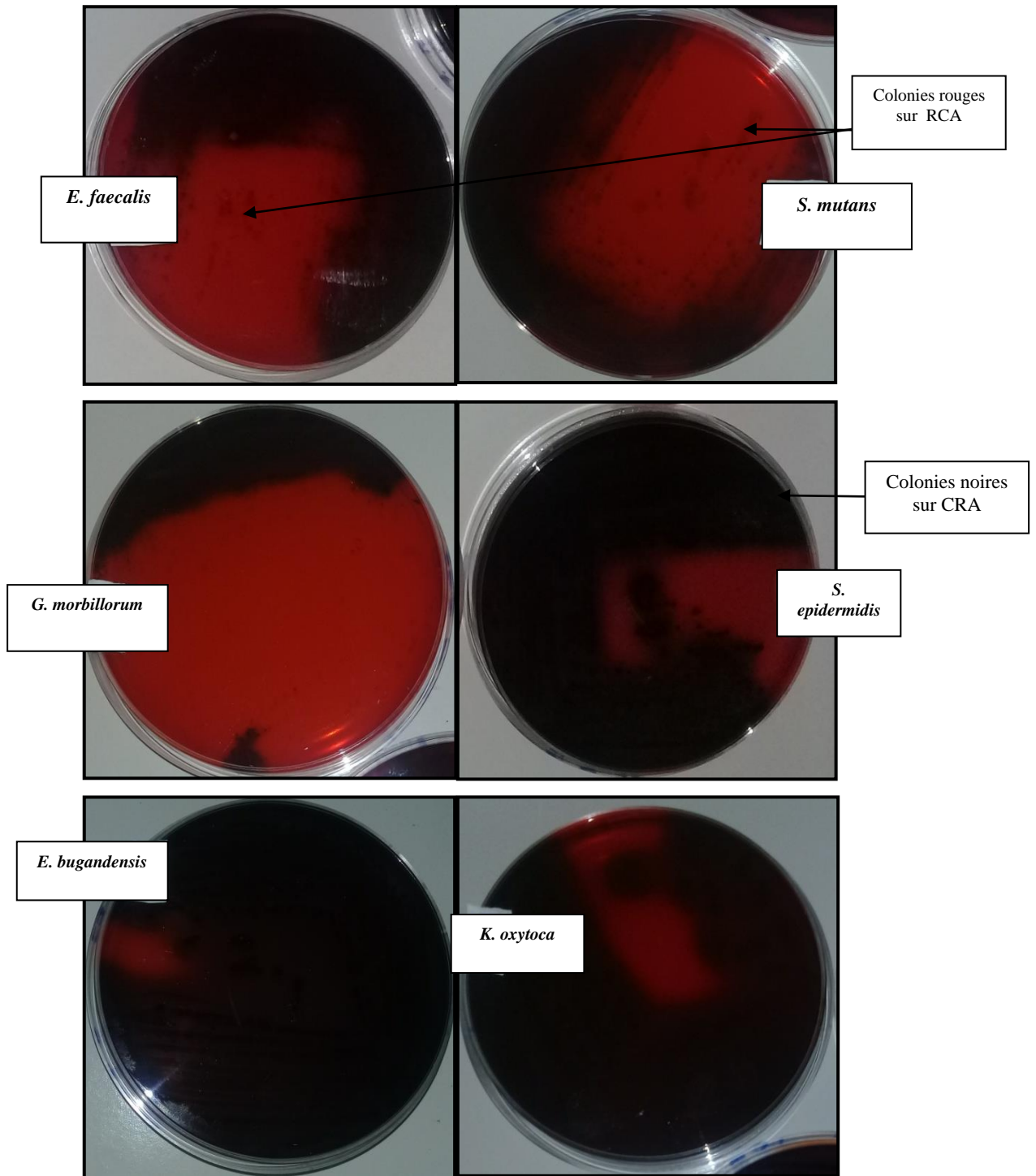


Figure 61. Production de slime chez les isolats bactériens sur milieu Rouge Congo Agar.

Des études ont démontré que cette méthode a une faible précision, mais elle est peu coûteuse et facile à réaliser et le critère d'évaluation est basé sur une analyse visuelle de la couleur des colonies qui poussent sur la gélose, de couleurs rouges pour les souches non formatrices de biofilm et noir pour les souches formatrices de biofilm (**Kaiser et al., 2013**). **Deka (2014)**, a comparé la formation de biofilm par deux techniques, dans la méthode en tube il ya eu 83% de souches formatrices de biofilm contre seulement 20% par la technique de

Rouge Congo. **Mathur et al. (2006)** n'ont également pas trouvé les mêmes résultats entre la méthode en tube et la méthode de Rouge Congo, contrairement à **Freeman et al. (1989)**.

3.1.2 Formation de biofilm par la méthode de crystal violet (en tubes)

3.1.2.1. *Évaluation de la formation de biofilm en fonction du milieu de culture*

La concentration en sucre est principalement responsable de la formation de biofilm, de ce fait le TSB normal a été testé pour la capacité de formation de biofilm de nos 6 souches bactériennes, ainsi que l'effet de l'addition de deux différents sucres à ce milieu: le glucose (1%) et le saccharose (0.25% et 5%). La quantité de biofilm formée diffère selon les souches, et selon le milieu utilisé au sein d'une même souche. Selon **Khangholi et Jamalli (2016)**, l'influence des sucres et d'autres facteurs sur la formation de biofilms peut dépendre du type de bactérie (**Mladenović et al., 2018**). Pour la souche de *S. mutans* la plus forte formation de biofilm a été observée avec le TSB+ 0.25% saccharose, pour *G. morbillorum*, *S. epidermidis* et *E. bugandensis* c'est avec le TSB+ 5% saccharose que les meilleures formations ont été observées. Concernant *E. faecalis* et *K. oxytoca*, le TSB +1% glucose a donné les meilleurs résultats (**Figure 62**). Donc on a constaté que l'ajout de sucre dans le TSB a augmenté la capacité de formation de biofilm chez toutes nos souches bactériennes, néanmoins aucune différence significative n'a été observée dans la formation de biofilm entre les différents milieux de culture ($p > 0.05$).

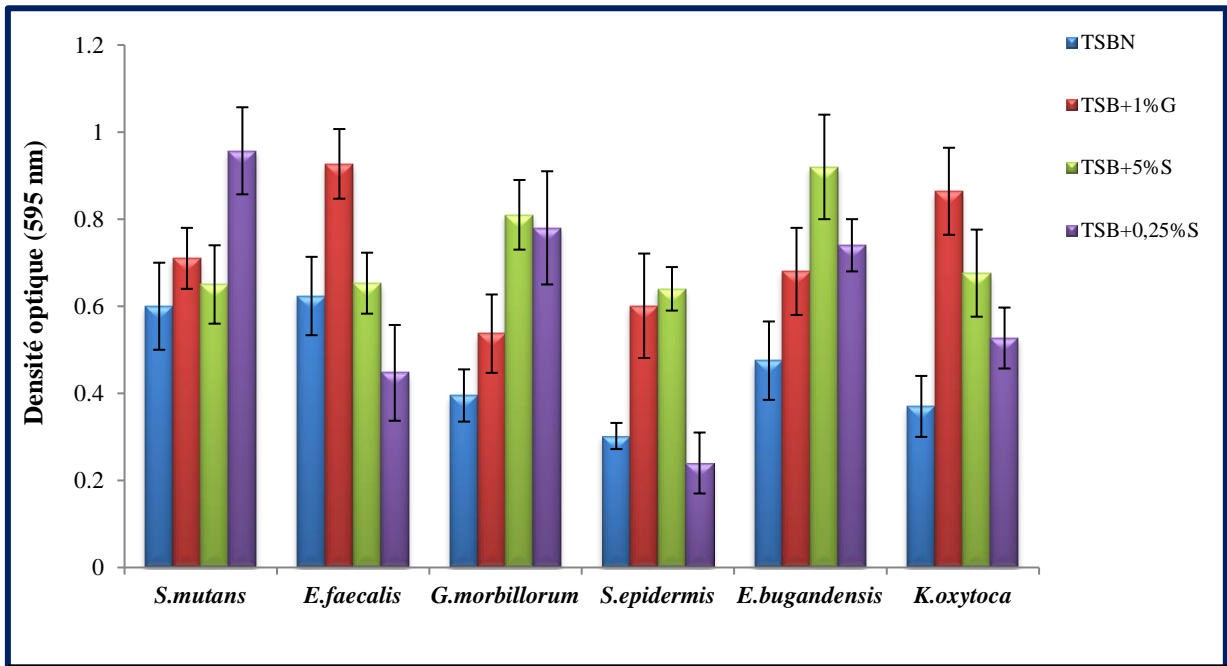


Figure 62. Evaluation de la formation de biofilm en fonction des différents milieux de culture TSBN: TSB normal, TSB+1% G: TSB+ 1% glucose, TSB+ 5% S: TSB+ 5% saccharose, TSB+0.25% S: TSB+ 0.25% saccharose. Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard pour trois répétitions.

Il est bien connu que la formation de biofilm sur les surfaces dentaires est influencée par l'exposition aux glucides alimentaires. Parmi lesquels, le saccharose, le glucide alimentaire le plus consommé, est également considéré comme le glucide le plus cariogène, car il peut provoquer des changements biochimiques et physiologiques majeurs lors de la formation du biofilm dentaire. En effet, sa fermentation va abaisser le pH, entraînant le changement d'équilibre de la microflore vers une plaque plus cariogène. Le saccharose sert aussi de substrat pour la synthèse de polysaccharides dans les biofilms dentaires, en particulier les polysaccharides extracellulaires (EPS). Ce sucre a également un rôle dans la déminéralisation et la reminéralisation, car il peut réduire les concentrations de calcium, de phosphore inorganique et de fluorure qui sont impliqués dans les phénomènes cités précédemment (Cai *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2019).

Streptococcus mutans est un agent étiologique majeur dans le développement des caries dentaires humaines et animales, il forme un biofilm pour sa survie et sa persistance dans l'écosystème naturel, la plaque dentaire (Manuel *et al.*, 2014). Cette bactérie manifeste sa virulence en formant un biofilm, ces principaux traits de virulence sont l'acidogénicité, l'aciduricité et la fixation ferme au biofilm (Nagasawa *et al.*, 2017). L'adhésion de *S. mutans* à la surface des dents et la formation de plaque dentaire sont importantes pour le développement des caries dentaires. La formation et la maturation des biofilms de *S. mutans*

sont grandement affectées par des facteurs environnementaux, tels que les nutriments, les niveaux de pH, etc. *S. mutans* en présence de sucre favorise la biosynthèse de glucanes insolubles, ce qui induit les bactéries à adhérer fermement à la surface des dents. L'apport de sucres fermentescibles induit également une diminution rapide du pH des plaques dentaires (Shumi *et al.*, 2010). Les mécanismes de formation du biofilm de *S. mutans* ont été classés comme dépendants du saccharose et indépendants du saccharose. *S. mutans* possède 3 types de glucosyltransférases (Gtf-I, Gtf-SI et Gtf-S, codées respectivement par gtfB, gtfC et gtfD) et une fructosyltransférase (Ftf, codée par sacB) (Nagasawa *et al.*, 2017). La formation de biofilm chez *S. mutans* s'est accompagnée d'une induction de 22 fois dans l'abondance d'ARNm codant pour la glucosyltransférase B (GTFB) et d'une augmentation de 14,8 fois de l'ARNm codant pour la glucosyltransférase C (GTFC). Ces enzymes synthétisent des polymères de glucanes à partir de saccharose, qui a un rôle important dans la formation de biofilms (Shumi *et al.*, 2010).

Les teneurs en nutriments du milieu de croissance, comme le glucose, la disponibilité en fer et en CO₂, l'osmolarité, le pH et la température, influencent la production de biofilm chez les bactéries. Le métabolisme des glucides régule la production de biofilm chez diverses bactéries à Gram positif, dont *E. faecalis* (Mohamed et Huang, 2007). Nos résultats sont en accord avec ceux de Baldassarri *et al.* (2001) et Pillai *et al.* (2004), où l'ajout de 1% de glucose au TSB améliore la production de biofilm chez *E. faecalis*. Il a été suggéré qu'un régulateur transcriptionnel dépendant du glucose peut contrôler directement ou indirectement le *fsr*, ce dernier qui sert de médiateur au contrôle du catabolite de la production de biofilm à travers la ou les protéases, la gélatinase et la sérine protéase (Mohamed et Huang, 2007). Nos résultats concordent aussi avec ceux de Mladenović *et al.* (2018) où le TSB contenant 0.5% et 2.5% de glucose a stimulé la formation de biofilm de *K. oxytoca*.

Ainsi, les caries dentaires peuvent être contrôlées en modifiant dans une certaine mesure les conditions physiologiques de l'environnement buccal. Cependant, ces bactéries peuvent tolérer des conditions défavorables et continuer à former un biofilm. En raison de la présence de ces exopolysaccharides, dont les cellules bactériennes sont enrobées (Sonkusale et Tale, 2015).

3.1.2.2. Évaluation de la formation de biofilm en fonction du temps et des isolats testés

La capacité de formation de biofilm des souches isolées a été criblée, qualifiée et quantifiée par la méthode de Crystal violet, le milieu utilisé au cours de ce test a été le TSB+ 5% saccharose. Afin de faire une analyse comparative entre les souches expérimentales, les capacités d'adhérences des souches testées ont été classées en trois catégories, non ou faiblement adhérentes ($DO_{595} < 0.2$), modérément adhérentes ($0.2 < DO_{595} < 0.4$), fortement adhérentes ($0.6 < DO_{595} < 1$) et très fortement adhérentes ($DO_{595} > 1$) (Russo *et al.*, 2018).

Toutes les souches ont montré un résultat positif sur leurs capacités de formation de biofilm (Figure 63 et Figure 64). *G. morbillorum* et *E. bugandensis* ont formé le biofilm le plus épais (très fortement adhérentes) avec une absorbance d'une valeur de 1.04 et 1.03 respectivement, *E. faecalis*, *S. epidermidis* et *K. oxytoca* ont été classés comme producteurs de biofilm élevés (fortement adhérentes) avec une absorbance allant de 0.76 à 0.95 et *S. mutans* comme producteur de biofilm modéré. Aucune différence significative n'a été observée dans la formation de biofilm entre les souches ($p > 0.05$).

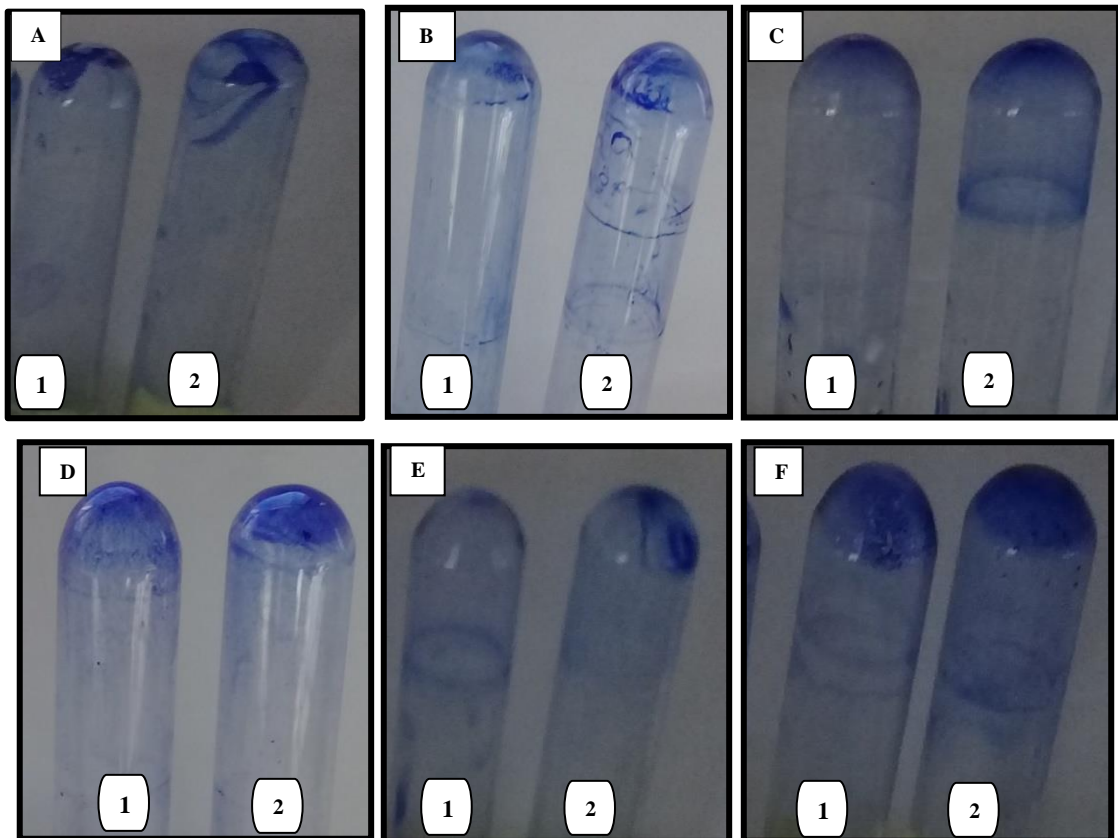


Figure 63. La formation de biofilm chez nos souches bactériennes à 24 et 48 heures.
A : *G. morbillorum*, B : *S. mutans*, C : *E. faecalis*, D : *S. epidermidis*, E : *K. oxytoca*,
F : *E. bugandensis*. 1 : 24 h, 2 : 48 h.

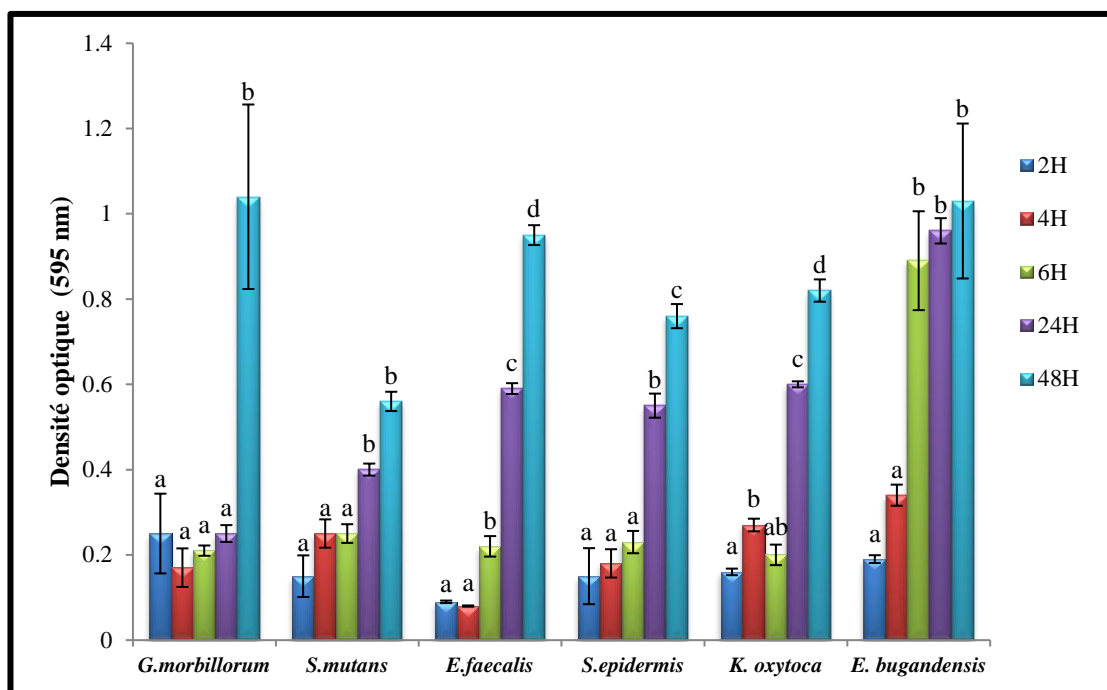


Figure 64. Évaluation de la formation de biofilm pour nos 6 souches bactériennes à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 24 et 48 h). Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard pour trois répétitions. Différentes lettres indiquent une différence significative les unes des autres ($p < 0.05$).

La cavité buccale abrite plus de 700 espèces de bactéries qui participent à la santé et à l'état physiologique de la cavité buccale. Un environnement idéal est fourni par la cavité buccale et les régions nasopharyngées associées pour la croissance des micro-organismes, et la propriété intrinsèque de la bouche offre d'immenses possibilités pour une gamme diversifiée de microbiotes (Zaura *et al.*, 2009 ; Deo et Deshmukh, 2019). Les dents, le sillon gingival, la langue, les joues, le palais dur et mou et les amygdales fournissent chacun des environnements distincts, chaque microorganisme va préférer une niche particulière selon les structures et les fonctions de surfaces variables (Zarco *et al.*, 2012).

Les bactéries buccales se développent rarement sous une forme planctonique, mais elles forment naturellement des communautés de biofilms les unes avec les autres sur une surface particulière. La formation de biofilm peut être considérée comme un processus de développement, qui se caractérise par des changements de gènes structurels et régulateurs nécessaires aux différentes étapes de sa formation (O'Toole *et al.*, 2000; Steinberg et Friedman, 2000). Les biofilms présentent un niveau très élevé d'organisation bactérienne structurelle et fonctionnelle, les bactéries communiquent entre elles par des processus moléculaires finement réglés «détection du quorum». Une cellule au sein du biofilm présente des critères de virulences beaucoup plus élevés que celle en état planctonique, car les profils

d'expression génique sont altérés, plus difficilement pénétrables par les neutrophiles, les anticorps ou les facteurs antimicrobiens (**Belibasakis et al., 2015**).

S. mutans a été impliqué comme l'un des agents responsables des caries dentaires, il présente diverses substances antigéniques de surface cellulaire. Parmi ces antigènes la protéine antigénique de 190 kDa qui a été diversement désignée comme antigène I / II, B, IF, P1, SR, PAC et MSL-1. Cet antigène protéique de surface cellulaire est impliqué dans l'adhésion cellulaire des streptocoques à la surface des dents. Il a été démontré que l'application d'anticorps monoclonaux de souris contre l'antigène à la surface des dents inhibe soit l'implantation subséquente de *S. mutans*, soit la recolonisation par des streptocoques mutans chez les singes et les humains (**Matsushita et al., 1994 ; Román et al., 2013**). *S. mutans* a manifesté une multitude de mécanismes pour coloniser la surface de la dent, et parfois devenir l'espèce la plus abondante dans les biofilms cariogéniques. En absence de saccharose cette souche va se lier à l'émail dentaire principalement par l'adhésine multifonctionnelle SpaP, également appelée P1 et PAcl. En présence de sucres, les glucosyltransférases (Gtf) polymérisent le fragment glucosyle à partir du saccharose et des glucides d'amidon en glucanes liés. La liaison aux glucanes par les protéines de liaison au glucane (Gbp A, -B, 6C et -D) et par les Gtfs facilite l'adhésion bactérienne à la surface des dents, l'adhésion inter-bactérienne et l'accumulation de biofilms, c'est la voie dépendante du saccharose (**Wen et al., 2010**). *S. mutans* produit souvent plusieurs types de bactériocines, collectivement appelées mutacines, qui lui ont permis *in vivo*, de tuer ou d'inhiber de nombreuses bactéries buccales commensales. Ainsi, il est évident que *S. mutans* a développé de nombreuses stratégies pour s'établir dans les biofilms buccaux, antagoniser la prolifération d'autres organismes commensales, créer un environnement favorable à sa survie en instaurant des conditions acides favorables à l'initiation et à la progression des caries dentaires. Les bactéries commensales ont un impact positif sur la santé de l'hôte, car elles créent un environnement de biofilm buccal qui défavorise la croissance d'espèces pathogènes (**Biswas et Biswas 2013 ; Chakraborty et Burne, 2017**).

La virulence de *S. epidermidis* est liée à la formation de biofilm, un phénotype qui dépend d'une grande variété de facteurs différents qui portent des fonctions distinctes et étroitement régulées pendant la colonisation de surfaces et les interactions avec les réponses immunitaires de l'hôte (**Büttner et al., 2015**). Cette espèce a été la première à être décrite comme productrice de biofilm. Le composant principal du biofilm est une adhésine intercellulaire polysaccharide (PIA), qui est composée d'un polymère bêta-1,6-N-acétylglucosamine synthétisé par une enzyme codifiée par l'opéron *ica* présent sur le

chromosome bactérien, qui comprend un élément régulateur de quatre gènes (A, B, C et D), et un élément transposable, IS256. (Diamond-Hernández *et al.*, 2010). L'adhésion intercellulaire polysaccharidique (PIA) et le polysaccharide capsulaire / adhésine (PS /A) sont les principaux composants de l'EPS chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Plusieurs études ont montré que le locus d'adhésion intercellulaire (*ica*), en particulier le gène *icaA*, code la production de PS/A et de PIA. L'amplification par PCR du gène *icaA* a démontré la nature inhérente de production de biofilm des isolats (Hou *et al.*, 2012).

3.2 La formation de biofilm chez les souches fongiques par la méthode de crystal violet (en tubes)

Pour évaluer la capacité de formation de biofilm chez les différentes souches de *Candida*, on a suivi la variation de la densité optique de la biomasse adhérente à la paroi des tubes à différents temps d'incubation (Figure 65).

La Figure 66 indique les valeurs de DO enregistrées pour les deux *Candida albicans* 3 et *Candida albicans* 4 ainsi que pour la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231. Les trois souches ont montré une très bonne capacité de formation de biofilm (très fortement adhérente) ou la plus grande formation de biofilm a été enregistrée avec *C. albicans* 3 avec une densité optique d'une valeur de 2, suivie par *C. albicans* 4 avec une valeur de DO de 1.81 et enfin une DO de 1.42 pour la souche de référence ATCC 10231. À partir des données nous avons constaté que la formation de biofilm augmente au cours du temps et elle devient maximale à 48 heures, où la formation de biofilm à 24 et 48 heures est significativement supérieure ($p < 0.05$) par rapport aux autres temps d'incubation (Duncan test). Néanmoins aucune différence significative dans la formation de biofilm entre les trois souches fongiques n'a été enregistrée ($p > 0.05$).

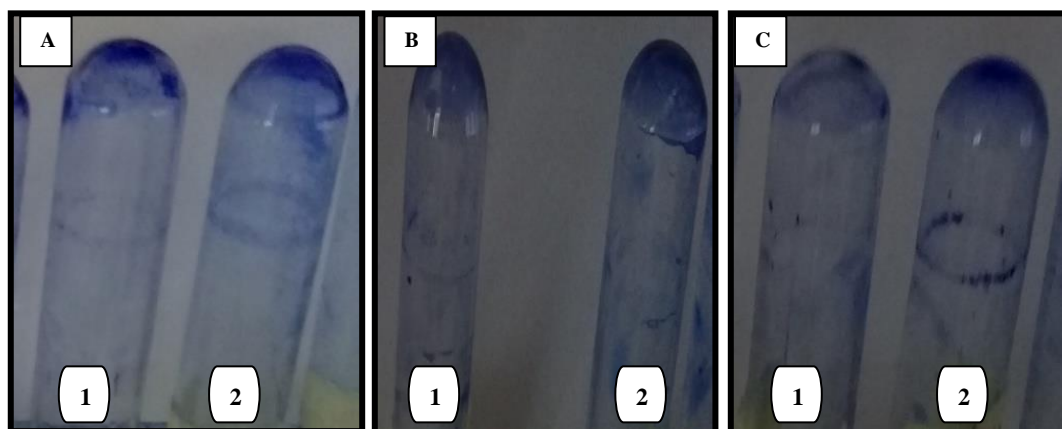


Figure 65. Formation de biofilm chez nos souches fongiques à 24 et 48 heures. A : *C. albicans* 3, B : *C. albicans* 4, C : *C. albicans* ATCC 10231. 1 : 24 heures, 2 : 48 heures.

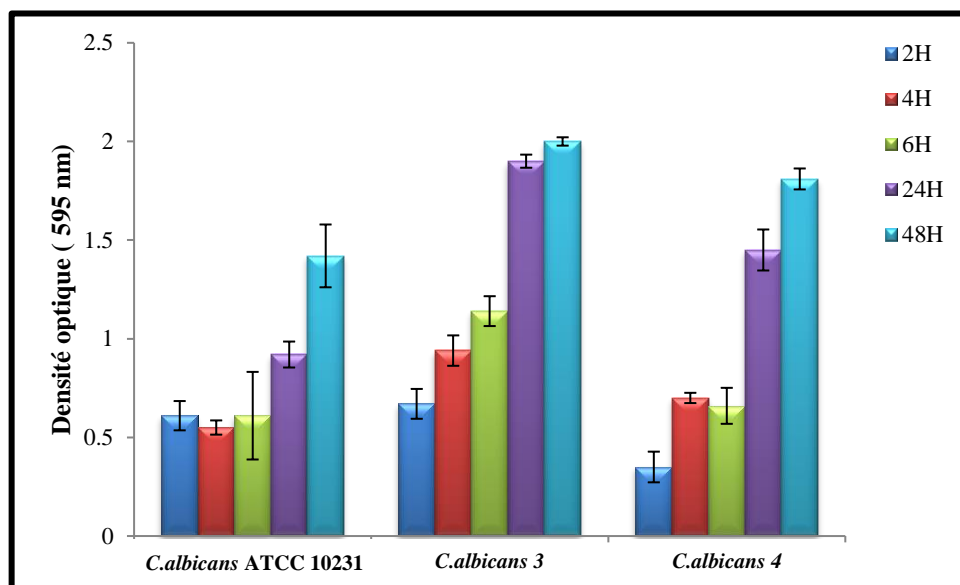


Figure 66. Evaluation de la formation de biofilm pour les trois souches fongiques à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 24 et 48 h).

Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard pour trois répétitions.

Le champignon commensal *C. albicans* est un colonisateur commun de la cavité buccale. C'est un pathogène opportuniste capable de provoquer des infections des muqueuses et systémiques, il est l'agent causal le plus répandu de la candidose buccale. *Candida albicans* est capable de se transformer entre une forme hyphale et une forme de levure, chacune avec des caractéristiques différentes (Willems *et al.*, 2016 ; Madugula *et al.*, 2017).

Les déterminants de la virulence de *Candida* spp. telles que leur capacité à former des biofilms, leur tendance acidogène, leur fermentation et leur assimilation des sucres contribuent tous à leur capacité cariogène latente (Vijayalakshmi *et al.*, 2016). Le nombre de *candida* buccales a été utilisé par certaines études comme indicateur de risque de carie, chez 97% des enfants atteints de carie, *C. albicans* peut être isolé de la lésion dentaire. La formation de biofilm chez *Candida albicans* est l'un des principaux facteurs de virulence à l'origine d'infections résistantes aux agents antimicrobiens. On pense que l'ordre des événements de développement du biofilm de *Candida* «*in vitro*» est initié par l'adhésion des cellules de levure à un substrat, la prolifération cellulaire et la formation de projections filamenteuses, telles que les hyphes et les pseudo-hyphes, entrecoupées d'accumulation de matrice extracellulaire (Willems *et al.*, 2016 ; Abu Baker *et al.*, 2017 ; Davane *et al.*, 2018).

Les biofilms formés *in vitro* sont composés de cellules fongiques intégrées dans une matrice extracellulaire riche en polysaccharide. Le β -1,3 glucane est le composant majeur de la matrice de biofilm, la formation de cette matrice extracellulaire est contrôlée par plusieurs facteurs. Le facteur de transcription Zap1 régule négativement le β -1,3 glucane, contrairement aux glucanes transférases (Bg12 et Phr1), les glucoamylases (Gca1 et Gca2) et l'exo-gluconase Xog1 (Davane *et al.*, 2018). De plus, des molécules de détection de quorum, telles que l'acide 3R-hydroxy-tétradécaénoïque (3R-HTDE), le farnésol et l'acide cis-2-dodécénoïque, ainsi que les processus métaboliques (comme, l'assimilation des glucides, le métabolisme des acides aminés et le transport intracellulaire) et l'adaptation du flux glycolytique et de l'hypoxie joueraient un rôle essentiel dans la formation du biofilm de *Candida* (Chandra et Mukherjee, 2015).

4. L'activité antimicrobienne et antibiofilm des extraits de plantes

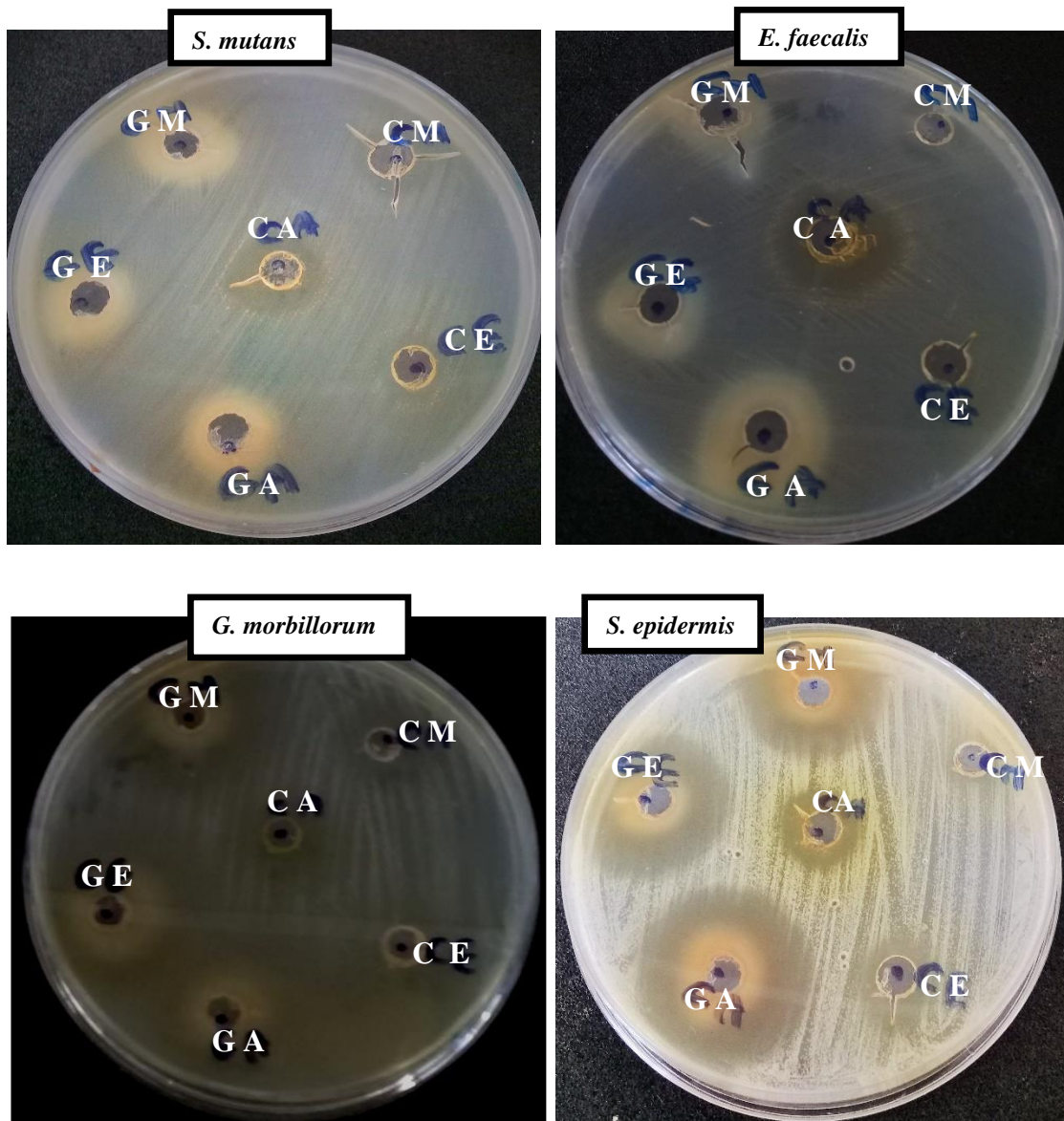
4.1 L'effet antimicrobien par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des puits)

Ces dernières années, l'intérêt porté pour les molécules biologiquement actives, isolées des espèces végétales pour éradiquer les microorganismes pathogènes a considérablement augmenté (Arabi, 2018). Également, le problème croissant de la résistance des souches aux antibiotiques nous oblige à rechercher d'autres méthodes qui traitent les agents pathogènes qui se trouvent dans la cavité buccale. Aujourd'hui, nous connaissons un certain nombre de substances ayant une activité antimicrobienne efficace inhibant le développement des biofilms, par exemple la chlorhexidine, le delmopinol ou les composés phénoliques (Krzyściak *et al.*, 2014).

L'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum* a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et de la CMI, respectivement.

On a utilisé la technique de diffusion en milieu gélosé MH et SDA pour les bactéries et les levures respectivement, la **Figure 67** illustre les zones d'inhibition apparentées autour des puits remplis par les différents extraits testés à une concentration de 200 mg/ml de DMSO à 10% (V/V). Suite aux résultats indiqués dans le **Tableau 14**, nous remarquons que les extraits de grenades ont exercé un pouvoir antimicrobien très important comparé aux extraits de cumin. Les trois extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* ont montré une activité inhibitrice importante contre toutes les bactéries et les levures testées avec des zones

d'inhibition de l'ordre de 14.00 ± 0.06 à 34.00 ± 0.23 mm. Les extraits d'écorces de grenades se sont montrés les plus efficaces contre *G. morbillorum* avec un diamètre ≥ 30 mm (extrêmement sensible), *S. epidermidis* et les trois souches fongiques se sont montrés également extrêmement sensibles aux extraits de grenades. Les plus faibles halos d'inhibition ont été enregistrés avec les deux bactéries Gram-, ainsi que *S. mutans* et *E. faecalis* ($p < 0.05$), en revanche aucune différence significative n'a été enregistrée dans l'effet antimicrobien entre les différents solvants utilisés ($p > 0.05$). Concernant les extraits de *C. cyminum* on a remarqué un effet inhibiteur contre toutes les souches fongiques avec des valeurs allant de 09.00 ± 0.21 à 23.00 ± 0.61 mm. Pour les bactéries, seules les souches Gram+ ont été sensibles à l'exception d'*E. faecalis* qui s'est montré résistante à l'égard de l'extrait méthanolique et éthanolique ($P < 0.05$), par ailleurs la croissance des bactéries Gram- n'a pas été inhibée sous l'effet de l'usage des trois extraits de cumin ($P < 0.05$). Ces derniers s'avèrent statistiquement identiques, ils ont occasionné des diamètres d'inhibition comparables ($p > 0.05$).



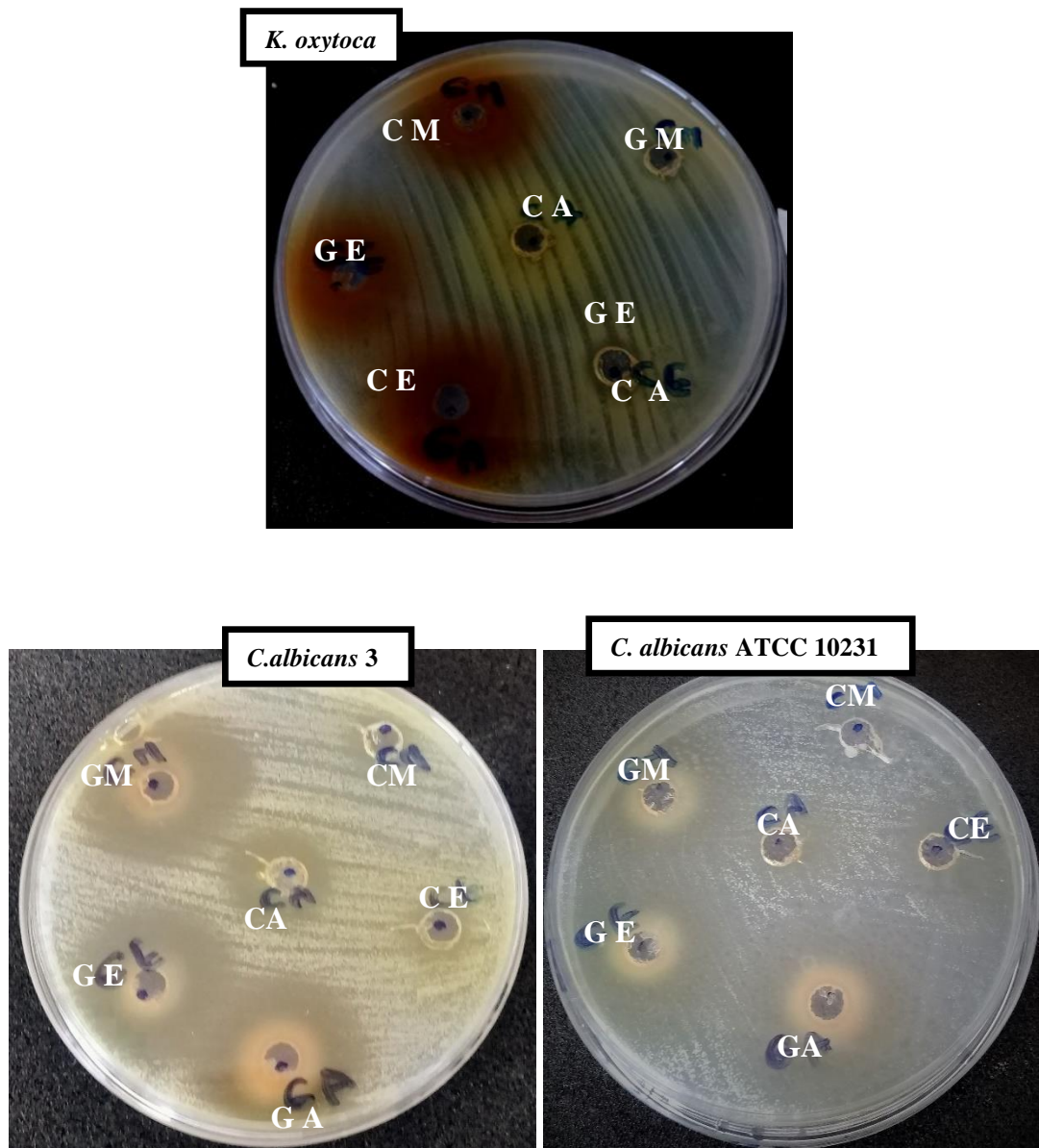


Figure 67. Activité antimicrobienne des extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* et des graines de *C. cyminum*.

GM : extrait méthanolique de grenade, GE : extrait éthanolique de grenade, GA : extrait acétonique de grenade.
 CM : extrait méthanolique de cumin, GE : extrait éthanolique de cumin, GA : extrait acétonique de cumin.

Tableau 14. Activités antimicrobiennes des extraits acétoniques, méthanoliques et éthanoliques d'écorces du fruit de *Punica granatum* et des graines de *Cuminum cyminum* exprimées par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Souches testées	Ecorces de <i>Punica granatum</i>			Graines de <i>Cuminum cyminum</i>		
	Ext acét	Ext meth	Ext éth	Ext acét	Ext meth	Ext éth
<i>E. faecalis</i>	15.30 ± 0.26 (++)	15.30 ± 0.35 (++)	15.30 ± 0.35 (++)	17.30 ± 0.49 (++)	6 (-)	6 (-)
<i>S. mutans</i>	17.00 ± 0.19 (++)	14.00 ± 0.25 (+)	14.00 ± 0.06 (+)	15.00 ± 0.10 (++)	15.00 ± 0.15 (++)	14.00 ± 0.2 (+)
<i>G. morbillorum</i>	34.00 ± 0.23 (+++)	32.00 ± 0.00 (+++)	30 ± 0.00 (+++)	13.50 ± 0.35 (+)	13.50 ± 0.25 (+)	6 (-)
<i>S. epidermidis</i>	27.00 ± 0.17 (+++)	26.30 ± 0.25 (+++)	27.70 ± 0.06 (+++)	14.30 ± 0.06 (+)	14.30 ± 1.00 (+)	12.00 ± 0.28 (+)
<i>K. oxytoca</i>	14.00 ± 0.09 (+)	14.30 ± 0.25 (+)	14.50 ± 0.21 (+)	6 (-)	6 (-)	6 (-)
<i>E. bugandensis</i>	15.00 ± 0.39 (++)	16.70 ± 0.31 (++)	19.30 ± 0.81 (++)	6 (-)	6 (-)	6 (-)
<i>C. albicans 3</i>	23.70 ± 0.12 (+++)	28.70 ± 0.99 (+++)	31.00 ± 1.31 (+++)	09.00 ± 0.21 (+)	09.00 ± 0.76 (+)	11.30 ± 0.25 (+)
<i>C. albicans 4</i>	26.70 ± 0.68 (+++)	27.70 ± 1.10 (+++)	25.00 ± 0.46 (+++)	13.30 ± 0.12 (+)	13.30 ± 0.5 (+)	23.00 ± 0.61 (+++)
<i>C. albicans ATCC 10231</i>	28.00 ± 0.26 (+++)	28.70 ± 0.26 (+++)	28.00 ± 0.26 (+++)	09.30 ± 0.00 (+)	09.30 ± 0.25 (+)	12.70 ± 0.21 (+)

Toutes les valeurs des zones d'inhibitions sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type.

Ext acét: extrait hydro-acétonique, Ext meth: extrait hydro-méthanolique, Ext éth : extrait hydro-éthanolique. ATCC: American Type Culture Collection. Les valeurs + et - représentent le degré de sensibilité des souches selon **Ponce et al. (2003)**; - : non sensible: Ø < 8 mm; sensible (+): 9 < Ø < 14 mm; très sensible (++) : 15 < Ø < 19 mm et extrêmement sensible (+++): Ø > 20mm.

L'intensité de l'activité antibactérienne varie selon les bactéries testées. Les souches à Gram+ sont plus sensibles à nos extraits que les bactéries à Gram-. Cette variation de sensibilité est attribuée aux différences de composition de la paroi cellulaire. La paroi cellulaire des bactéries à Gram+ contient une épaisse couche de peptidoglycane, tandis que celle des bactéries à Gram- contient une fine couche de peptidoglycane qui est entourée d'une épaisse membrane cytoplasmique et d'un espace périplasmique, ce qui empêche la pénétration de substances antimicrobiennes, alors que les bactéries à Gram+ sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 D (**Staszewski et al., 2011; Oliveira et al., 2013 ; Barchan et**

al., 2016). **Alvarez-Ordóñez et al. (2013)** ont rapporté que les extraits de plantes pouvaient perturber la structure moléculaire de la paroi cellulaire des bactéries et provoquer une fuite du contenu intracellulaire, entraînant une augmentation de la perméabilité des membranes.

Des études récentes ont déclaré que *Punica granatum* était un puissant extrait aux propriétés thérapeutiques telles que antioxydantes, anti-inflammatoires, anticarcinogènes, antiviraux, antifongiques, etc. Compte tenu de ces propriétés inhérentes, *Punica granatum* a été utilisé récemment dans le domaine des maladies bucco-dentaires et est utilisé pour soulager de nombreux symptômes des maladies des muqueuses buccales (**Madugula et al., 2017**). *C. albicans* provoque l'une des infections très redoutables chez les nourrissons, enfants et individus immunodéprimés, dans notre étude l'extrait de pelure de grenade a eu un effet antifongique sur toutes nos souches de *Candida*, l'activité antifongique de ces extraits est attribuée à leur composition chimique; tels que la punicalagine, cette dernière possède une forte activité contre *Candida spp.* et présente des propriétés antibactériennes, antioxydantes, anticancéreuses et anti-inflammatoires (**Pappas, 2006 ; Pfaller et Diekema, 2007 ; Kanoun et al., 2014**). **Ahmet et al., (2009)**, ont rapporté des zones d'inhibition de 26 mm avec l'extrait acétonique d'écorces de grenades envers *C. albicans* ATCC 1023, dans ce contexte **Al-Refi. (2016)** a démontré l'effet inhibiteur de l'extrait brut de la grenade contre *C. albicans* avec le même diamètre d'inhibition (26 mm), ce qui est presque égal à notre résultat (28 mm). Cependant d'après **Abdollahzadeh et al. (2011)**, l'extrait méthanolique d'écorces de grenade était efficace contre *L. acidophilus*, *S. mutans* et *S. salivarius* mais inefficaces contre *A. viscosus* et *C. albicans*, pour cette dernière ce résultat diffère du notre.

Dahham et al. (2010) ont rapporté que l'extrait éthanolique d'écorces de grenade avait la plus grande activité antimicrobienne en comparant avec les graines, fruits et jus de grenade. **Hemani et Gheena. (2018)** ont démontré une activité antimicrobienne importante exercée par les extraits de graines et de pelures de *P. granatum* contre les pathogènes oraux, cependant, l'extrait de pelure a montré une activité antimicrobienne plus large par rapport aux extraits des graines de grenade. L'effet de l'extrait méthanolique d'écorces de grenade contre *S. mutans* était de 17.7 mm qui est légèrement supérieur à notre valeur (14 mm), en revanche aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée envers *S. epidermidis* ce qui est en désaccord avec nos résultats. En revanche, d'après une étude réalisée par **Al-Sa'ady et al. (2020)**, l'extrait éthanolique et méthanolique de grenade à une concentration similaire à la notre (200 mg/ml) a engendré des halos d'inhibition d'une valeur de 35 mm et 25 mm respectivement contre *S. epidermidis*.

Endo et al. (2012) a démontré que la combinaison d'extraits de grenade avec des antibiotiques pourraient aider à lutter contre les agents pathogènes résistants aux médicaments. Les pelures de grenade conduisent à la lyse cellulaire de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par leur capacité à précipiter les protéines membranaires et à inhiber des enzymes telles que les glycosyl transférases (**Nasreddine et al., 2018**).

Le mécanisme responsable de la toxicité des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes, a été lié à une réaction avec les groupements sulfhydryles des protéines, suivie d'une indisponibilité de substrats aux microorganismes, les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les composants phénoliques peuvent augmenter la toxicité contre les microorganismes (**Kanoun et al., 2014**).

Le mode d'action principal des antibiotiques d'origine végétale est la dégradation de la paroi et de la membrane cellulaire des microorganismes, ce qui va provoquer la libération du contenu cellulaire, une perturbation du domaine de liaison aux protéines amenant à la fin à la mort cellulaire. Les médicaments dérivés de produits naturels sont appelés antibiotiques idéaux. Car, ils peuvent non seulement être efficaces en tuant le microorganisme, mais aussi en affectant les événements cellulaires dans le processus pathogène. De plus, les bactéries, les champignons et les virus n'ont pas la capacité de développer une résistance aux plantes (**Anand et al., 2019**).

En médecine traditionnelle, le cumin est utilisé pour le traitement de la douleur colique, de la bronchite et de la fatigue. Les graines de cumin ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-cancérigènes, anti-diabétiques, anti-thrombotiques et antioxydantes (**Ghazi et al., 2019**).

Il a été prouvé que le cumin possède des caractéristiques hydrophobes capables de dégrader les lipides contenus dans les parois cellulaires bactériennes et les mitochondries, endommageant la structure des cellules bactériennes. Plusieurs études ont mené l'effet antimicrobien de l'extrait des graines de *C. cuminum* sur les microorganismes responsables d'infections humaines (**Al-Snafi, 2016; Ebada, 2017; Amalia et al., 2019**).

Abbaszadegan et al. (2016) ont démontré que le cumin a montré une forte efficacité antimicrobienne contre trois groupes de bactéries constitués de micro-organismes aérobies et anaérobies et d'une souche d'*E. faecalis* isolé des dents avec une parodontite apicale persistante avec un traitement endodontique échoué. Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits de cumin (hydrométhanolique, la fraction d'acétate

d'éthyle, la fraction du n-butanol et la fraction aqueuse) réalisée par **Athamena et al. (2009)** ont révélé l'inefficacité de tous ces extraits contre l'ensemble des souches testées notamment *Enterobacter* sp, *K. pneumonia*, *Streptococcus* sp. et *C. albicans*, ce qui ne concorde pas à nos résultats seulement dans le cas de la levure et de *Streptococcus* sp. En revanche, nos observations confirment ceux avancés par **Ertürk. (2006)**, qui affirment que les extraits éthanoliques du cumin présentent une activité antimicrobienne avérée contre *C. albicans* avec une zone d'inhibition d'une valeur de 14 mm. De même pour **Naeini et al. (2014)** qui ont prouvé l'efficacité des extraits de *Cuminum cyminum* contre *Candida* (**Khorram et al., 2019**). **Leopold et al., (2005)** ont étudié l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des graines de cumin contre différentes souches de microorganismes, les tests antimicrobiens ont montré une activité élevée de l'huile essentielle de *C. cyminum* contre les souches testés notamment *Candida albicans*, les bactéries Gram positives comme *Staphylococcus epidermidis* (**Al-Snafi, 2016**). **Pai et al. (2010)** ont évalué l'efficacité antifongique *in vitro* de *Punica granatum*, *Cuminum cyminum* ainsi que d'autres plantes sur *Candida albicans* isolé de la cavité buccale, l'écorce du fruit de *P. granatum* a montré la meilleure propriété antifongique avec une zone moyenne d'inhibition de 22 mm. Les études menés par **Akroum et al., (2010)** ont démontré que l'Apigénin-7-O-glucoside extrait de *C. cyminum* était le plus actif contre toutes les bactéries Gram+.

Il est à préciser que les variations des taux d'inhibitions des extraits bruts ou des fractions enrichies dépendent de deux paramètres: l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité d'un extrait peut être le résultat de constituants actifs mais en faibles proportions, ou de constituants peu actifs mais en grandes quantités, ou à certains constituants tels que les hydrocarbures et les alcools qui démontrent un synergisme (**Athamena, 2009**).

4.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

L'activité antimicrobienne a été évaluée en déterminant la CMI ainsi que la CMB ou la CMF pour les bactéries et les levures respectivement des extraits de grenade et de cumin par la méthode de microdilution selon **Gulluce et al. (2007)** (voir annexe), et ceci seulement contre les agents pathogènes oraux ayant présentés une sensibilité envers nos extraits par le test de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits.

Tableau 15. CMI, CMB et CMF de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique d'écorces de grenades.

Espèces	Ext acét	Ext éth	Ext méth	Ext acét	Ext éth	Ext meth
	CMI (mg/ml)			CMB/CMF (mg/ml)		
<i>S. mutans</i>	0.0125 (+++)	0.025 (+++)	0.025 (+++)	6.25	6.25	100
<i>G. morbillorum</i>	12.5 (+)	12.5 (+)	25 (+)	12.5	12.5	25
<i>E. faecalis</i>	0.025 (+++)	0.025 (+++)	0.0125 (+++)	6.25	12.5	25
<i>S. epidermidis</i>	0.4 (++)	0.05 (+++)	0.05 (+++)	25	12.5	12.5
<i>K. oxytoca</i>	12.5 (+)	12.5 (+)	25 (+)	>200	>200	200
<i>E. bugandensis</i>	3.15 (+)	100 (+)	100 (+)	100	200	200
<i>C. albicans 3</i>	0.4 (++)	0.2 (++)	1.625 (+)	200	100	200
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.4 (++)	0.4 (++)	6.25 (+)	200	100	100

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; Ext acét: extrait acétonique; Ext éth: extrait éthanolique; Ext méth: extrait méthanolique. Activité antimicrobienne : bonne (+++) : CMI <0,1 mg/ml, modérée (++) : 0,1 ≤ CMI ≤ 0,625 mg/ml et faible (+) : CMI > 0,625 mg/ml (**Kuete, 2010**).

Les trois extraits de grenades, ont montré une activité antibactérienne et antifongique contre toutes les souches. Comme le montre le **Tableau 15**, l'intensité de l'activité antimicrobienne des extraits varie selon les souches, l'analyse statistique révèle que les extraits de pelures de grenades présentent un potentiel antimicrobien significativement différent entre les souches testées ($p = 0.026$), plus la valeur de CMI est faible, plus l'activité est meilleure (**Famuyide et al., 2019**). L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est

classée comme bonne (CMI <0.1 mg/ml), modérée ($0.1 \leq \text{CMI} \leq 0.625$ mg/ml) et faible (CMI > 0.625 mg/ml) (**Kuete, 2010**).

Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux extraits (faible activité des extraits), les valeurs de CMI les plus élevées ont été observées avec *E. bugandensis* (de 3.15 mg/ml à 100 mg/ml) ($p < 0.05$), où l'action de ces extraits a été significativement la plus faible (Duncan test), suivi de *K. oxytoca* où la prolifération de ce germe a été inhibée avec les extraits préparés à une concentration de 12.5 mg/ml pour les extraits acétonique et éthanolique et 25 mg/ml pour l'extrait méthanolique. Les solutions à base de nos extraits de grenades ont présenté une activité antimicrobienne la plus remarquable contre les germes cariogènes *S. mutans* et *E. faecalis*, elles s'avèrent incapables de se développer au contact d'extraits préparés à des concentrations de 0.0125 à 0.025 mg/ml selon les solvants, ce qui démontre la bonne activité de nos extraits envers ces deux souches (**Kuete, 2010**).

En comparant les effets des extraits éthanolique, méthanolique et acétonique de grenades sur chaque souche, il n'y a pas de différence significative de l'activité antimicrobienne ($p < 0.05$). L'intervalle d'action de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique sur nos souches microbiennes était de 0.0125 mg/ml à 12.5 mg/ml, de 0.025 mg/ml à 100 mg/ml et de 0.0125 mg/ml à 100 mg/ml respectivement.

D'autre part, la CMB représente le nombre de microorganismes développés après 24 heures d'incubation à 37°C à partir des différentes solutions d'extraits ayant servies au préalable à la détermination des CMI de chaque microorganisme, et où il y a eu absence de trouble. Les résultats (**Tableau 15**) montrent que les plus faibles valeurs de CMB ont été enregistrées à l'égard des bactéries Gram + avec des valeurs ≤ 25 mg/ml (à l'exception de l'extrait méthanolique contre *S. mutans* où la CMB = 100 mg/ml), en revanche les valeurs de CMB enregistrées envers les bactéries Gram- ainsi que les levures sont supérieures que les précédentes avec des CMB ≥ 100 mg/ml ($p < 0.05$), ce qui confirme les résultats de la CMI. Les extraits de grenade éthanolique et acétonique ont des valeurs de CMB proches et qui se situent dans l'intervalle de 6.25 mg/ml à >200 mg/ml, par ailleurs, les CMB de l'extrait de grenade méthanolique étaient comprises entre 25 mg/ml et 200 mg/ml, en revanche aucune différence significative entre les valeurs de CMB des trois extraits pour chaque souche n'a été observée ($p > 0.05$).

Tableau 16. CMI, CMB et CMF de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique des graines de *Cuminum cyminum*.

Espèces	Ext acét	Ext éth	Ext méth	Ext acét	Ext éth	Ext méth
	CMI (mg/ml)			CMB (mg/ml)		
<i>S. mutans</i>	100 (+)	100 (+)	12.5 (+)	100	100	200
<i>G.morbilloorum</i>	100 (+)	ND	50 (+)	100	ND	>200
<i>E. faecalis</i>	100 (+)	100 (+)	100 (+)	100	100	>200
<i>S. epidermidis</i>	100 (+)	100 (+)	100 (+)	100	100	>200
<i>K. oxytoca</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. bugandensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans 3</i>	25 (+)	50 (+)	ND (+)	200	200	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	100 (+)	200 (+)	100 (+)	200	200	>200

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; ND : Non déterminée ; Ext acét: extrait acétonique; Ext éth: extrait éthanolique; Ext méth: extrait méthanolique. Activité antimicrobienne : bonne (+++) : CMI <0,1 mg/ml, modérée (++) : 0,1 ≤ CMI ≤ 0,625 mg/ml et faible (+) : CMI > 0,625 mg/ml (Kuetze, 2010).

Selon les résultats du **Tableau 16**, nous remarquons que les extraits de *C. cyminum* ont exercé une faible activité contre nos souches (CMI > 0.625 mg/ml) (Kuetze, 2010). La concentration à laquelle les extraits de cumin ont inhibé les germes varie entre 12.5 et 200 mg/ml, la susceptibilité la plus importante envers nos extraits de cumin a été observée chez *C. albicans 3* ($p < 0.05$) avec des valeurs de CMI de 25 et 50 mg/ml pour l'extrait acétonique et éthanolique respectivement et *S. mutans* avec une CMI de 12.5 pour l'extrait méthanolique et 100 mg/ml pour les deux extraits acétonique et éthanolique. Par contre, la sensibilité l'est beaucoup moins chez *C. albicans* ATCC 10231 où la CMI varie entre 100 et 200 mg/ml selon le solvant. Aucun effet significatif dans le changement de solvant pour notre extrait n'a été observé dans la CMI ($p > 0.05$).

À travers le **Tableau 16**, il apparaît que la concentration minimale bactéricide et fongicide des extraits de cumin varient entre 100 et >200 mg/ml. L'extrait méthanolique a donné les plus grandes valeurs de CMB et CMF (≥ 200 mg/ml). Aucune différence entre les solvants n'a été observée pour la CMB ou CMF ($p > 0.05$).

Tableau 17. Action inhibitrice des solutions d'extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* et des graines de *C. cuminum* chez les souches responsables d'infections bucco-dentaires.

Souches	<i>P. granatum</i>	CMB/CMI CMF/CMI	Type d'inhibition	<i>C. Cuminum</i>	CMB/CMI CMF/CMI	Type d'inhibition
<i>E. faecalis</i>	Ext acét	500	Bactériostatique	Ext acét	1	Bactéricide
	Ext éth	500	Bactériostatique	Ext éth	1	Bactéricide
	Ext méth	2000	Bactériostatique	Ext méth	>2	Bactéricide
<i>S. mutans</i>	Ext acét	500	Bactériostatique	Ext acét	1	Bactéricide
	Ext éth	250	Bactériostatique	Ext éth	1	Bactéricide
	Ext méth	4000	Bactériostatique	Ext méth	16	Bactériostatique
<i>S. epidermidis</i>	Ext acét	62.5	Bactériostatique	Ext acét	1	Bactéricide
	Ext éth	250	Bactériostatique	Ext éth	1	Bactéricide
	Ext méth	250	Bactériostatique	Ext méth	>2	Bactéricide
<i>E. bugandensis</i>	Ext acét	64	Bactériostatique	Ext acét	ND	ND
	Ext éth	2	Bactéricide	Ext éth	ND	ND
	Ext méth	2	Bactéricide	Ext méth	ND	ND
<i>G. morbillorum</i>	Ext acét	1	Bactéricide	Ext acét	1	Bactéricide
	Ext éth	1	Bactéricide	Ext éth	>2	Bactéricide
	Ext méth	1	Bactéricide	Ext méth	4	Bactéricide
<i>K. oxytoca</i>	Ext acét	16	Bactériostatique	Ext acét	ND	ND
	Ext éth	16	Bactériostatique	Ext éth	ND	ND
	Ext méth	8	Bactériostatique	Ext méth	ND	ND
<i>C. albicans 3</i>	Ext acét	500	Fongistatique	Ext acét	8	Fongistatique
	Ext éth	500	Fongistatique	Ext éth	4	Fongicide
	Ext méth	123	Fongistatique	Ext méth	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Ext acét	500	Fongistatique	Ext acét	2	Fongicide
	Ext éth	40	Fongistatique	Ext éth	1	Fongicide
	Ext méth	16	Fongistatique	Ext méth	2	Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; ND : Non déterminée ; Ext acét: extrait acétonique; Ext éth: extrait éthanolique; Ext méth: extrait méthanolique.

Selon **Marmonier (1990)**, quand le rapport d'activité CMB/CMI ou CMF/CMI d'une substance antimicrobienne est ≤ 4 , cette dernière est qualifiée de substance bactéricide ou fongicide et si le rapport >4 , elle est alors dite bactériostatique ou fongistatique.

Les résultats du **Tableau 17** montrent que les extraits d'écorces de grenades exercent des effets inhibiteurs de type bactériostatique et fongistatique contre nos souches bactériennes et fongiques respectivement à l'exception d'*E. bugandensis* où un effet bactéricide a été observé avec les extraits éthanoliques et méthanoliques, de même pour *G. morbillorum* ou les trois extraits d'écorces de grenades ont eu un effet bactéricide. Nos résultats corroborent ceux d'autres travaux, en effet, *P. granatum* présente une action antibactérienne par effet bactériostatique et bactéricide (**Braga et al., 2005**). D'autre part, pour les extraits de *C. cyminum*, une activité bactéricide et fongicide a été mise en évidence envers nos souches testées, néanmoins, une exception est à noter pour *S. mutans* ou une activité bactériostatique a été observée avec l'extrait méthanolique, de même pour l'extrait acétonique qui a eu un effet fongistatique contre *C. albicans* 3 (**Tableau 17**).

Nos résultats concordent avec plusieurs auteurs qui ont observé de faibles valeurs de CMI pour les extraits de plantes envers les bactéries à Gram positif et des valeurs élevées à l'égard des bactéries à Gram négatif, cela est dû aux différences structurales entre les parois cellulaires (**Burt, 2004; Al-Zoreky, 2009; Hayrapetyan et al., 2012; Tayel et al., 2012**). Ceci pourrait expliquer la faible sensibilité observée chez *E. bugandensis* et *K. oxytoca* envers les extraits de pelures de grenades et leur insensibilité envers les extraits de cumin.

La présente recherche est en ligne avec d'autres études démontrant l'effet antibactérien des extraits de pelures du fruit de *punica granatum* L. contre *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* (**Machado et al., 2002; Voravuthikunchai et al., 2005; Pagliarulo et al., 2016; Rosas-Burgos et al., 2017**). Dans le travail réalisé par **Malviya et al. (2014)**, l'activité antibactérienne de l'extrait de grenade éthanolique de la variété Ganesh a été démontrée sur *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi* et *Klebsiella pneumonia*. Dans l'étude de **Jaisinghani et al., (2018)**, l'effet inhibiteur des extraits éthanoliques de grenade contre les souches bactériennes à Gram négatif et positif a également été rapporté. Selon **Nasreddine et al. (2018)** l'extrait d'écorces de grenade éthanolique et méthanolique obtenus par macération ont eu des valeurs de CMI à l'égard de *S. epidermidis* CIP444 d'une valeur de 25 mg/ml, qui est supérieur à notre résultat (0.05 mg/ml) et ceci avec tout deux un effet bactéricide contrairement à notre cas où un effet bactériostatique a été enregistré.

L'activité antimicrobienne de *P. granatum* pourrait être attribuée à la teneur élevée en composés phénoliques et en particulier les ellagitanins comme les punicalagines, qui sont les principaux composants des polyphénols de la pelure de grenade, ces derniers ont été impliqués dans des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses et antimicrobiennes (**Adams et al., 2006; Miguel et al., 2010 ; Glazer et al., 2012**). **Bialonska et al. (2009)** a signalé l'effet des tanins de grenade sur la croissance de diverses espèces de bactéries intestinales humaines *in vitro*. Les tanins augmentent la bactériolyse, interfèrent avec les mécanismes d'adhésion bactérienne sur les surfaces dentaires (**Pereira et al., 2006**). **Scalbert. (1991)** a proposé différents mécanismes pour expliquer l'activité antimicrobienne des tanins, qui comportent l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires; la privation de substrats et d'ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne ainsi qu'une action directe sur le métabolisme microbien par inhibition de la phosphorylation oxydative (**Anibal et al., 2013**).

Anibal et al. (2013) ont montré la capacité antimicrobienne du péricarpe de la grenade contre les cellules de levure du genre *Candida*. L'action antifongique détectée par spectrométrie de masse pourrait être attribuée aux tanins, qui sont responsables de changements dans la morphologie cellulaire de la levure.

Les études pharmacologiques précédentes ont révélé que *Cuminum cyminum* exerçait une action antimicrobienne, insecticide, anti-inflammatoire, analgésique, antioxydante, anticancéreuse, antidiabétique, hypotensive, bronchodilatatrice, immunologique, contraceptive, anti-amyloïdogénique, anti-ostéoporotique, aldose réductase, alpha-glucosidase et inhibiteurs de la tyrosinase (**Al-Snafi, 2016**). L'effet antimicrobien de l'extrait de cumin a été rapporté par **Soleymani et al., (2010)**, sur les bactéries Gram+ et Gram- (*E. coli*, *S. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. flexneri*, *B. cereus*, *E. faecalis* et *S. typhimurium*), ils ont également démontré que le cumin pourrait augmenter l'effet antibactérien de la gentamicine. Le cumin pourrait être une bonne alternative pour le traitement des agents pathogènes multirésistants. Les résultats partagés par **Ghazi et al., (2019)** ont démontré un effet inhibiteur du cumin contre *S. mutans* et *S. pyogene* avec un effet bactéricide ce qui concorde avec nos résultats, en revanche les valeurs des CMI et CMB qu'ils ont trouvé étaient inférieures aux nôtres (**Pillay et al., 2019**).

4.3 Effet des extraits végétaux sur la formation de biofilms microbiens

4.3.1 Effet de l'extrait éthanolique d'écorces de grenade

Les biofilms oraux contiennent distinctement plus de 500 taxons bactériens différents. La matrice épaisse d'exopolymère du biofilm empêche la pénétration des antimicrobiens et permet aux cellules microbiennes d'être résistantes aux médicaments. En plus de cela, la diminution du taux de croissance et l'expression d'éventuels gènes résistants rendent les antimicrobiens inefficaces pour les cellules microbiennes du biofilm, alors qu'ils sont efficaces contre les cellules bactériennes planctoniques libres (Geethashri *et al.*, 2014 ; Souza *et al.*, 2018). Pour cela il est important de trouver d'autres alternatives notamment dans les extraits de plantes pour l'éradication de ces phénotypes microbiens résistants, de ce fait nous avons choisi de tester tout d'abord l'extrait éthanolique d'écorces de grenade et ceci pour sa grande teneur en polyphénols. L'effet de cet extrait a été testé sur deux souches Gram+ (*E. faecalis*, *S. epidermidis*), deux souches Gram- (*E. bugandensis*, *K. oxytoca*) et deux levures (*C. albicans* 3 et *C. albicans* ATCC 10231). Les pourcentages d'inhibition $\leq 50\%$ montrent une faible activité, et des valeurs $> 50\%$ montrent une activité antibiofilm élevée contre les souches (Famuyide *et al.*, 2019).

La sensibilité des biofilms à l'extrait éthanolique d'écorces de grenade a montré que ce dernier a inhibé la formation de biofilm de toutes les souches bactériennes et fongiques et l'effet obtenu était dose-dépendant (Figure 68). À la plus grande concentration (CMI), l'extrait a montré une activité antibiofilm élevée $> 50\%$ contre toutes les souches microbiennes testées (Famuyide *et al.*, 2019). Des différences significatives ($p < 0.05$) ont été observées entre les différentes concentrations de l'extrait dans les valeurs d'inhibition du biofilm, les doses de CMI, 50% CMI et 25% CMI ont eu une plus grande influence sur la formation des biofilms que des doses de 12.25% CMI et 6.25% CMI (Duncan test) ($p < 0.05$). En effet, la concentration des extraits a une forte influence sur le pouvoir de pénétration de la membrane cellulaire qui est lié au nombre et à la taille des molécules. La réduction de biofilm diffère d'une souche à une autre, l'inhibition maximale du biofilm a été observée à la concentration la plus élevée de l'extrait (CMI) avec *E. faecalis* (91.95%) et *S. epidermidis* (90.7%) et la plus faible réduction a été observée avec *E. bugandensis* (62.66%) ainsi que *C. albicans* 3 (62.82%).

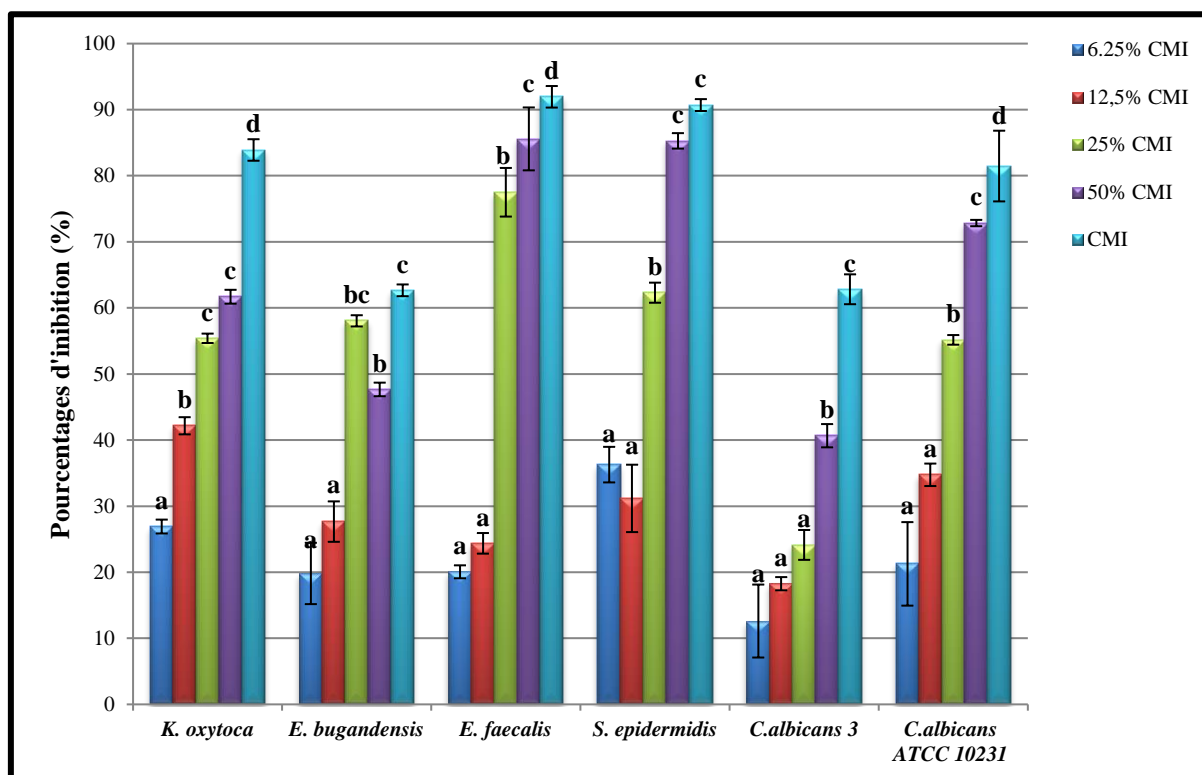


Figure 68. L'effet de l'EEG éthanolique sur la formation des biofilms microbiens. Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard pour trois répétitions. Différentes lettres indiquent une différence significative les unes des autres ($p < 0.05$).

Les biofilms microbiens sont très préoccupants dans la gestion des infections bactériennes et même fongiques. La formation de biofilm est caractérisée en partie par la production extensive d'exopolysaccharide (EPS) qui facilite la fixation initiale des bactéries; provoque une résistance accrue aux agents antimicrobiens et au stress environnemental. Il a été rapporté que les signaux chimiques de détection de quorum (AI) régulent également la production d'EPS et de ce fait améliore la formation de biofilm. Par conséquent, l'une des approches pour inhiber la formation de biofilm est de cibler le système de régulation du quorum sensing (QS) qui finit par provoquer l'inhibition du biofilm. Donc la recherche de nouveaux composés inhibiteurs de la détection de quorum (quorum quenching) peuvent contribuer à la gestion des biofilms et donc à la maîtrise des infections microbiennes (Venkadesaperumal *et al.*, 2016 ; Omwenga *et al.*, 2017). Les plantes sont une riche ressource en de nombreux composés, en particulier leurs métabolites secondaires, qui ont un potentiel antibactérien, antifongique et antibiofilm. Ces composés ont la capacité d'interférer avec le système QS en inactivant leurs récepteurs dans les voies de signalisation QS (Alam *et al.*, 2020). Divers mécanismes ont été suggérés pour les inhibitions du QS, tels que la perturbation de la compétition des AHL se liant aux récepteurs par dégradation des AHL, empêchant les AHL de former un complexe AHL-récepteur et modifiant les structures des

enzymes impliquées dans les synthèses AHL (**Singh et al., 2016**). Pour qu'un composé phytochimique puisse être qualifié d'inhibiteur efficace du QS, il ne doit avoir aucun effet sur la croissance des bactéries mais doit spécifiquement inhiber les voies liées au QS (par exemple, la synthèse d'auto-inducteurs, des protéines de cible spécifiques, etc.). En principe, cette stratégie doit conduire au démantèlement de la capacité pathogène/virulente des bactéries, les rendant ainsi susceptibles d'être éliminées ultérieurement par le système immunitaire de l'hôte (**Omwenga et al., 2017**).

De nombreux auteurs ont confirmé nos résultats sur la capacité antibiofilm des écorces de grenade. D'après **Bakkiyaraj et al. (2013)**, l'extrait méthanolique de grenade a une activité antibiofilm contre des pathogènes bactériens et fongiques. En effet cet extrait a inhibé la formation de biofilms par *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. En plus il a perturbé des biofilms préformés et a inhibé la formation du tube germinatif qui est considéré comme un trait de virulence chez *C. albicans*. Selon **Dastjerdi et al. (2014)** l'extrait aqueux de grenade a diminué la formation de biofilm bactérien par *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. mutans* ATCC 35608 et *E. faecalis* CIP 55142 de 93.7 à 100%, 40.6 à 99.9%, 85.2 à 86.5%, 66.4 à 84.4% et 35.5 à 56.3% respectivement.

S. epidermidis est l'espèce la plus fréquemment isolée dans la plupart des études, c'est la bactérie la plus répandue dans la peau et les muqueuses humaines. De plus, *S. epidermidis* CIP 444 pose des problèmes majeurs concernant les dispositifs médicaux, il a également la capacité de développer des infections persistantes et présente un taux d'infection de 100% dans des expériences *in vivo* et cela est dû à sa capacité à former un biofilm (**Chmit et al., 2014**). D'après une expérience réalisée par **Nasreddine et al. (2018)**, les extraits éthanolique et méthanolique de pelures de grenade ont pu empêcher la formation de biofilm de *S. epidermidis* CIP444. Leurs capacités de prévention de la formation de biofilm étaient proportionnelles à leurs concentrations et qui étaient maximale (100%) à une concentration de 12.5 mg/ml (50% CMI), de plus ils ont démontré le potentiel d'éradication du biofilm préformé de ces extraits contre *S. epidermidis* CIP444, mais qui restaient inférieurs à leurs efficacité de sa prévention.

Dans la cavité buccale, plus précisément dans l'environnement du canal radiculaire, les bactéries *E. faecalis* jouent un rôle essentiel dans la formation du biofilm. Par conséquent, le biofilm d'*E. faecalis* est considéré comme un modèle approprié pour tester de nouveaux

traitements antimicrobiens (Soraya *et al.* 2020). Dans notre étude, l'extrait de grenade a été très efficace dans l'inhibition de la formation de biofilm de cette souche.

Les structures tridimensionnelles complexes des biofilms forment un environnement favorable pour les micro-niches d'espèces de *Candida* (Silva-Dias *et al.*, 2015). La formation de biofilm de *Candida* contribue à plusieurs infections qui peuvent être mortelle. L'élaboration de biofilm par ces souches se fait le plus souvent dans la cavité buccale, les poumons, les brûlures, le tractus gastro-intestinal, la peau, l'intravasculaire et le site d'insertion des sondes urinaires (Iñigo et Del Pozo, 2018). Nos résultats ont eu un bon effet sur la formation de biofilm des souches de *C. albicans* d'où la possibilité d'utiliser l'extrait d'écorces de grenade pour l'éradication des biofilms de ces espèces fongiques.

D'après une expérience réalisée par Joshi *et al.* (2019), l'extrait hydro-alcoolique d'écorces de grenade a pu moduler chez des bactéries pathogènes Gram négatives, la production *in vitro* de pigments régulés par quorum sensing, également cet extrait a eu un effet sur les traits de virulences de *P. aeruginosa*, notamment sur l'activité hémolytique et la formation de biofilm. L'extrait de grenade a inhibé la détection du quorum en réprimant l'activité des différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Al-Refi, 2016).

Les travaux réalisés par Oh *et al.* (2015) suggèrent que l'extrait d'écorces de grenade pourrait être un agent thérapeutique potentiel pour prévenir les entéropathogènes chez l'homme, en effet ils ont démontré que cet extrait inhibait et réduisait spécifiquement de 78.5% la production de violacéine contrôlée par QS chez *Chromobacterium violaceum* CV026, et diminuait la formation de biofilm associée au QS et la motilité chez *Yersinia enterocolitica* sans affecter significativement la croissance bactérienne.

Vasconcelos *et al.* (2006) ont démontré un effet de réduction significative de l'adhérence des streptocoques de la plaque dentaire par l'extrait d'écorces de grenade et la grande efficacité du gel de grenade dans l'inhibition de l'adhérence bactérienne. Ces résultats sont étayés par plusieurs études *in vitro* (Kakiuchi *et al.*, 1986, Menezes *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2006) qui ont démontré que l'action antimicrobienne du fruit de *Punica granatum* Linn sur l'inhibition de l'adhérence des bactéries du biofilm dentaire est le résultat de perturbation de la synthèse des glucanes, empêchant ainsi l'adhésion de ces bactéries à la surface dentaire (Benslimane *et al.*, 2020). De plus, pour la croissance cellulaire ainsi que leur adhésion, la disponibilité de certaines molécules organiques et inorganiques et d'autres nutriments est

indispensable, il est possible que les extraits végétaux puissent inhiber la disponibilité des nutriments. Les extraits actifs de plantes peuvent être prometteurs pour la réduction des surfaces de colonisation et de divers tissus épithéliaux du corps, et par conséquent éviter des infections (**Famuyide et al., 2019**).

4.3.2 Effet de l'extrait acétonique des graines de cumin

Les résultats de nos expériences ont indiqué que les pourcentages d'inhibition du biofilm des souches testés à savoir *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *C. albicans* 3 ainsi que *C. albicans* ATCC 10231 ont augmenté avec l'augmentation de la dose de l'extrait acétonique de cumin (**Figure 69**). D'après les résultats obtenus, on remarque que l'épaisseur du biofilm est d'autant plus faible que la concentration de l'extrait est importante, une inhibition significative a été observée lorsque les extraits étaient utilisés à une dose de 50% CMI et CMI ($P < 0,05$).

Les plus fortes réductions de biofilms ont été observées avec les plus grandes concentrations (CMI) et ceci avec *C. albicans* ATCC 10231, avec un pourcentage d'inhibition de 85.91 % suivie par *E. faecalis* avec une réduction de biofilm de 75.41%, cependant notre extrait de cumin a eu un effet statistiquement similaire sur l'inhibition de biofilm de toutes nos souches microbiennes testées, à une concentration de CMI, notre extrait a eu des pourcentages d'inhibition $> 50\%$, ce qui démontre une activité élevée contre les souches (**Famuyide et al., 2019**).

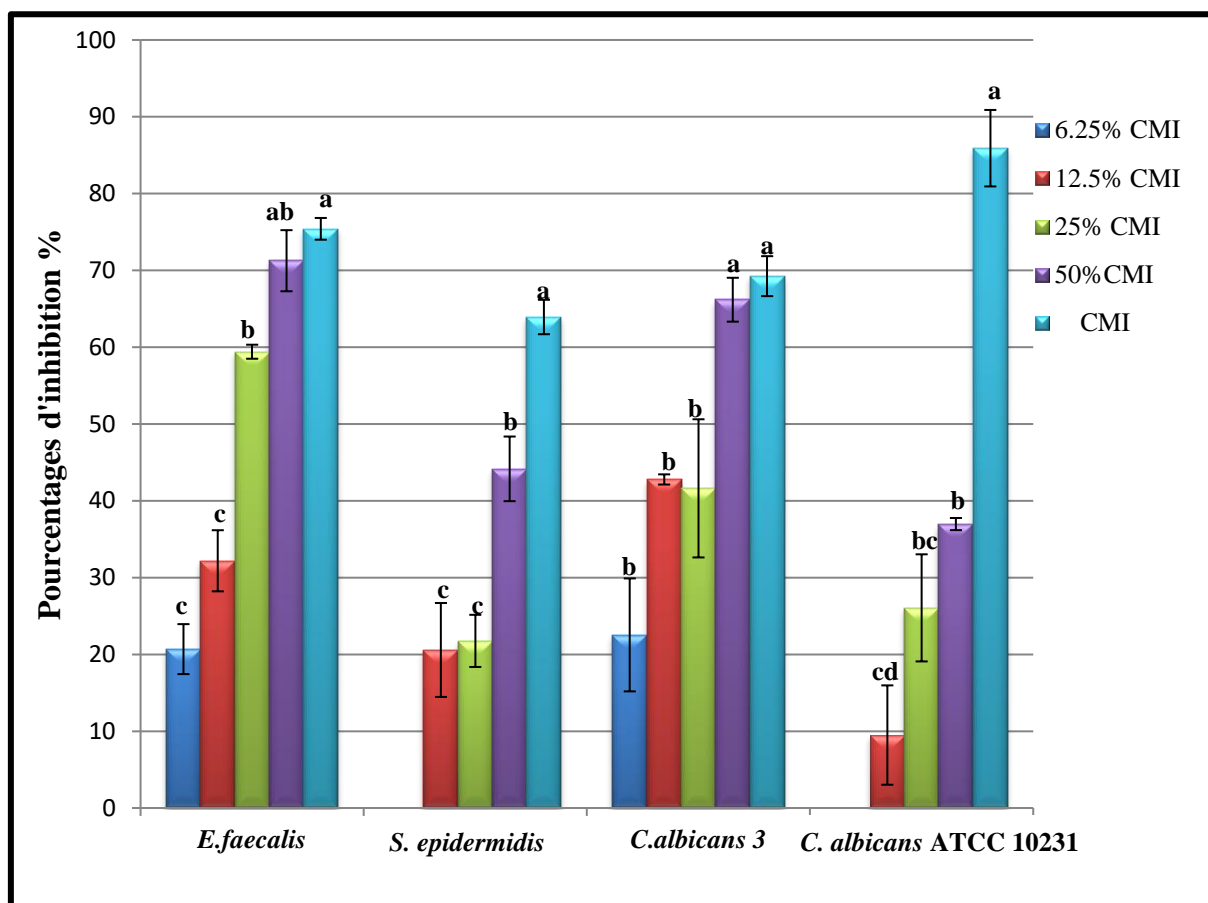


Figure 69. L'effet de l'extrait acétonique de cumin sur la formation des biofilms microbiens. Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard pour trois répétitions. Différentes lettres indiquent une différence significative les unes des autres ($p < 0.05$).

Les biofilms influencent directement la virulence et la pathogénicité d'un agent pathogène, il est optimal d'employer une stratégie qui inhibe efficacement la formation de biofilm (Bakkiyaraj *et al.*, 2013). L'émergence de bactéries résistantes, ainsi que l'utilisation de médicaments allopathiques dans les soins bucco-dentaires qui ne sont pas efficaces pour éradiquer complètement les agents pathogènes buccaux; au contraire, ils se sont avérés cytotoxiques. Ainsi, il est optimal d'employer une stratégie qui inhibe efficacement la formation de biofilm, les produits dérivés des plantes sont de choix contre les agents pathogènes oraux (Geethashri *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, les résultats obtenus par Amalia *et al.* (2019), ont démontré un effet antimicrobien de l'extrait de cumin qui était meilleur que celui de la chlorhexidine à 2% contre *E. faecalis* isolé de la cavité buccale avec une parodontite. De plus ils ont affirmé l'effet de l'extrait de *C. cyminum* contre la formation de biofilm d'*E. faecalis*, ce qui concorde avec nos résultats. En outre, les travaux réalisés par Singh *et al.* (2016), ont démontré un effet modéré de l'extrait méthanolique du cumin dans l'inhibition des mécanismes de QS

basés sur AHL chez *Cronobacter sakazakii* ainsi que sa capacité à perturber les biofilms du pathogène. Cela peut être dû soit à une faible concentration d'extraits bruts utilisés dans leur étude, soit au mécanisme par lequel les composés affectent le système QS.

Des études réalisées par **Derakhshan et al. (2017)** ont révélé que l'extrait alcoolique de cumin avait le potentiel de réduire l'épaisseur de la capsule de *K. pneumoniae*, mais qu'il était incapable d'inhiber la formation de biofilm de cette souche. Par ailleurs, l'huile essentielle des graines de cumin a diminuée l'expression de la couche capsulaire de *K. pneumoniae* et a également réduit de 50% ou plus de la formation de biofilm, ces résultats ont montré que ces souches présentaient une capacité altérée (diminuée) à former un biofilm par rapport au témoin (**Derakhshan et al., 2010**).

Sybiya Vasantha Packiavathy et al. (2012) ont rapporté lors du traitement de bactéries pathogènes avec l'extrait méthanolique de *C. cyminum*, une inhibition de la formation de biofilm d'une valeur de 84 à 95%, 76 à 85% et 24 à 71% pour *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* PAO1 et *S. marcescens*, respectivement. Ces auteurs ont prouvé le potentiel inhibiteur de la détection de quorum (QSI) de *C. cyminum* contre les expressions phénotypiques dépendantes du QS chez ces mêmes souches, **Jayalekshmi et al. (2020)** ont rapporté à leur tour que l'extrait méthanolique de cumin inhibait l'activité de détection de quorum en interférant avec la production de AHL et inhibait ainsi la formation de biofilm de l'organisme *Aeromonas veronii*.

Apparemment, le mode d'action du cumin peut être du aussi à sa réduction de la formation d'EPS qui sont importants au développement de l'architecture et de la maturation des biofilms, en effet **Sybiya Vasantha Packiavathy et al. (2012)** ont démontré l'atténuation de la formation de cette matrice par l'extrait de cumin chez des bactéries pathogènes, de ce fait il est possible que la résistance des cellules sessiles aux antibiotiques soit réduite. En plus des propriétés bioactives du cumin on peut lui rajouter le potentiel inhibiteur de la détection de quorum et antibiofilm. **Shayegh et al. (2008)**, ont évalué l'effet des huiles essentielles du cumin contre la formation de biofilm chez des bactéries isolées de la plaque supragingivale, ils ont constaté que ces huiles ont significativement diminué l'adhésion bactérienne et affecté la viabilité bactérienne dans les biofilms.

Conclusion

Conclusion

Les maladies bucco-dentaires, y compris les caries dentaires et les maladies parodontales, sont généralement causées par un large éventail de microorganismes associés au biofilm buccal ou à la plaque dentaire. En plus de ces maladies buccales, ces pathogènes opportunistes peuvent être impliqués dans diverses autres pathologies systémiques notamment l'endocardite bactérienne, la pneumonie, l'ostéomyélite, maladie coronarienne, infarctus cérébral, le faible poids des nouveau-nés ainsi que des naissances prématurés. Les produits couramment utilisés pour réduire et inhiber la formation de biofilm, présentent certains inconvénients, notamment la pigmentation dentaire, la restauration des souches insensibles, la sensation de brûlure dans la bouche et l'altération de la sensation de goût. À cause de la haute résistance des biofilms aux antimicrobiens et au système immunitaire de l'hôte et les effets secondaires indésirables des thérapies existantes, de nombreux auteurs ont proposé des thérapies alternatives qui peuvent offrir des résultats satisfaisants sans entraîner de risques potentiels pour le patient. Les plantes médicinales sont des sources potentielles de nouveaux composés antimicrobiens et antibiofilms contre les microorganismes pathogènes, qui sont responsables de diverses infections humaines et animales.

Dans ce contexte nous, nous sommes intéressé à l'étude de deux plantes : fruit de *P. granatum* (écorces) et les graines de *C. cuminum* en analysant leur composition chimique et en évaluant quelques propriétés biologiques telles que, l'activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm.

Les résultats de la détermination de la teneur en polyphénols, flavonoides et tanins ont démontré la richesse des extraits d'écorces de grenades par rapport à ceux du cumin. Pour les extraits de grenade c'est la macération avec l'éthanol qui a donné les meilleures teneurs en polyphénols et en flavonoides (204.67 ± 15.26 mg EAG/g MS, 67.67 ± 1.53 mg EQ/g MS respectivement), tandis que pour les tanins c'est l'acétone qui a donné les meilleurs résultats (220 ± 17.32 mg EC/g MS). Concernant les extraits de cumin, les teneurs les plus importantes ont été enregistrées avec l'extrait acétonique pour les polyphénols, flavonoides et tanins (42 ± 3.46 mg EAG/g MS), (24.49 ± 1.24 mg EQ/g MS) et (34.95 ± 8.71 mg EC/g MS) respectivement.

L'étude du pouvoir antioxydant par les tests de DPPH et de FRAP a montré que les extraits de grenades possédaient une grande activité, surtout dans le cas de la macération avec l'éthanol pour le test DPPH, où l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique ($EC_{50}=220 \pm 14$ µg/ml) était statistiquement similaire à celle du témoin positif l'a. ascorbique ($CE=200 \pm$

26 µg/ml), en parallèle pour le test de FRAP c'est l'extrait acétonique qui a donné les meilleurs résultats et dont l'activité était similaire au témoin positif ($p < 0.05$). Néanmoins, dans les deux tests aucune différence statistique n'a été enregistrée dans l'activité entre les différents solvants. Dans le cas des extraits de *C. cuminum*, ces derniers possèdent un pouvoir antioxydant modéré. Les extraits acétoniques (CE=940 ± 42 µg/ml) et éthanoliques (CE=960 ± 50 µg/ml) ont exercé le meilleur effet antioxydant dans le test de DPPH tandis que pour le test de FRAP c'est l'extrait méthanolique qui s'est montré le plus performant. Dans le cas du cumin, on a observé également une similitude statistique dans la performance de l'activité antioxydante des différents solvants. Il est clair à partir des résultats, que les extraits de grenade possèdent un effet antioxydant beaucoup plus élevé que celui des extraits de cumin, ce qui concorde avec les teneurs élevées en polyphénols des extraits de grenade par rapport à ceux du cumin.

Les différents isolats testés dans cette étude, ont été isolés à partir des caries dentaires et de la plaque supragingivale, une sélection a été faite sur ces souches sur la base de leur capacité et performance à former un biofilm. Pour arriver à une sélection de 4 souches Gram+ (*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Staphylococcus epidermidis*), 2 souches à Gram- (*Enterobacter bugandensis* et *Klebsiella oxytoca*), 2 levures (*Candida albicans* 3 et *Candida albicans* 4), ainsi qu'une souche de référence *C. albicans* ATCC 10231. Une identification génotypique a été effectuée pour confirmer l'identité de 4 de ces souches bactériennes *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter bugandensis* et *Klebsiella oxytoca*.

Au terme des essais réalisés sur l'activité antimicrobienne, il apparaît que tous les extraits de grenades sont susceptibles d'inhiber tout nos germes responsables d'infections bucco-dentaires, avec une sensibilité qui diffère selon les souches avec des zones d'inhibition de l'ordre de 14.00± 0.06 à 34.00± 0.23 mm. *G. morbillorum*, *S. epidermidis* et les trois souches fongiques se sont montrés extrêmement sensible aux extraits de grenades. Concernant les extraits de cumin, ils se sont avérés efficaces contre toutes les bactéries Gram+ (à l'exception d'*E. faecalis* avec les extraits méthanolique et éthanolique) et les levures, mais inefficaces contre les bactéries à Gram-. Les plus grandes zones d'inhibition ont été notées à des diamètres de 23 mm contre *C. albicans* 4 (extrait éthanolique), 17.30 mm contre *E. faecalis* (extrait acétonique) et 15 mm contre *S. mutans* (extrait méthanolique et acétonique). En comparant entre les extraits de nos deux plantes, on a remarqué une activité antimicrobienne plus élevée pour les extraits de grenades, ceci est en corrélation avec les

teneurs élevées en polyphénols. Le changement des solvants pour nos deux plantes n'a eu aucun effet statistiquement significatif sur leurs pouvoirs antimicrobiens.

En comparant entre l'effet des extraits et celui des antibiotiques et des antifongiques testés, nous avons constaté que les extraits en particulier ceux de la grenade étaient plus actifs que les antimicrobiens standards, car ces derniers n'étaient pas tous actifs contre les souches testées contrairement aux extraits de grenades. De même pour les extraits de cumin qui avaient montrés un effet antifongique contre toutes les levures à l'opposé des antifongiques testés. Le plus grand halo d'inhibition a été enregistré par la Tétracycline contre *G. morbillorum* (40 mm), tandis que pour les antifongiques il s'agit de l'Econazole (28mm) contre *C. albicans* 3.

Les extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* semblent exercer des effets inhibiteurs de type bactériostatique et fongistatique (avec des CMI comprises entre 0.0125 et 100 mg/ml) contre nos souches bactériennes et fongiques respectivement à l'exception d'*E. bugandensis* où un effet bactéricide a été observé avec les extraits éthanolique et méthanolique, de même pour *G. morbillorum* où les trois extraits d'écorces de grenade ont eu un effet bactéricide. Par ailleurs, pour les extraits de *C. cuminum*, une activité bactéricide et fongicide a été mise en évidence envers nos souches testées (avec des CMI comprises entre 12.5 et 200 mg/ml), néanmoins, une exception est à noter pour *S. mutans* où une activité bactériostatique a été observée avec l'extrait méthanolique, de même pour l'extrait acétonique qui a eu un effet fongistatique contre *C. albicans* 3.

L'activité antimicrobienne exercée par les extraits d'écorces de grenades pourrait être attribuée au Péduncalagine, Punicalagine et Punigluconine, tandis que celle du cumin pourrait être liée à l'acide p-coumarique, Apigénine glucuronide, Apigénine-7-o-glucoside, Apigénine, Diosmine déterminés par HPLC.

Les résultats de l'activité antibiofilm montrent que le taux de formation des biofilms a diminué avec l'augmentation des concentrations des extraits d'écorces de grenades et des graines de cumin. Nos deux extraits ont montré une activité antibiofilm très intéressante envers les souches de *C. albicans* responsables de candidose buccale ainsi que chez les bactéries testées et qui sont responsables de diverses infections bucco-dentaires. L'inhibition maximale du biofilm par l'extrait éthanolique de grenade et acétonique de cumin a été observée à la plus grande concentration (CMI), où les plus fortes réductions de la production de biomasse de biofilm ont été observées avec *E. faecalis* (91.95%) et *S. epidermidis* (90.7%)

dans le cas de la grenade, et avec *C. albicans* ATCC 10231, (85.91 %) suivie par *E. faecalis* (75.41%) pour le cumin.

La transformation des fruits et légumes génère des quantités de déchets qui sont une source de sucres, de minéraux, d'acides organiques, de fibres alimentaires et de composés phénoliques qui ont un large éventail d'actions qui comprend des activités antioxydantes, antimutagènes, cardio-préventives, antibactériennes et antivirales. Ainsi, il pourrait être intéressant d'utiliser les écorces de grenade qui sont un sous produit de la fabrication des jus, ainsi que les graines de cumin pour leurs activités antioxydantes, antimicrobiennes et antibiofilms contre les pathogènes buccaux par leurs incorporation dans les chewing-gums, les bains de bouches, les dentifrices ainsi que dans l'élaboration de produits pour réduire les caries et la plaque dentaire et ceci en ayant des avantages économiques dans le cas des écorces de grenade.

Nos résultats constituent la première étape d'une recherche de substances de source naturelle biologiquement active, en perspectives les recommandations suivantes sont suggérées :

- Utilisations d'autres techniques d'extraction et voir leurs impacts sur les teneurs en polyphénols.
- Un meilleur fractionnement des constituants afin de caractériser les molécules responsables de ses activités.
- Mener des études *in vivo* pour justifier et évaluer l'utilisation potentielle des extraits d'écorces du fruit de *P. granatum* et des graines de *C. cuminum*.
- Evaluer la cytotoxicité des extraits d'écorces de grenade et des graines de cumin sur les cellules de fibroblastes gingivales humains.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

- Abbas O, Compère G, Larondelle Y, Pompeu D, Rogez H, Baeten V.** 2017. Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database *Vibrational Spectroscopy*. 92 : 111-118.
- Abbaszadegan A, Gholami A, Ghahramani Y, Ghareghan R, Ghareghan M, Kazemi A, Iraj A, Ghasemi Y.** 2016. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cuminum Cyminum* as an Intracanal Medicament Compared to Chlorhexidine Gel. *Iranian Endodontic Journal*. 11: 44-50.
- Abdel Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S.** 2011. Studies on the effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 : 5083-5088.
- Abdel Moneim AE.** 2013. The Neuroprotective Effects of Purslane (*Portulaca oleracea*) on Rotenone-Induced Biochemical Changes and Apoptosis in Brain of Rat. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.12:830-841.
- Abdollahzadeh SH, Mashouf RY, Mortazavi H, Moghaddam MH, Roozbahani N, Vahedi M.** 2011. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *Journal of Dentistry*. 8 : 1-6.
- ABE E, DELYLE SG, ALVAREZ JC.** 2010- Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés *Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties*. *Annales de Toxicologie Analytique*. 22 : 51- 59.
- Abiola T, Falana LK, Adediji DO.** 2018. Proximate Composition, Phytochemical Analysis and *in vivo* Antioxidant Activity of Pomegranate Seeds (*Punica granatum*) in Female Albino Mice. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*. 7: 250.
- Abu Baker SH, El-Barrawy MA, Omran EA, Raslan HS.** 2017. Occurrence of some Oral Potentially Pathogenic Microorganisms and their associated Risk Factors *Journal of High Institute of Public Health*. 47:69-75.
- Abu-Elteen KH, Abu-Alteen RM.** 1998. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol Actions*. 21:41-8.
- Achat S.** 2013. Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse doctorat. Université d'Avignon. France.
- Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D.** 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem*. 54: 980-985.
- Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN.** 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 78:189-199.
- Ahmet D, Mustafa Ozgen, Kenan S, Dayisoylu NE, Coskun D.** 2009. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *journal/molecules*. 14:1808-1817.
- Aires J.** 2011. Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ? *Bull. Acad. Vét. France - Tome 164 - N°3*.
- Akroum S, Bendjeddou D, Satta D, Lalaoui K.** 2010. Antibacterial, antioxidant and acute toxicity tests on flavonoids extracted from some medicinal plants. *International Journal of Green Pharmacy*. 10: 165-169.
- AL Juhaimi FY, Ghafoor K.** 2013.Extraction optimization and in vitro antioxidant properties of phenolic compounds from Cumin (*Cuminum cyminum l.*) seed. *International Food Research Journal*. 20: 1669-1675.

- Al- Nowihi M, Faisal A, Al- Asbahi G.** 2020. Antimicrobial activity of *Rumex nervosus* extract collected from Yemen against local selected isolates pathogens. *J Microbiol Exp.* 8:93-96.
- Al Sa'ady AT.** 2020. Antibacterial screening for five local medicinal plants against nosocomial apthogens : *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eurasia J Biosci.* 14 : 553- 559.
- Alam K, Al Farraj DA, Mah-e-Fatima S, Yameen MA, Elshikh MS, Alkufeidy RM, Mustafa MA, Bhasme P, Alshammari MK, Ikubaisi NA et al.** 2020. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Infect Public Health.* <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.007>
- Alav IJ, Sutton M J, Rahma KM.** 2018. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 73: 2003-2020.
- Alhijna OSA, Bourich EH.** 2017. Grenade de Beni Snous: Etude et caractérisation chimique des extraits de pépins, évaluation de l'activité microbiologique. Mémoire de docteur en pharmacie : Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen (Algérie).p 64.
- Ali SL, El-Baz FK, El-Emary GAE , Khan EA, Mohamed AA.** 2014. HPLC analysis of poly phenolic compounds and free radical scavenger activity of pomegranate. *International journal of pharmaceutical and clinical research.* 6: 348-355.
- Almeida NLM, Figueiredo-Godoi, LMA, Venturini J, et al.** 2018. Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*. *J Clin Exp Tox.* 2:8-17.
- Al-Refi MR.** 2016. Antimicrobial, Anti-biofilm, Anti-Quorum Sensing and Synergistic Effects of Some Medicinal Plants Extracts. Thèse pour le diplôme de Master en sciences biologiques / technologie médicale : Te islamic university of Gaza (palestine).
- AL-Saeed MH, Othman RM, AL-Saeed AH.** 2015. Effect of *Punica granatum* rinds ethanolic extract on healing of fungated wounds in rabbits. *AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci.* 14 : 109-117.
- Al-Snafi AE.** 2016. The pharmacological activities of *Cuminum cyminum* - A review. *IOSR Journal of Pharmacy.* 6: 46-65.
- Alvarez-ordonez A, Carvajal A, Arguello H, Martinez-Lobo FJ, Carrasco GN, Rubio P.** 2013. Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied Microbiology.* 115:50-60.
- Al-Zoreky NS.** 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *Int J Food Microbiol.* 134: 244-248.
- Amaechina FC, Ayid BA, Omagbai EK.** 2007. Pharmacognosy and hypotensive evaluation of focus exasperate vahl leaf. *Acta poloniae pharmaceutica.* 64: 543-546.
- Amalia R, Dewi SU, Margono A, Usman M.** 2019. Antibacterial Effects of *Cuminum cyminum* Extract Against *Enterococcus Faecalis* Biofilms From Clinical Isolates. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.* 19:e5115.
- Amarowicz R, Pegg RB, Moghaddam PR, Barl B, Weil JA.** 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry.* 84: 551-562.
- Amin GH.** 2012. Handbook of Herbs and Spices (Second edition). Food Science, Technology and Nutrition. 1: 250-259.
- Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N.** 2019. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discover. *Metabolites.* 9: 1-13.
- Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF.** 2013. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum L.* and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology.* 1678-4405.

- Arabi A.** 2018. Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse doctorat : Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie).p158.
- Arun N, Singh DP.** 2012. *Punica granatum*: A review on pharmacological and therapeutic properties. IJPSR. 3: 1240-1245.
- Aruni AW, Yuetan Dou Y, Mishra M, Fletcher HM.** 2015. The Biofilm Community: Rebels with a Cause. Curr Oral Health Rep. 2: 48-56.
- Arveux C.** 2016. Maladies parodontales chez le fumeur. Prise en charge à l'officine. Thèse doctorat : UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER, Toulouse (France).p128.
- Asimi OA, Sahu NP, Pal AK.** 2013. Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. International Journal of Scientific and Research Publications. 3: 1-8.
- Atanasov A, Birgit Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JD, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H.** 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology Advances. 33: 1582-1614.
- Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaïss CA, Sato M, Toyooka K et al.** 2017. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. Science. 358 : 359-365.
- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S.** 2010. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. 11: 69-81.
- Athamena S.** 2009. Etude quantitative des flavonoides des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire de magister : université el-hadj lakhdar, Batna (Algérie).p 88

B

- Bador J.** Résistance aux antibiotiques par mécanisme d'efflux chez *Achromobacter xylosoxidans*. 2013. Thèse de doctorat : Sciences agricoles. Université de Bourgogne: France.
- Bakkalbasi E, Mentés O, Artik N.** 2009. Food Ellagitannins- Occurrence, Effects of Processing and Storage, Crit. Rev. Food Sci. nut. 49: 283- 298.
- Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK.** 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling. 29:929-937.
- Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, et al.** 2001. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. Med Microbiol Immunol (Berl).190:113-120.
- Banihani SA, Makahleh SM, El-Akawi Z, Al-Fashtaki RA, Khabour OF, Gharibeh MY, Saadah NA, Al-HashimiFH, Al-Khasieb NJ.** 2014. Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances β -cell function, and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. Nutr Res. 34: 862- 867.
- Baracat EC, Carvalho Lopes CM, Lazzarini JR, Soares Júnior JM.** 2018. Phytotherapy: yesterday, today, and forever ? REV ASSOC MED BRAS. 64:765-768.
- Barathikannan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA, Agastian P, Arasu MV, Choi HS, Kim YO.** 2016. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. BMC Complementary and Alternative Medicine. 16:264.

- Barchan A, Bakkali M, Arakrak A, Laglaoui A.** 2016. Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie*. 14: 88–96.
- Bärtels A.** 1998. Guide des plantes du bassin méditerranéen. Editions Ulmer. 400 pages. Page 352.
- Bar-Ya'akov I, Tian L, Amir R, Holland D.** 2019. Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. *Front. Plant Sci.* 10:620.
- Bauer AW, Kirby WM, Sheris JC, Turck M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 45: 149-158.
- Belahcen El Ouali R.** 2016. Candidoses buccales chez l'enfant. Thèse de médecine : Université Mohammed V, RABAT (Maroc).p 148.
- Belal AA, Ahmed FBM, Ali LI.** 2017. Antibacterial Activity of *Cuminum Cyminum L.* Oil on Six Types of Bacteria. *American Journal of BioScience.* 5 : 70-73.
- Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B.** 2015. Peri- implant infections of oral biofilm etiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 830:69-84.
- Bello-López JM, Cabrero-Martínez OA, Ibáñez-Cervantes G, Hernández-Cortez C, Pelcastre-Rodríguez LI, Gonzalez-Avila LU, Castro-Escarpulli G.** 2019. Horizontal Gene Transfer and Its Association with Antibiotic Resistance in the Genus *Aeromonas spp.* *Microorganisms.* 7 : 363.
- Bendjabeur S.** 2012. Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *Punica granatum L.*) en vue de leur utilisation alimentaire. Sciences Alimentaires. Mémoire de magister : Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger (Algérie). P 137.
- Benhammou N.** 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorat : Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen (Algérie). P 113.
- Benslimane S, Rebai O, Djibaoui R, Arabi A.** 2020. Pomegranate Peel Extract Activities as Antioxidant and Antibiofilm against Bacteria Isolated from Caries and Supragingival Plaque. *Jordan Journal of Biological Sciences.* 13 : 403- 412.
- Bettaieb Rebey I, Bourgou S, Ben Slimen Debez I, Iness Jabri Karoui IJ, Hamrouni Sellami I, Msaada K, et al.** 2012. Effects of Extraction Solvents and Provenances on Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum L.*) Seeds. *Food Bioprocess Technol.* 5: 2827-2836.
- Bialonska D, Kasimsetty S, Schrader KK, Ferreira D.** 2009. The Effect of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Byproducts and Ellagitannins on the Growth of Human Gut Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57: 8344-8349.
- Biswas S, Biswas I.** 2013. SmbFT, a Putative ABC Transporter Complex, Confers Protection against the Lantibiotic Smb in Streptococci. *J Bacteriol.* 195 : 5592- 5601.
- Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Bernardini A, Blanca Sanchez M, Luis Martinez J.** 2016. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms.* 4: 14.
- Boeing JS, Barizão EO, Silva BCE, Montanher PF, De Cinque Almeida V, Visentainer JV.** 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J.* 8:48.
- Bolou G.E.K., Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan J.D., Djaman A.J.** 2011. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.* 80 : 772-790.

- Borty SC, Bin Hafiz KM, Ali M, Begum K, Ahammed T, Shirajum Monir S, Alimul Islam A.** 2015. Isolation, identification and antibiogram profile of bacteria isolated from dental caries patients of Mymensingh district of Bangladesh. *Asian J. Med. Biol. Res.* 1: 244-253.
- Boudjouref M.** 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Biochimie appliquée. Mémoire magister : Université Ferhat Abbas, Sétif (Algérie).
- Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H.** 2018. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 26: 229-242.
- Bowen WH, Koo H.** 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 45: 69-86.
- Braga de Souza JV, Talhari C, Reinel D, Talhari S.** 2010. Utilization of experimental design and surface response methodology to study the influence of glucose and ammonium sulphate in the chlamydo sporulation of *Candida albicans* FMT123-05. *Journal of Yeast and Fungal Research* 1: 30-34.
- Braga LC, Leite AAM, Xavier KGS, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, et al.** 2005. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* 51: 541-547.
- Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, Chartone-Souza E, Nascimento AMA.** 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 96: 335-339.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13: 20-26.
- Bruneton J.** 2008. Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.
- Burt S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94: 223-253.
- Bushra S, Farooq A, Muhammad A.** 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules.* 14: 2167-2180.
- Büttner H, Mack D, Rohde H.** 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 5 : 14.

C

- Cai JN, Jung JE, Dang MH, Kim MA, Yi HK, Jeon JG.** 2016. Functional Relationship between Sucrose and a Cariogenic Biofilm Formation. *PLoS ONE.* 11: e0157184.
- Çam M, Hişil Y.** 2010. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem.* 123: 878-885.
- Carrère S, Deneve E, Bouyabrine H, Marchand J.P, Navarro F.** 2008. *Streptococcus constellatus*, abcès épidual et fistule colovésicale. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 32: 786-787.
- Cerda B, Llorach R, J.Ceròn JJ, Espin JC, Tomàs-Barberà FA.** 2003. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.* 42: 18-28.
- Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A.** 2011. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complement. Altern. Med.* 11: 29.
- Chakass MA, Carbonnier-Jarreau MC, Verhille AM, Jean-Pierre Reduron JP.** 2007. Étude palynologique de trois variétés du grenadier (*Punica granatum*) au Liban, *Acta Botanica Gallica.* 154: 27-42.

- Chakraborty B, Burne RA.** 2017. Effects of arginine on *Streptococcus mutans* growth, virulence gene expression, and stress tolerance. *Appl Environ Microbiol.* 83:e00496- 17.
- Chandra J, Mukherjee PK.** 2015. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol Spectr.* 3 : 4.
- Chandrasoma P, Taylor CR.** 2005. "Part A. General Pathology, Section II. The Host Response to Injury, Chapter 3. The Acute Inflammatory Response, sub-section Cardinal Clinical Signs". *Concise Pathology* (3rd edn), NY McGraw-Hill, New York, USA.
- Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M.** 2006. *Microbiologie en odonto-stomatologie.* Paris: Maloine. 132-160.
- Chhatwal GS, Graham R.** Streptococcal Diseases. 2017. *International Encyclopedia of Public Health.* 3: 87-97.
- Chmit M, Kanaan H, Habib J, Abbass M, Mcheik A, Ali Chokr A.** 2014. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pac J Trop Med.* 7: S546-S552.
- Choi JG, Kang OH, Chae YS, Oh YC, Brice OO, Kim MS, Sohn DH, Kim HS, Park H, Shin DW, Rho JR, Kwon DY.** 2011. In Vitro and in Vivo Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evidence- Based complementary and Alternative Medicine.* 5: 1-8.
- Choukchou-Braham N, Rahmoun MN, Benabdallah M, Villemin D, Boucherit K, Mostefa-Kara B, Ziani-Cherif C.** 2010. Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica.* 2 : 320-332.
- Ciofu O, Tolker-Nielsen T.** 2019. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.* 10: 913.
- CLSI.** 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts ; Approved Guideline- Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ.** 2008. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine™, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *Journal of Applied Microbiology.* 105 :733-740.
- Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.** Société Française de Microbiologie. CASFM/EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed; 2018 [131 p].
- Cooper KE.** 1955. Theory of antibiotic inhibition zones in agar media. *Nature, Lond.* 176, 510.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F.** 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 67: 5427-5433.
- Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA.** 2013. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infection and immunity.* 81: 189-200.

D

- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R.** 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità.* 43 : 348-361.
- Dacosta Y.** 2003. *Les phytonutriments bioactifs.* Ed Yves Dacosta. Paris. 317p.
- Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M.** 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences.* 9 : 273–281.

- Dai J, Mumper RJ.** 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- Dame-Teixeira N, Parolo CCF, Marisa Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T.** 2016. *Actinomyces spp.* gene expression in root caries lesions. *J. Oral. Microbiol.* 8 : 32383.
- Dastjerdi EV, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A.** 2014. Effect of *Punica granatum L.* Flower Water Extract on Five Common Oral Bacteria Biofilm Formation on Orthodontic Wire. *Iranian J Publ Health.* 43 : 1688-1694.
- Davane M, Nagoba B, Pichare A, Kendre P.** 2018. Properties of *Candida albicans* Biofilms: An Update. *Am J Clin Microbiol Antimicrob.*1: 10-17.
- De Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM.** 2006. Presence of mutans streptococci and *Candida spp.* in dental plaque/ dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch. Oral Biol.* 51: 1024-1028.
- Deka N.** 2014. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative Staphylococcus isolated from Non-clinical Isolate. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 810-815.
- Dekaboruah E, Suryavanshi MV, Verma AK.** 2020. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of Microbiology.*10 : 1-21.
- Delgado Sánchez C.** 2017. Nouvelles méthodes d'optimisation et de caractérisation de mousses à base de tanins pour l'isolation thermique du bâtiment. Thèse doctorat. Université De Lorraine. France. P 255.
- Demir S, Korukluoglu M.** 2020. A comparative study about antioxidant activity and phenolic composition of cumin (*Cuminum cyminum L.*) and coriander (*Coriandrum sativum L.*) *Indian Journal of Traditional Knowledge.* 19: 383-393.
- Deo PN, Deshmukh R.** 2019. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 23: 122-128.
- Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M.** 2010. Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid Integrity of *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacogn Mag.* 6: 57–61.
- Derakhshan S, Navidinia M, Ahmadi A.** 2017. Antibacterial Activity of Dill (*Anethum graveolens*) Essential Oil and Antibiofilm Activity of Cumin (*Cuminum cyminum*) Alcoholic Extract. *Infect Epidemiol Microbiol.* 3 : 122-126.
- Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M.** 2008. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum L.*) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicro Agents.* 32:432-436.
- Devulapalle KS, Mooser G.** 2001. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res.* 80: 466-469.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster JB, Tanner ACR, Yu WH, Lakshmanan A, Wade GW.** 2010. The Human Oral Microbiome. *Journal of bacteriology.* 19: 5002-5017.
- Díaz PI, Kolenbrander PE.** 2009. Subgingival Biofilm Communities in Health and Disease. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 2 : 187-192.
- Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Navales G.** 2010. Production of ica ADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases.* 10: 68.
- Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B.** 2009. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 24: 69-75.

- Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y.** 2011. The antioxidant potency of *Punica granatum L.* Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *J. Med. Food.* 14:1638-1646.
- Djordjevic D, Wiedmann M, Mc Landsborough LA.** 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 2950-2958.
- Dolatabadi S, Salari Z, Mahboubi M.** 2019. Antifungal effects of *Ziziphora tenuior*, *Lavandula angustifolia*, *Cuminum cyminum* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering from vulvovaginal candidiasis. *Infectio.* 23: 222-226.
- Donlan RM, Costerton JV.** 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 : 167-193.
- Douaouri NEH.** 2018. Contribution à une étude phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum L.*) – Etude in vivo. Thèse de doctorat en Science Biologique : Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie).
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL.** 2006. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 32: 527-531.
- Dung NT, Kim JM, Kang SC.** 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 3632-3639.
- Durgesh BH, Alkheraif AA, Malash AM, Hashem M.I, Assery MK, Asmari M, Durgesh P.** 2016. Genotypic characterization of *Enterococcus* species isolated from the oral cavity and their pattern of antibiotic susceptibility. *Asian Biomedicine.* 10: 49- 53.

E

- Ebada ME.** 2017. Cuminaldehyde: A potential drug candidate. *J Pharmacol Clin Res.* 2:1-4.
- El Gharras H.** 2009. "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology.* 44: 2512-2518.
- El-Nemr SE, Ismail IA, Ragag M.** 1990. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit - . *Food/ Nahrung* . 34 : 601-606.
- Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y , Nasri N, Ferchichi A.** 2012. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J Med Plants Res.* 6: 4724-4730.
- El-Ghorab AH, Shibamoto T, Özcan MM.** 2007. Chemical Composition and Antioxidant Activities of Buds and Leaves of Capers (*Capparis ovata* Desf. var. *canescens*) Cultivated in Turkey. *Journal of Essential Oil Research.* 19:72-77.
- Elias S, Banin E.** 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews.* 365: 990-1004.
- Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BP.** 2012. Activity of Spray-dried Microparticles Containing Pomegranate Peel Extract against *Candida albicans*. *Molecules.* 17: 10094-10107.
- Ertürk, Ö.** 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia Bratislava.* 61: 275-278.
- Euzeby J.** 1994. Mycologie médicale comparée. Collection Mérieux. Fondation manuel, Tome II. 88-251.

F

- Fabrizi S.** 2016. Interfacial instability generation in dental biofilms by high-velocity fluid flow for biofilm removal and antimicrobial delivery. These doctorat: université de Southampton (Angleterre).P 192
- Falsetta ML , Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H.** 2014. Symbiotic Relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Synergizes Virulence of Plaque Biofilms In Vivo. *Infection and Immunity*. 82: 1968-1981.
- Famuyide IM, Aro AO, Fasina FO, Eloff JN, McGaw LJ.** 2019. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine underinvestigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 19:141.
- Fauvart M, De Groote VN, Michiel J.** 2011. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of Medical Microbiology*. 60: 699-709.
- Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM.** 2003. Clinical and histological manifestations of dental caries. *Dental Caries. : The Disease and its Clinical Management*. Oxford: Blackwell Munksgaard. 71-97.
- Fernandes L, Pereira JAC, López-Cortés I, Salazar DM, ECD Ramalhosa.** 2015. Physicochemical Changes and Antioxidant Activity of Juice, Skin, Pellicle and Seed of Pomegranate (cv. Mollar de Elche) at Different Stages of Ripening. *Food Technology and Biotechnology*. 53: 397-406.
- Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB.** 2018. Virulence Factors in *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilms Mediated by Farnesol. *Indian J Microbiol*. 58: 138-145.
- Ferradji A.** 2011. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Thèse de doctorat : Université Ferhat Abbas, SETIF (Algérie).P 67.
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A.** 2011. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*. 16: 1486-1507.
- Fischer UA, Carle R, Kammerer DR.** 2011a. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food Chem*. 127 : 807-821.
- Flemming HC, Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 8: 623-633.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT.** 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 42: 872-874.

G

- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I.** 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*. 102: 898-904.
- Gajera HP, Hirpara DG.** 2018. Anti-hyperglycemic Effect and Regulation of Carbohydrate Metabolism by Phenolic Antioxidants of Medicinal Plants against Diabetes. *Curre Res Diabetes & Obes J*. 5: 555-568.
- Geethashri A, Manikandan R, Ravishankar B, Veena Shetty A.** 2014. Comparative evaluation of biofilm suppression by plant extracts on oral pathogenic bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 : 20-23.

- Ghazi M, Goudarzi H, Zadeh Ardekani HA, Habibi M, Azagashb E, Hajikhan B, Goudarzi M.** 2019. Investigation of Antibacterial Effect of *Cuminum cyminum* and *Carum carvi* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus pyogenes*. *Novelty in Biomedicine*. 7: 30-34.
- Ghnimi W.** 2015. Etude phytochimique des extraits de deux *Ricinus communis* et *Jatropha curcas* Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité cetylcholinestérase. Thèse doctorat : Université De Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie). P 225.
- Gigou-Cornet M.** 2006. Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Thèse doctorat : Institut National Agronomique Paris-Grignon (France).
- Gil MI, Tomàs- Barberà FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA.** 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 48:4581- 4589.
- Gill NS, Dhawan S, Jain A, Arora R, Bali M.** 2012. Antioxidant and anti-ulcerogenic activity of wild *Punica granatum* ethanolic seed extract. *Research Journal of Medicinal plants*. 6 : 47-55.
- Glazer I , Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, Amir R.** 2012. Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *J Agric Food Chem*. 60: 4841-4848.
- Gracieux P, Robert JC, et Bonnaure-Mallet M.** 2006. Les biofilms buccaux. *Microbiologie en odonto-stomatologie*, 141–160. Paris, France: Maloine.
- Güçlü E , Yavuz T, Tokmak A, Behçet M, Karali E, Oztürk O, Egeli E.** 2007. Nasal carriage of pathogenic bacteria in medical students: effects of clinic exposure on prevalence and antibiotic susceptibility. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 264: 85-88.
- Guillaume G N, Marc CL.** 2011. *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Rev. can. microbiol*. 57: 1-20.
- Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferara D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H.** 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem*. 104: 1449-1456.

H

- Hadjadj S.** 2017. Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien. Thèse de doctorat : UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA (Algérie).P 99.
- Hajishengallis G.** 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 15: 30-44.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural world to infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol*. 2: 95-108.
- Harborne JB, Baxter H, Moss GP.** 1999. *Phytochemical dictionary: Hand book of bioactive compounds from plants* (2nd ed). London: Taylor & Francis.
- Harriott MM, Noverr MC.** 2009. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3914-3922.
- Hart T, Shears P.** 1999. *Atlas de poche de microbiologie*. 1er éd Flammarion: pp122.
- Hasan AM, Redha AA, Mandeel Q.** 2018. Phytochemical Investigations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Nat Prod Chem Res*. 6: 332.

- Hayrapetyan H, Hazeleger WC, Beumer R.** 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*. 23: 66-72.
- Heinrich M, Teoh HL.** 2004. Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol*. 92: 147-162.
- Hemani K, Gheena S.** 2018. Evaluation of antimicrobial property of extract of *punica granatum* (L) on oral pathogens. *Int. J. Life Sci. Pharma Res*. 8 : 35-40.
- Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R.** 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem*. 97: 122-129.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters VH, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD et al.** 2001. Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci*. 21:3017-3023.
- 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 de doctorat en Alimentation et Nutrition : Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc). P 177.
- Hoceini A, Khelil NK, Ben-Yelles I, MesliA, Ziouani S, Ghellai L, Aissaoui N, Nas F, Mounia Arab M.** 2016. Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults. *Asian Pac J Trop Biomed*. 6: 720-726.
- Hoceini A.** 2017. Caractérisation de la microflore constitutive du biofilm bucco-dentaire de la plaque supra-gingivale chez des sujets indemnes de caries dentaires et des sujets carié. Thèse de doctorat : Université De Tlemcen (Algérie). P 139.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T et Maeda N.** 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J. Dent. Res*. 88: 982-990.
- Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I.** 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*. 35: 127- 191.
- Hossain MK, Dayem AA, Han J, YinY, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG.** 2016. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int. J. Mol. Sci*. 17: 569.
- Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y.** 2012. Biofilm-Forming Capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from Ocular Infections. *Immunology and microbiology*. 53: 5624-5631.
- Houston MC.** 2005. Nutraceutical, vitamins, antioxidants and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 47: 396-449.
- Houvion E.** 2014. Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés. Thèse de doctorat : Université De Lorraine (France).
- Hubert, J.** 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. Thèse de doctorat : Ecole doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, toulouse (France). P 174.
- Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan DJ, Koo H.** 2017. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog*. 13: e1006407.

I

- Ilie O.** 2014. Numerical Studies of Dental Plaque and Caries Formation. Thèse doctorat : "Politehnica" University of Buchares (Romanie).P 165.

- Inaba H , Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A.** 2014. Porphyromonas gingivalis promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cell Microbiol.* 16: 131-145.
- Ince A, Tiemer B, Gille J, Boos C, Russlie M.** 2002. Total knee arthroplasty infection due to *Abiotrophia defectiva*. *J. Med. Microbiol.* 51: 899-902.
- Iñigo M, Del Pozo JL.** 2018. Fungal biofilms: From bench to bedside. *Rev. Esp. Quim.* 31 : 35–38.
- Isah T.** 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research.* 52: 39.
- Ismail T, Sesteli P, Akhtar S.** 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol.* 143:397-405.
- ISO 14502-1:** 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: C/ontent of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.

J

- Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M, Amarowicz R.** 2019. A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules.* 24: 21-33.
- Jahfar M, Vijayan KK, Azadi P.** 2003. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res. J. Chem. Environ.* 7 : 43-50.
- Jaisinghani RN, Makwana S, Kanojia A.** 2018. Study on antibacterial and flavonoid content of ethanolic extract of *Punica granatum* (pomegranate) peel. *Microbiology research.* 9: 6-9.
- Jalal H, Pal MA, Hamdani H, Rovida M, Khan NN.** 2018. Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 7: 992-997.
- Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP.** 2009. *Streptococcus mutans* competence stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell.* 8: 1658-1664.
- Jayalekshmi, Krishna S, Ramasamy, Suganthi.** 2020. Antibiofilm and antiquorum sensing potential of *Cuminum cyminum* against *Aeromonas veronii*. *Journal of Advanced Scientific Research.* 11: 105-111.
- Jinu U, Shanmugapriya K, Thayumanavan T.** 2014. Evaluation of phytochemical and antioxidant contents of *Mesua ferrea*, *Hemionitis arifolia* and *Pimenta dioica*. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 3: 273-276.
- Joffin JN, Leyral G.** 2006. Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques, 4e édition.
- Johri RK.** 2011. *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. *Pharmacogn Rev.* Jan-Jun. 5: 63-72.
- Joshi C, Patel P, Kothari V.** 2019. Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens [version 2; peer review: 1 approved, 2 approved with reservations]. *F1000Research.* 8:70.
- Jurenka J.** 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Review.* 13: 128-144.

K

- Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, et al.** 2017. Relative abundance of total subgingival plaque- specific bacteria in salivary microbiota

- reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. Plos One. 12:e 0174782.
- Kahouadji A, Guellil O, Belkaid A.** 2018. Effet thérapeutique *ex vivo* de l'huile essentielle du cumin (*Cuminum Cyminum*) sur l'activité bactérienne des Streptocoques impliqués dans les lésions carieuses chez les enfants diabétique de type 1. Mémoire de docteur en Médecine Dentaire : Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen (Algérie).
- Kaiser TD, Pereira EM, Dos Santos KR, Maciel EL, Schuenck RP, Nunes AP.** 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 75: 235-239.
- Kalaivani P, Saranya RB, Ramakrishnan G, Ranju V, Sathiya S, Gayathri V, Thiyagarajan LK, Venkatesh JR et al.** 2013. *Cuminum cyminum*, a Dietary Spice, Attenuates Hypertension via Endothelial Nitric Oxide Synthase and NO Pathway in Renovascular Hypertensive Rats. Clinical and Experimental Hypertension. 35: 534-542.
- Kanoun K, Abbouni B, Bénine MA, Benmahdi FZ, Marouf B.** 2014. Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de *punica granatum* linn sur deux souches phytopathogènes: *ascocyhta rabiei* (pass.) labr.et *fusarium oxysporum* f.sp.radicis – *lycopersici*. European Scientific Journal. 10: 1857 - 7881.
- Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH.** 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. Journal of bacteriology.185: 4693-4698.
- Kaplan JB.** 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 89: 205-218.
- Kaplan JB.** 2014. Biofilm matrix-degrading enzymes. Microbial Biofilms: Methods and Protocols.1147: 203- 213.
- Kaur S, Mondal P.** 2014. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. J Microbiol Exp.1: 23-28.
- Kennas A, Amellal-Chibane H.** 2019. Comparison of five solvents in the extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. The North African Journal of Food and Nutrition Research: (2019) 03; (05): 140-147.
- Khan NH, Ying ALT, Tian CGZ, et al.** 2017. Screening of *Punica granatum* seeds for antibacterial and antioxidant activity with various extracts. J Gastroenterol Dig Dis. 1:1-7.
- Khangholi M, Jamalli A.** 2016. The effects of sugars on the biofilm formation of *Escherichia coli* 185pon stainless steel and polyethylene terephthalate surfaces in a laboratory model. Jundishapur J. Microbiol. 9: e40137.
- Khorram Z, Hakimaneh SMR, Naeini A, Rafieinezhad R, Salari AM, Shayegh SS.** 2019. The Antifungal Effects of Two Herbal Essences in Comparison with Nystatin on the *Candida* Strains Isolated from the Edentulous Patients. J Contemp Dent Pract. 20:716–719.
- Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI.** 2016. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. J Biomed Opt. 21: 101409.
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN.** 2017. Periodontal diseases. Nat. Rev. Dis. Prim. 3: 17038.
- Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H.**1999. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. CariesRes1999. 33: 178-184.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ.** 2002. Communication among oral bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66:486-505.
- Kolenbrander PE, Palmer Jr, Periasamy RJ, Jakubovics NS.** 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. Nature Reviews Microbiology. 8: 471.

- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI.** 2006. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000. 42:47-79.
- Koné M.S.** 2010. Bilan de sept (7) ans d'hémoculture en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako. Thèse de doctorat : Université De Bamako (République du Mali). P 85
- Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK.** 2019. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J. Clin. Med.* 8: 1135.
- Konovalova A, Sogaard-Andersen L.** 2011. Close encounters: Contact-dependent interactions in bacteria. *Molecular microbiology.* 81:297-301.
- Koo H, Falsetta ML, Klein MI.** 2013. The Exopolysaccharide Matrix A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res.* 92: 1065-1073.
- Koolaji N, Shammugasamy B, Schindeler A, Dong Q, Dehghani F, Valtchev P.** 2020. Citrus Peel Flavonoids as Potential Cancer Prevention Agents. *Dev Nutr.* 4:1-25.
- Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B.** 2018. Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease –Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase. *Front. Microbiol.* 9: 53.
- Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM.** 2014. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J. Dent. Res.* 93: 445-451.
- Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A.** 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33:499-515.
- Kuete V.** 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.* 76: 1479-1491.
- Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA.** 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 46 : 1773-1780.
- Kumar M, Dandapat S, Ranjan R, Kumar A, Sinha MS.** 2018. Plant mediated synthesis of silver nanoparticles using *Punica granatum* aqueous leaf extract. *J Microbiol Exp.* 6:175-178.
- Kumar N, Neeraj, Kumar S.** 2018. Functional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *The Pharma Innovation Journal.* 7: 71-81.
- Kumazawa S, Hamasaka T and Nakayama T.** 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry.* 84: 329-339.
- Kwak HM, Jeong HH, Sohng BH et al.** 2005. Quantitative analysis of antioxidants in Korea pomegranate Husk (*Granati pericarpium*) cultivated in different site. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 48: 431-434.

L

- Lalla E, Papapanou PN.** 2011. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7: 738-748.
- Lansky EP, Newman RA.** 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. ethnopharm.* 109 : 177-206.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Cald- Well DE.** 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173 : 6558- 6567.
- Lebeaux D, Ghigo JM.** 2012. Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Med Sci (Paris).* 28 : 727-739.
- Leopold DA, Rhodes G, Muller KM, Jeffery L.** 2005. The dynamics of visual adaptation to faces. *Proc.R.Soc.Lond.BBiol.Sci.* 272: 897-904.

- Lewis K.** 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 5: 48-56.
- Lewis K.** 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:999-1007.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB.** 2014. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients.* 6 : 6020-6047.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S.** 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 96:254-260.
- Lim J, Lee KM, Kim SH, Nam SW, Oh YJ, Yun HS, Jo W, Oh S, Kim SH, Park S.** 2008. Nanoscale characterization of *Escherichia coli* biofilm formed under laminar flow using atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). *Bull. Kor. Chem. Soc.* 29: 2114-2118.
- Lima RDF, Alves EP, Rosalen PL, Gois Ruiz ALT, Duarte MCT, Góes VFF, de Medeiro ACD et al.** 2014. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2014 : 802696.
- Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK.** 2005. Thea flavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp 41. *Biochim Biophys Acta.* 1723 : 270-281.
- Loberto JCS, Paiva Martins C, Dos Santos SSF, Cortelli J.R; Cardoso Jorge A.O.** 2004. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patient. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35:64-68.
- Longtin R.** 2003. The pomegranate: Nature's power fruit? *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 95:346-348.
- Lu L, Wei Hu, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, Cheng Q, Zhu J, Li M.** 2019. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med.* 14: 11.
- Lynge Pedersen AM, Belstrom D.** 2019. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry.* 80 : S3-S12.

M

- Maataoui BS, Hmyene A, Hilali S.** 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal.* 7: 3-8.
- Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Silva MG, Kuster MR.** 2002. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *J. Braz. Chem. Soc.*13: 606-610.
- Macià MD, del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J.** 2018. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 36: 375-381.
- Madrigal-Carballo S, Rodriguez G, Krueger CG, Dreher M, Reed JD.** 2009. Pomegranate (*Punica granatum* L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *J Funct Foods.* 1: 324-329.
- Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ.** 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 65:183-195.
- Madugula P, Reddy S, Koneru J, Srinivasa Rao A, Sruthi R, and Teja Dalli D.** 2017. "Rhetoric to Reality"- Efficacy of *Punica granatum* Peel Extract on Oral Candidiasis: An In vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 11: 114-117.
- Malviya S, Jha A, Hettiarachchy N.** 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of food science and technology.* 51: 4132-4137.
- Manuel A, Rao JV, John K, Aranjani JM.** 2014. Biofilm Production and Antibiotic Susceptibility of Planktonic and Biofilm Bacteria of Canine Dental Tartar Isolates. *Acta Scientiae Veterinariae.* 42: 1-6.

- Marmonier A.A, 1990**, Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, techniques usuelles. DOIN édition, Paris, France. 227-236.
- Marsh PD, Martin MV, Lewis MA, Williams D. 2009**. Oral Microbiology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. 5-17.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. 2011**. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology* 2000. 55:16-35.
- Marsh PD. 2003**. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149: 279-294.
- Mathur T, Singhal S, S Khan S, DJ Upadhyay DJ, T Fatma T, Rattan A. 2006**. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 24 : 25-29
- Matsushita K, Nisizawa T, Nagaoka S, Kawagoe M, Koga T. 1994**. Identification of Antigenic Epitopes in a Surface Protein Antigen of *Streptococcus mutans* in Humans. *Infection and immunity.* 62: 4034-4042.
- Mekawey AI, Mokhtar MM, Farrag MR. 2009**. Antitumor and Antibacterial Activities of [1-(2-Ethyl, 6-Heptyl) Phenol] from *Cuminum Cyminum* Seeds. *Journal of Applied Sciences Research.* 5: 1881-1888.
- Melgarejo P. 1993**. Selección y tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.). Thèse de doctorat : Univ Politecnica de Valencia (UPV), Valencia (Spain). P 617.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. 2013**. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 9:e1003616.
- MF Zarco, TJ Vess, GS Ginsburg. 2012**. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases.* 18: 109-120.
- Middha SK, Talambedu U, Pande V. 2013**. HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences.* 3: 296236.
- Miguel M.G, Neves M.A, Antunes M.D. 2010**. Pomegranate (*Punica granatum* L.):A medicinal Plant with Myriad Biological Properties—A Short Review. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4 : 2836-2847.
- Milan KSM, Dholakia H, Tiku KP, Vishveshwaraiah P. 2008**. Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cyminum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient. *Food Chem.* 110: 678-683.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. 2004**. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: 231-237.
- Miller MB, Bassler BL. 2001**. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology.* 55: 165- 199.
- Mirdehghan SH, Rahemi M. 2007**. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae.* 111 : 120-127.
- Mladenović KG, Muruzović MŽ, Žugić-Petrović TD, Čomić LR. 2018**. The influence of environmental factors on the planktonic growth and biofilm formation of *Escherichia coli*. *Kragujevac J. Sci.* 40: 205-216.
- Mohamed JA and Huang DB. 2007**. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology.* 56: 1581-1588.
- Mohammad SM, Kashani HH. 2012**. Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. *Journal of Medicinal Plants Research.* 6: 5306-5310.
- Mohammedi Z, Atik F. 2011**. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter J Pharma Bio Sci.* 2: 609-615.

- Morand C, Milenkovic D.** 2014. Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*. 42 : 47-62.
- Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM.** 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25: 361-366.
- Moufida R.** 2006. Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Mémoire de Magister : Université Mentouri, Constantine (Algérie). P 95.
- Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM.** 2001. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*. 34: 103-109.
- Mudgil D, Barak S.** 2019. Chapter 2 - Classification, Technological Properties, and Sustainable Sources. *Dietary Fiber: Properties, Recovery, and Applications*. P 27-58.
- Mundula T, Ricci F, Barbetta B, Baccini M, Amedei A.** 2019. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 11 : 2449.
- Muylaert A, Mainil JG.** 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* 156 : 109- 123.

N

- Nacz M, Sahidi F.** 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. 1054: 95- 111.
- Naeini A, Jalayer Naderi N, Shokri H.** 2014. Analysis and in vitro anti-Candida antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic Candida strains. *J Mycol Med*. 24: 13–18.
- Nagasawa R, Sato T, Senpuku H.** 2017. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. *Appl Environ Microbiol*. 83:e00869-17.
- Napagoda MT, Sundarapperuma T, Fonseka D, Amarasiri S, Gunaratna P.** 2018. An Ethnobotanical Study of the Medicinal Plants Used as Anti-Inflammatory Remedies in Gampaha District, Western Province, Sri Lanka. 2018: 1-8.
- Nasreddine S, Mcheik A, Al-Seblani MA, Shahrour H, Hammoud M, Chokr A.** 2018. Influence of the Extractive Method of *Punica granatum* Peels in its Antibacterial and Antibiofilm Activities Against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*. 4 : 133-141.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).** 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard M2-A7. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA*.
- Neurath R, Strick N, Li YY, Debnath AK.** 2005. *Punica granatum* (Pomegranate) Juice Provides an HIV-1 Entry Inhibitor and Candidate Topical Microbicide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1056: 311-327.
- Nicolas GG, Lavoie MC.** 2011. *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Rev. can. microbiol.* 57: 1-20.
- Noble SL.** 2012. *Clinical Textbook of Dental Hygiene and Therapy*. (2nd edn), Wiley-Blackwell, West Sussex p. 96-97.
- Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R, Fartashvand M.** 2018. Antibacterial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed and Peel Alcoholic Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Health Centers. *J Appl Biotechnol Rep*. 5: 32-36.

O

- O'Toole GA, Kaplan H, Kolter R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Oguntibeju OO.** 2018. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J Inflamm Res.* 11: 307-317.
- Oh SK, Chang HJ, Chun HS, Kim HJ, Lee N.** 2015. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract Inhibits Quorum Sensing and Biofilm Formation Potential in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 43 : 357-366.
- Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemot TK.** 2008. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal–oral trafficking of the bacteria. *Journal of Medical Microbiology.* 57: 95-99.
- Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV.** 2003. Anti-inflammatory activity of plants. *Journal of Natural Remedies.* 3: 01-30.
- Oktyabrsky O, Vysochina G, Muzyka N, Samoiloza Z, Kukushkina T, Smirnova S.** 2009. Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems. *Journal of Applied Microbiology.* 106 : 1175-1183.
- Olaokun OO, Mkolo NM, Mogale MA, King PH.** 2017. Phytochemical Screening, Antioxidant, Anti-inflammatory and Glucose Utilization Activities of Three South African Plants Used Traditionally to Treat Diseases. *Biol Med.* 9: 412.
- Oliveira PV, Ribeiro AM, Kerber, Lessa G, Viana MSS.** 2013. Late Quaternary caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Ceara State, Northeast Brazil. *Journal of Cave and Karst Studies.* 75: 81-91.
- Omwenga EO, Hensel A, Pereira S, Shitandi AA, Goycoolea FM.** 2017. Antiquorum sensing, antibiofilm formation and cytotoxicity activity of commonly used medicinal plants by inhabitants of Borabu sub-county, Nyamira County, Kenya. *PLoS ONE* 12(11): e0185722.
- Osama YA, Ahmed H, Tarawneh K, Khleifat MK, Ridzwan BH, Qaralleh N.** 2010. Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Process Biochemistry.* 45: 581-585.
- Oyaizu M.** 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidant Activities of Products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr.* 44: 307-315.

P

- Pagliarulo C, De Vito V, Picariello G, Colicchio R, Pastore G, Salvatore P, Grazia Volpe M.** 2016. Inhibitory Effect of Pomegranate (L.) Polyphenol Extracts on the Bacterial Growth and Survival of Clinical Isolates of Pathogenic *Staphylococcus aureus* and. *Food Chem.* 190: 824-831.
- Pai MB, Prashant G, Murlikrishna KS, Shivakumar KM, Chandu GN.** 2010. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an *in vitro* study. *Indian J Dent Res.* 21: 334-336.
- Pande G, Akoh CC.** 2016. Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars.* Chapter 26: 667-689.
- Pandey KB, Rizvi SI.** 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2: 270-278.

- Pandey S, Patel MK, Mishra A, Jha B.** 2015. Physio-Biochemical Composition and Untargeted Metabolomics of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Make It Promising Functional Food and Help in Mitigating Salinity Stress. PLoS ONE jour. 10 : e0144469.
- Pappas P.** 2006. Invasive candidiasis. Infect. Dis. Clin. North. Am. 20: 485-506.
- Parejo I, Viladomat TF, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C.** 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants, J Agric. Food .Chem. 5: 6882-6884.
- Parekh J, Chanda S.** 2007. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. African Journal of Biomedical Research. 10: 175-181.
- Pascal ADC, Bothon FTD, Bossou AFAD, Kanfon RE, Wotto DV, Sohounhloue CKD.** 2018. Secondary Metabolites of Plants and Their Impact on Health: Case of Polyphenols (A Review).The Pharmaceutical and Chemical Journal. 5: 54-66.
- Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S.** 2015. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. Front. Microbiol. 6:1391.
- Pedriali A, Fernandes AU, Santos P, Silva MM, Severino D, Dilva MB.** 2010. Antioxidant activity, cito and phototoxicity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed pulp extract. Cienc. Tecnol. Aliment. 30 :1017-1021.
- Pellas G.** 2017. Usage de la phytothérapie dans le traitement des principales pathologies des chevaux de sport. Thèse doctorat. Vetagro Sup Campus Veterinaire de Lyon. France. P 173.
- Pellat B, Miller C, Guez D.** 2002. Plaques bactériennes dentaires : approche biochimique. Potentiels cariogène et parodontopathogène. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Odontologie. 23-010-A-15. 12 p.
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small S.A.** 2007. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 14 :5638-5643.
- Pereira C, Mapuskar K, Rao CV.** 2006. Chronic toxicity of diethyl phthalate in male Wistar rats—A dose-response study. Regul. Toxicol. Pharm. 45: 169-177.
- Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al.** 2008. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol 53:755-764.
- Perez C, Paul M, Bazerque P.** 1990. Antibiotic assay by agar well diffusion method. Acta Biol Med Exp. 15: 113-115.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J.** 2010. Flavonols and cardiovascular disease. Molecular Aspects of Medicine. 31 : 478-494.
- Perkowski K, Chomicz L, Starościk B, Zadurska M, Szalwiński M, Zawadzki P, et al.** 2012. Occurrence of pathogenic bacteria in the oral cavity of the orthodontic patients requiring surgical treatment. Stomatol Współcz. 19: 8-13.
- Perron NR, Brumaghim JL.** 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. Cell Biochem Biophys. 53:75-100.
- Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, et al.** 2012. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. Microbiology. 158: 2975-2986.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day SC.** 2005. Ndiaye The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull, World Health Org. 83 : 661-669.
- Petkova V, Hadzhieva B, Nedialkov P.** 2019. Phytotherapeutic approaches to treatment and prophylaxis in pediatric practice. Pharmacia. 66: 115-119.

- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007.** Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews.* 20: 1133-1163.
- Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr Murray BE, Inouye RT. 2004.** Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis.* 190: 967-970.
- Pillay SR, Roy A, Rajeshkumar S, Lakshmi T. 2019.** Antimicrobial activity of turmeric, cumin, and ginger oil on oral pathogens. *Drug Invention Today.* 11 : 1106-1109.
- Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. 2004.** Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 52: 1177-1180.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. 1998.** Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 36 : 2093-2095.
- Ponce AG, Fritz R, Del Valle CE, Roura SI. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel- Wissenschaft und – Technologie.* 36: 679-684.
- Ponnusamy S, Ravindran R, Zinjarde S, Bhargava S, Kumar A. 2010.** Evaluation of traditional indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011 : 515-647.
- Prakas E, Gupta DK. 2014.** Cytotoxic Activity of Ethanolic Extract of *Cuminum cyminum* Linn Against Seven Human Cancer Cell Line. *Universal Journal of Agricultural Research.* 2: 27-30.
- Prashanth D, Asha MK, Amit A. 2001.** Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 72 : 171-173.
- Price, ML, Van Scoyoc S, Butler LG. 1978.** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.* 26 :1214-1218.
- Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. 2007.** Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J. Periodontol.* 78: 677-682.

Q

- Qamar Abbas S, Zara B, Rizwan S, Tahir Z. 2018.** Nutritional and Therapeutic Properties of Pomegranate. *Scho J Food & Nutr.* 1 :115-120.
- Qu W, Zhongli P, Haile M. 2010.** Extraction modeling and activities of antioxidants from Pomegranate marc. *Journal of Food Engineering.* 99: 16-23.
- Queralt AV, Regueiro J, Huelamo MM, Alvarenga JFR & Leal LN. 2014.** A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry.* 154 : 299–307.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011.** Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 : 586 - 621.
- Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E , Jauregizar N, Eraso E. 2019.** Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 24: 172-180.

R

- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. 2015.** Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 7 : 647-671.

- Rahman M, Nurul Islam M, Shahnoor Hossain M.** 2015. Isolation and Identification of oral Bacteria and Characterization for Bacteriocin Production and Antimicrobial Sensitivity. *J. Pharm. Sci.* 14: 103-109.
- Rajan S, Mahalakshmi S, Deepa VM, Sathya K, Shajitha S, Thirunalasundari T.** 2011. Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3 :82-88.
- Rasines-Perea Z, Teissedre PL.** 2017. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules.* 22: 68.
- Rautemaa R, Hietanen J, Niissalo S, Pirinen S, Perheentupa J.** 2007. Oral and oesophageal squamous cell carcinoma--a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I). *oral oncol.* 43:607-613.
- Reguieg YA, Hammadi K.** 2017. Enhancement of the Bark of *Punica granatum* Fruit through the Phytochemical and Antimicrobial Activity Studies. *Med Aromat Plants (Los Angel)* 6: 282.
- Rezaire A.** 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. P 208.
- Ribeiro SM, Cardoso MH, de Souza Cândido E, Franco OL.** 2016. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol.* Future Microbiol. 11 :527-538.
- Ribéreau-Gayon P.** 1982. The anthocyanins of grapes and wines. In: Markakis, P., Ed., Anthocyanins as Food Colors, Academic Press, New York, 209-244.
- Richardson JP, Ho J, JNaglik JR.** 2018. *Candida*–Epithelial Interactions. *J. Fungi.* 4 : 22.
- Robards K.** 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A.* 1000: 657-691.
- Roberts FA, Darveau RP.** 2015. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontology* 2000. 69: 18-27.
- Román C, Rivera A, Santellan R, Teutle B, Yañez A, Cedillo L, Giono S.** 2013. Immunogenic Antigens from *Streptococcus mutans* Which Stimulate Secretory Iga Response from Parotid Saliva in Children with Caries. *World Applied Sciences Journal.* 28 : 297-303.
- Rosas-Burgos EC, Burgos-Hernández A, Noguera-Artiaga L, Kačániová M, Hernández-García F, Cárdenas-López JL, Carbonell-Barrachina AA.** 2017. Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel Extracts as Affected by Cultivar. *J Sci Food Agric Actions.* 97: 802-810.
- Roudsari MH.** 2007. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from canola meal, M.Sc. these de doctorat: Université de Saskatchewan, Saskatoon (USA).
- Roustakhiz J, Raissi A.** 2017. Properties, cultivation method and requirements of cumin (*Cuminum cyminum* L.) - an overview. *Intl J Farm & Alli Sci.* 6: 24-29.
- Roux A, Ghigo JM.** 2006. Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét. France* - Tome 159 - N°3.
- Rozkiewicz D, Daniluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Luczaj-Cepowicz E, Milewska R, Marczuk-Kolada G, Stokowska W.** 2006. Bacterial composition in the supragingival plaques of children with and without dental caries. *Adv Med Sci.* 51:182-6.
- Russo P, Hadjilouka A, Beneduce L, Capozzi V, Paramithiotis S, Drosinos EH, Spano G.** 2018. Effect of Different Conditions on *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation and Removal. *Czech J. Food Sci.*36: 208-214.
- Rutherford ST, Bassler BL.** 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2: a012427.

S

- Sadegi N, Oveisi MRJ, Photovat M.** 2009. Antioxidant activity of Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed extracts. *J. Agri. Sci. Tech.* 11 : 633-638.
- Saei Y, Dadashi M, Eslami G, Goudarzi H, Taheri S, Fallah F.** 2016. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Cuminum cyminum* Essential Oil and Extract against Bacterial Strains Isolated from Patients with Symptomatic Urinary Tract Infection. *Novel Biomed.* 4:147-52.
- Sagdic O, Ozcan M.** 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control.* 14: 141-143.
- Saigal S, Bhargava A, Mehra SK, Dakwala F.** 2011. Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions. *Contemp Clin Dent.* 2: 188-193.
- Sajid ZI, Anwar F, Shabir G, Rasul G, Alkharfy KM, Gilani AH.** 2012. Antioxidant, antimicrobial properties and phenolics of different solvent extracts from bark, leaves and seeds of *Pongamia pinnata* (L.) pierre. *Molecules.* 17: 3917-3932.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F.** 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76: 270-276.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 74:5463-5467.
- Santos M, Gonçalves É.** 2016. Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Scientia Agropecuaria.* 7 : 7 - 14 .
- Saxena R.** 2012. Studies on Active Ingredients of *Punica granatum* and *Mimosa hamata* Plant Extracts and Their Antimicrobial Activity. Thèse doctorat: Jayoti Vidyapeeth Women's University Jaipur, Rajasthan (India).
- Scalbert A.** 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 30: 3875-3883.
- Scherer R, Godoy HT.** 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry.* 122 : 654-658.
- Secci G.** 2006. Manuel d'hygiène bucco-dentaire, Destiné à la formation de prophylaxistes, SDI 2006 / 2007, Ed. n°1.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D.** 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J.Nutr. Biochem.* 16: 360-367.
- Seeram NP, Zhang Y, Reed JD, Krueger CG, Vaya J.** 2006. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine, CRC press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.
- Seigler DS, Seilheimer S, Keesy J, Huang HF.** 1986. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic botany.* 40: 220- 232.
- Selvamohan T, Ramadas V, Shibila S, Kishore S.** 2012. Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *Advances in Applied Science Research.* 3 :3374-3381.
- Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E.** 2017. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 22 :282-288.
- Senadheera D, Cvitkovitch DG.** 2008. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Advances in experimental medicine and biology.* 631:178-188.
- Shabir G, Anwar F, Sultana B, Khalid ZM, Afzal M, Khan QM, Ashrafuzzaman M.** 2011. Antioxidant and antimicrobial attributes and phenolics of different solvent extracts from leaves, flowers and bark of gold mohar [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.]. *Molecules.* 16: 7302-7319.

- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H.** 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7749-7759.
- Sharma P, Mc Clees SF, Afaq F.** 2017. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update *Molecules*. 22: 177.
- Sharma SS, Jajoria DK, Sharma RP, Rao SS.** 2019. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) cultivation in Rajasthan as an opportunity- A soil and climatic suitability evaluation. *Adv. Biores.* 10 :05-11.
- Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh SDA.** 2008. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Natural Product Research*. 22 : 429-440.
- Shehu A, Salwani Ismail S, Rohin MAK, Harun A, Aziz AA, Haque M.** 2016. Antifungal Properties of Malaysian Tualang Honey and Stingless Bee Propolis against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 : 44-50.
- Shinde PA, Reddy VKS, Patange SB.** 2015. Quality of Indian mackerel as affected by pomegranate peel and tea leaf extracts during ice storage. *SAARC J. Agr.* 13: 109-122.
- Shumi W, Lim J, Nam SW, Lee K, Kim SH, Kim MH, Cho KS, Park S.** 2010. Environmental factors that affect *Streptococcus mutans* biofilm formation in a microfluidic device mimicking teeth. *BioChip J.* 4: 257-263.
- Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz, C, Rodrigues AG.** 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. *Front. Microbiol.* 6 : 205.
- Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF.** 2010. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed- species communities. *Infect Immun.* 78: 4644-4652.
- Singh N, Patil A, Prabhune A, Goel G.** 2016. Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology.* 162 : 1708-1714.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ.** 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 417: 552-555.
- Singh RP, Gangadharappa HV, Mruthunjaya K.** 2017. *Cuminum cyminum* – A Popular Spice: An Updated Review. *Pharmacogn J.* 2017. 9: 292-301.
- Singh S, Immanuel G.** 2014. Extraction of Antioxidants from Fruit Peels and its Utilization in Paneer. *J Food Process Technol.* 5: 349.
- Siow HL.** 2018. Isolation, characterization and identification of anti-amylase peptides from cumin seeds (*Cuminum cyminum*). Thèse doctorat: Universiti sains Malaysia (Malaysia). P 25.
- Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kovác J, Mucaji P.** 2016. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules.* 21 : 1717.
- Soares, AA, Marques de Souza CG, Daniel FM, Ferrari GP, Gomes da Costa SM, and RM Peralta.** 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry.* 112: 775-781.
- Soleymani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S, Derakhshan.** 2010. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria. *Iranian Journal of Medical Microbiology.* 4: 26-34.
- Sonkusale KS, Tale VS.** 2015. Isolation and Characterization of Biofilm Forming Bacteria from Oral Microflora. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2: 118-127.
- Soraya C, Mubarak Z, Gani BA.** 2020. The growth and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in ethanol extract of *Citrus aurantiifolia* Indonesian species. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research.* 8 : 558-568.
- Souza JGS, Cury JA, Ricomini Filho AP, Feres M, de Faveri M, Barão VAR.** 2019. Effect of sucrose on biofilm formed in situ on titanium material. *J Periodontol.* 90:141-148.

- Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Mohammed Azeez J, Sreeharshan S.** 2014. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *Bio Med Research International*. 2014: 1-12.
- Sreela LS, John B, Sandhya K.** 2017. The Effects of a Chronic Nail Biting Habit on the Oral Carriage of Enterobacteriaceae and the Study of the Antibiotic Resistance Pattern of the Isolates. *Ann. Int. Med. Den. Res.* 3: 19-22.
- Srinivasan K.** 2018. Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (*Nigella sativa*) seeds: traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. *Food Quality and Safety*. 2: 1-16.
- Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale.** Selon les recommandations de l'OMS. 2005. 4^{ème} édition. Algérie.
- Staszewski MV, Rosa J, Pilosof A.** 2011. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. *Food Hydrocolloids*. 25:1077-1084.
- Steinberg D, Friedman M.** 2000. Development of sustained release devices for modulation of dental plaque biofilm and treatment of oral infectious diseases. *Drug Development Research*. 50: 555-565.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM.** 1998. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology*. 85:19S-28S.
- Sun B, da Silva JR and Spranger I.** 1998b. Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4267-4274.
- Sun T, Ho CH.** 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*. 90: 743-749.
- Sybiya Vasantha Packiavathy IA, Agilandeswari P, Khadar Syed Musthafa KS, Pandian SK, Ravi AV.** 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*. 45 : 85–92.
- Sztukowska M N, Ojo A, Ahmed S , Carenbauer AL , Wang Q , Shumway B , Jenkinson HF , Wang H , Darling DS, Lamont RJ.** 2016. *Porphyromonas gingivalis* initiates a mesenchymal-like transition through ZEB1 in gingival epithelial cells. *Cell. Microbiol*. 18: 844-858.

T

- Takahashi N.** 2005. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*. 1284 :103 -112.
- Takane VV, Jatti R, Bhat K, Keshan D, Keluskar K, et al.** 2018. Microbiological Evaluation of Biofilm Formation on the Fixed Twin Block Appliance: A Clinical Trial. *Int J Oral Dent Health*. 4:066.
- Tashtoush SH, Ereifej KI, Feng H, Rababah TM, Al-U'datt MH, Gammoh S, Al-Rabadi GJ.** 2016. Temperature and Acidified Solvent Effect on Total Anthocyanins and RP-HPLC Phenolic Acids Determination in Selected Spices. *Food and Nutrition Sciences*. 7: 20-29.
- Tayel AA, El-Tras WE, Moussa SH, El-Sabbagh SM.** 2012. Surface decontamination and quality enhancement in meat steaks using plant extracts as natural biopreservatives. *Food Borne Path. Dis*. 9: 755-761.
- Teixeira J, Gaspar A, Garrido ME, Garrido J, Borges F.** 2013. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int*. 2013: 251754.
- Tezal M, Scannapieco FA, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Genco RJ.** 2006. Supragingival Plaque May Modify the Effects of Subgingival Bacteria on Attachment Loss. *J Periodontol*. 7 :808- 813.

Thippeswamy NB, Naidu KA. 2005. Antioxidant potency of cumin varieties; cumin, black cumin and bitter cumin on antioxidant systems. *European Food Research and Technology*. 220: 472-476.

Thitipramote N, Maisakun T, Chomchuen C, Pradmeeteekul P, Nimkamnerd J, Vongnitorn P, Chaiwut P, Thitilertdecha N, Pintathong P. 2019. Bioactive Compounds and Antioxidant Activities from Pomegranate Peel and Seed Extracts. *Food and Applied Bioscience Journal*. 7: 152-161.

Tonomura S, Naka S, Tabata K, Hara T, Mori K, Tanaka S, Sumida Y et al. 2019. Relationship between *Streptococcus mutans* expressing Cnm in the oral cavity and non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *BMJ Open Gastro*. 6: e000329.

Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech*. 43: 632-639.

Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 12: 484-496.

V

Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto MHP. 2006. Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) Gel Against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J*. 17: 223-227.

Vasconcelos LC S, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. 2003. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Verwendung von Punica granatum als Antimykotikum gegen Candidose in Verbindung mit Zahnprothesen-Stomatitis*. *Mycoses*. 46:192-196.

Vasudevan R. 2017. Dental Plaques: Microbial Community of the Oral Cavity. *J Microbiol Exp*. 4: 00100.

Venkadesaperumal G, Chetan KM, Ayaluru M, Prathapkumar HS. 2016. Petunidin as a competitive inhibitor of acylated homoserine lactones in *Klebsiella pneumoniae*. *RSC Adv*. 6: 2592-2601.

Vican P. 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse (Ed). Paris, 355p.

Vijayalakshmi K, Sreedevi P, Venkateswari R. 2017. Phytochemical evaluation of *Punica granatum* L. leaf extract. *Int J Curr Pharm Res*. 9: 14-18.

Vijayalakshmi P, Thenmozhi S, Rajeswari P. 2016. The Evaluation of the virulence factors of clinical *Candida* isolates and the anti-biofilm activity of *Elettaria cardamomum* against multi-drug resistant *Candida albicans*. *Curr Med Mycol*. 2: 8-15.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. 2020. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J. Fungi*. 6: 15.

Virgen-Carrillo CA, Moreno AGM, Miramontes EHV. 2020. Potential Hypoglycemic Effect of Pomegranate Juice and Its Mechanism of Action: A Systematic Review. *J Med Food*. 23 : 1-11.

Viuda-Martos M, Fernandez-Loaez J, Perez-alvarez JA. 2010. "Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9 :635-654.

Vravuthikunchai S, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Hondad T. 2005. Inhibitory Effects of Active Compounds from *Punica granatum* Pericarp on Verocytotoxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of health science* 51: 590-596.

W

Wade WG. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 69 :137-143.

Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis, RJ, Pfaller MA, Ferguson JE, Wenzel RP, Donowitz LG. 1996. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin. Infect. Dis.* 22: 803-808.

Wald E. 2009. Le grenadier (*Punica granatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat: Université Henri Poincaré, NANCY (France).

Wang Z, Pan Z, Ma Hand, Atungulu GG. 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Sci. J.* 5:17-25.

Watabe K, Nishi M, Miyake H, Hirata K. 1998. Life style and gastric cancer: a case-control study. *Oncol.Rep.* 5 : 1191-1194.

Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. 2010. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiology.* 10: 111.

WHO. 2015. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: World Health Organization.

Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. 2016. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathogens and Disease.* 74: 1-6.

Williams D, Lewis M. 2000. Oral Microbiology : Isolation and identification of *Candida* from the Oral Cavity. *Oral diseases.* 6 : 3-11.

Williams D, Lewis M. 2011. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J.Oral Microbiol.* 3: 5771.

Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105: 940-949.

X

Xu X, Chen F, Huang Z, Ma L, Chen L, Pan Y, Xu J, Kim S, Kinane D, Koo H, Zhou X. 2018. Meeting report: a close look at oral biofilms and microbiomes. *Int J Oral Sci.* 10: 28.

Y

Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. 2012. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch. Oral Biol.* 57: 1048-1053.

Z

Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. 2012. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases.* 18: 109-120.

Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. 2009. Defining the healthy 'core microbiome' of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9: 1-12.

Zawadzki PJ, Perkowski K, Starościk B, Baltaza W, Padzik M, Pionkowski K, Chomicz L. 2016. Identification of infectious microbiota from oral cavity environment of various population group patients as a preventive approach to human health risk factors. *Ann Agric Environ Med.* 23: 566-569.

- Zeghad N, Ahmed E, Belkhiri A, Vander Heyden Y, Demeyer K.** 2019. Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*. 5: e 01575.
- Zeghad N.** 2018. Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus indica*. Thèse de doctorat : Université des frères Mentouri, Constantine (Algérie).p 146.
- Ziebuhr W, Lobner I, Krimmer V, Hacker J.** 2001. Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.
- Ziouani S, Kbouche Khelil N, Benyelles I, Hoceini A, Aissaoui N, Nas F, et al.** 2015. Oral microflora of supragingival and subgingival biofilms in Algerian healthy adults. *Afr J Microbiol Res*.9 :48-57.

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture

Composition de M17 (TERZAGHI ET SANDINE, 1975)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Extrait de levure.....	2.5 g
β -glycérophosphate disodique pentahydraté.....	19 g
Sulfate de magnésium hydraté.....	0.25 g
Acide ascorbique.....	0.5 g
Lactose.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml
PH= 7.1± 0.2	

Composition de gélose Chapman

Tryptone.....	5 g
Peptone pepsique de viande.....	5 g
Extrait de viande.....	10 g
Chlorure de sodium.....	75 g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	25 mg
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH=7.4 ± 0.2	

Composition de gélose nutritive

Extrait de levure.....	2 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Peptone.....	5 g
Extrait de viande.....	1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7.1± 0. 2	

Composition de YPD (yeast peptone dextrose)

Peptone.....	20 g
Extrait de levure.....	10 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
PH= 6.5± 0. 2	

Composition de TSA (Tryptic Soy Agar)

Peptone de caséine.....	17 g
Peptone.....	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Hydrogénophosphate dipotassique K_2HPO_4	2.5 g
Glucose	2.5 g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml
PH= 7.3 ± 0.2	

Composition de gélose Mueller Hinton (MH)

Extrait de viande.....	2g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar.....	17 g
Eau distillée.....	1000 ml
PH = 7.3 ± 0.2	

Composition de Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
PH= 6	

Composition du milieu minéral pour la formation de chlamydozoaires

Glucose.....	0.5 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0, 5 g
KH_2PO_4	1g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Un autoclavage de 120°C pendant 20 minutes pour tous les milieux de culture a été réalisé.

Annexe 2

Coloration de Gram

- ✓ Etaler les bactéries sur une lame de verre.
- ✓ Fixation des bactéries par passage de la lame dans la flamme
- ✓ Colorer la lame avec le violet de gentiane pendant 1 minute.
- ✓ Traiter la lame avec du lugol pendant 1 minute.
- ✓ Décolorer la lame avec de l'alcool en les immergeant pendant 15 secondes.
- ✓ Rincer la lame à l'eau.
- ✓ procéder à une contre-coloration avec avec la solution de safranine diluée ou de fuschine diluée pendant 1 minute.
- ✓ Rincer à l'eau et laisser sécher la lame à l'air.
- ✓ Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

Préparation de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6)

Peser 35.6 g/l de phosphate disodique (Na_2HPO_4) (A) et 31.2 g/l de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) (B). Mélanger 26.5 ml de (A) et 73.5 ml de (B) et compléter jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée et ajuster le pH à 6.6.

Annexe 3

Tableau de lecture de l'API 20 Strep

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolactone (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citraate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β -naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α -D-galactopyranoside	0,0376	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GUR	acide naphтол-ASB β -glucuronique	0,0537	β -GIUcRonidase	Incolore		Bleu	
β GAL	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	0,0306	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFfinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMIDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

Tableau de lecture de l'API Candida

TABLEAU DE LECTURE					
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
1) <u>GLU</u>	D-glucose	1,4	acidification (GLUcose)	violet gris-violet	jaune vert / gris
2) <u>GAL</u>	D-galactose	1,4	acidification (GALactose)		
3) <u>SAC</u>	D-saccharose	1,4	acidification (SACcharose)		
4) <u>TRE</u>	D-trehalose	1,4	acidification (TREhalose)		
5) <u>RAF</u>	D-raffinose	1,4	acidification (RAFfinose)		
6) β MAL	4-nitrophényl- β D-maltopyranoside	0,08	β -MALtOsIdase	incolore	jaune pâle-jaune vif
7) α AMY	2-chloro-4-nitrophényl- α D-maltotrioside	0,168	α -AMYlase	incolore	jaune pâle-jaune vif
8) β XYL	4-nitrophényl- β D-xylopyranoside	0,095	β -XYLosIdase	incolore-jaune très pâle / bleu / vert **	jaune pâle-jaune vif
9) β GUR	4-nitrophényl- β D-glucuronide	0,063	β -GLUcURonIdase	incolore / bleu / vert	jaune pâle-jaune vif
10) <u>URE</u>	urée	1,68	UREase	jaune-orange pâle	rouge
11) β NAG (dans tube n° 8) *	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acétyl- β D-glucosaminide	0,09	N-Acétyl- β -GLUcOsaminIdase	incolore / jaune	bleu / vert **
12) β GAL (dans tube n° 9) *	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside	0,0815	β -GALactosIdase	incolore / jaune	bleu / vert

* Les tubes 8 et 9 sont bifonctionnels : tube 8 : β XYL (test n° 8) / β NAG (test n° 11)
tube 9 : β GUR (test n° 9) / β GAL (test n° 12)

** Toute trace verte dans la cupule 8 = β XYL (-) β NAG (+)

• Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

Annexe 4 :

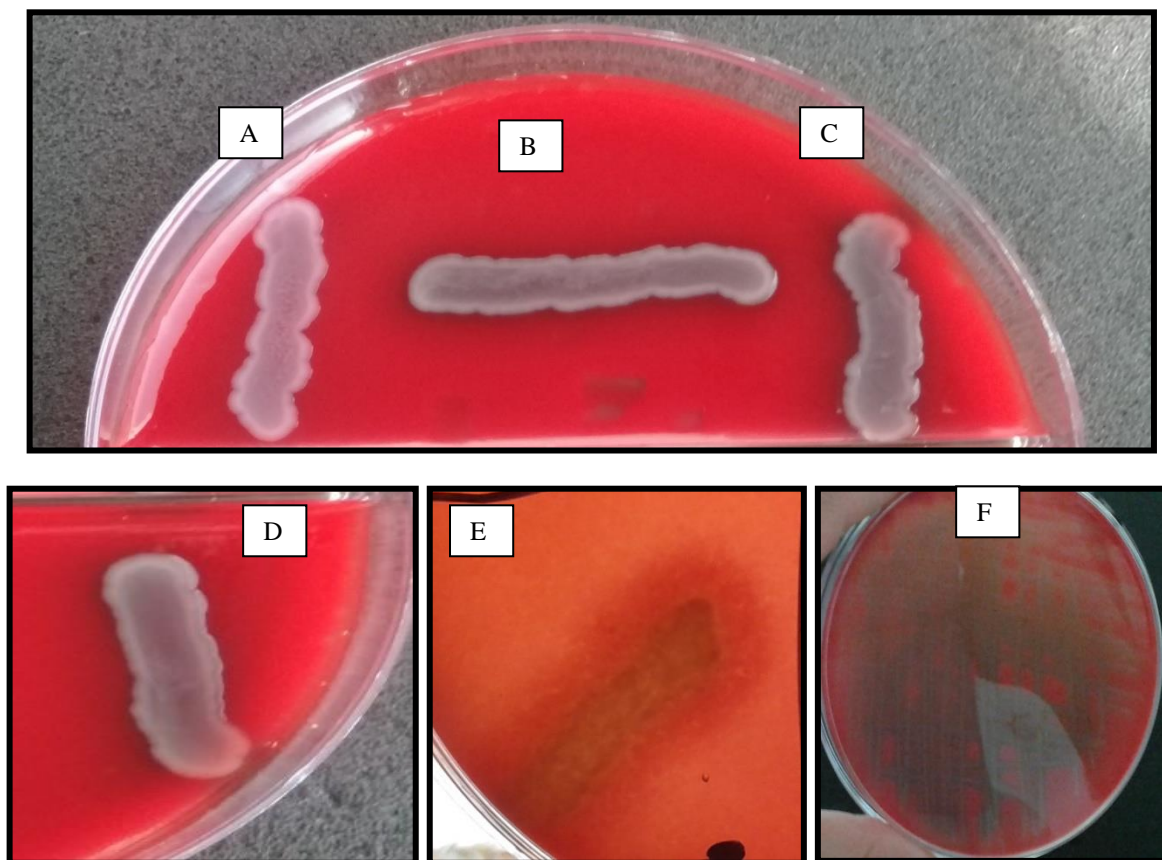
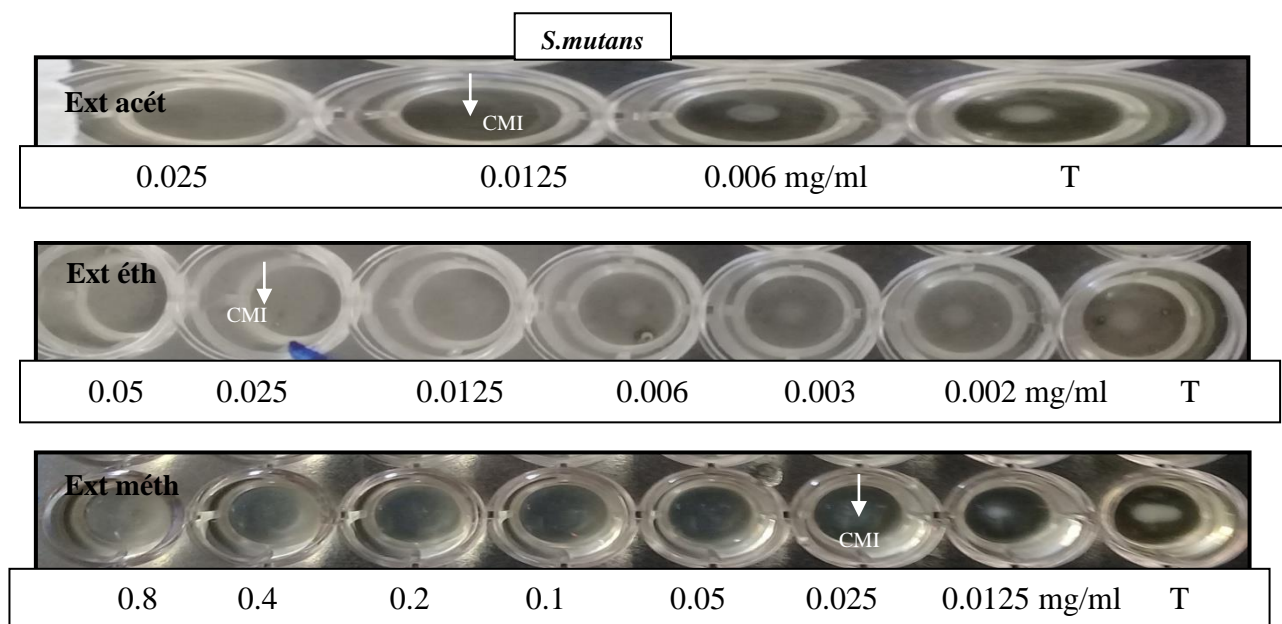
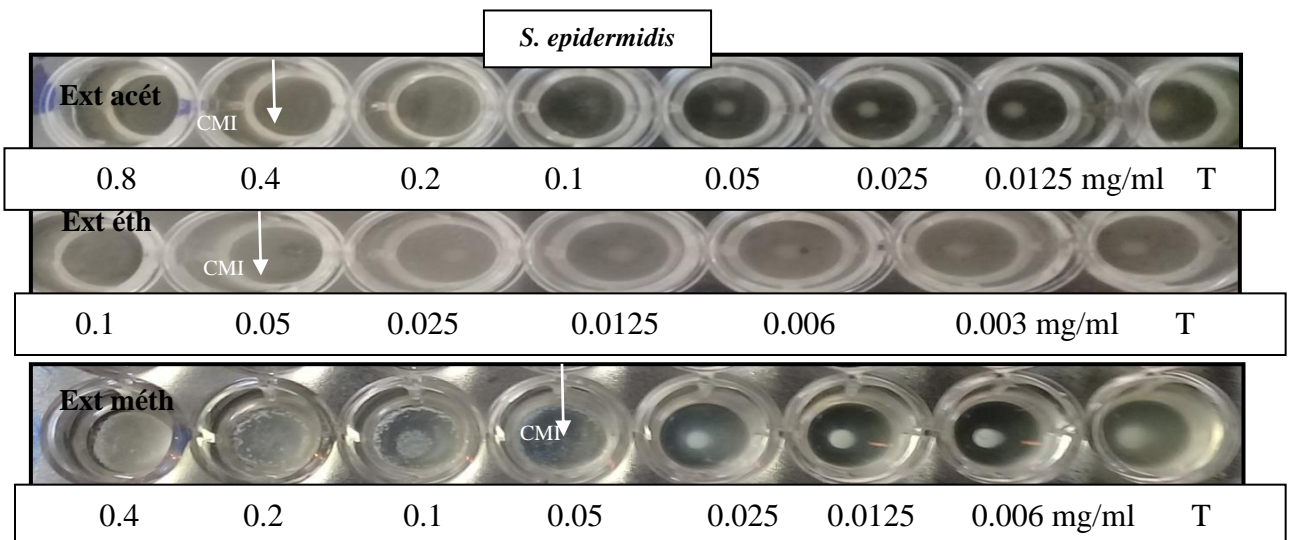
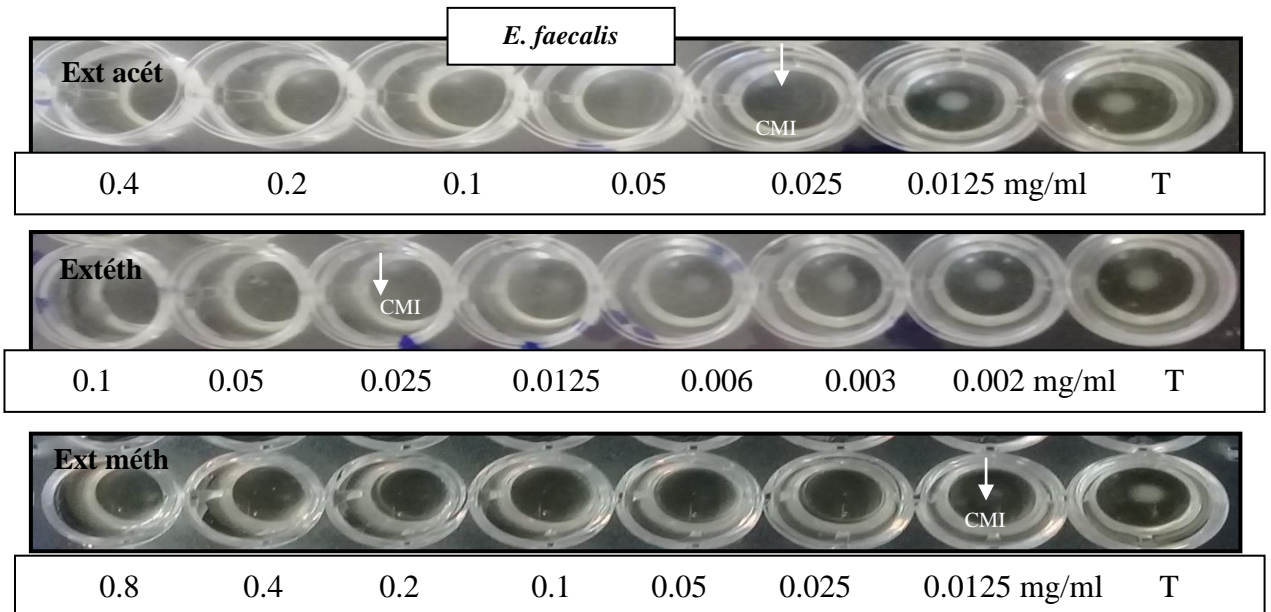
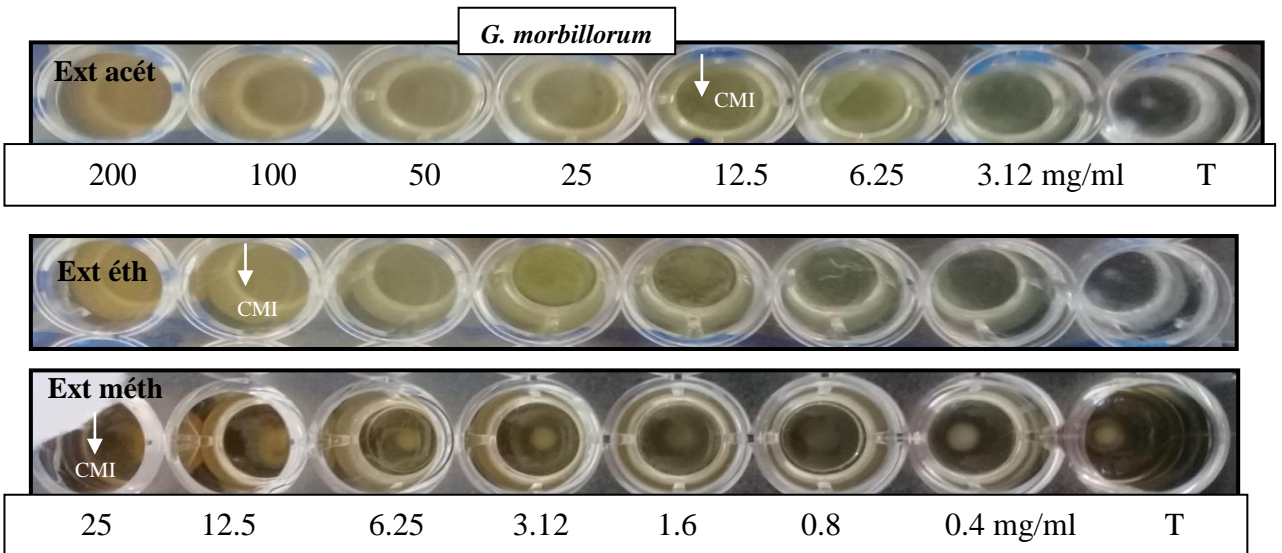
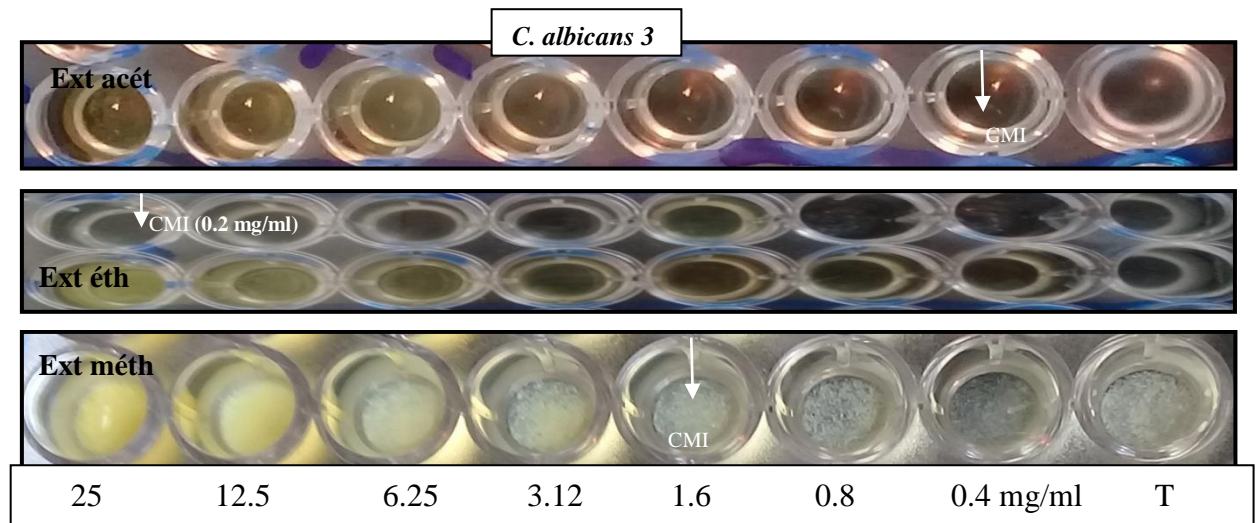
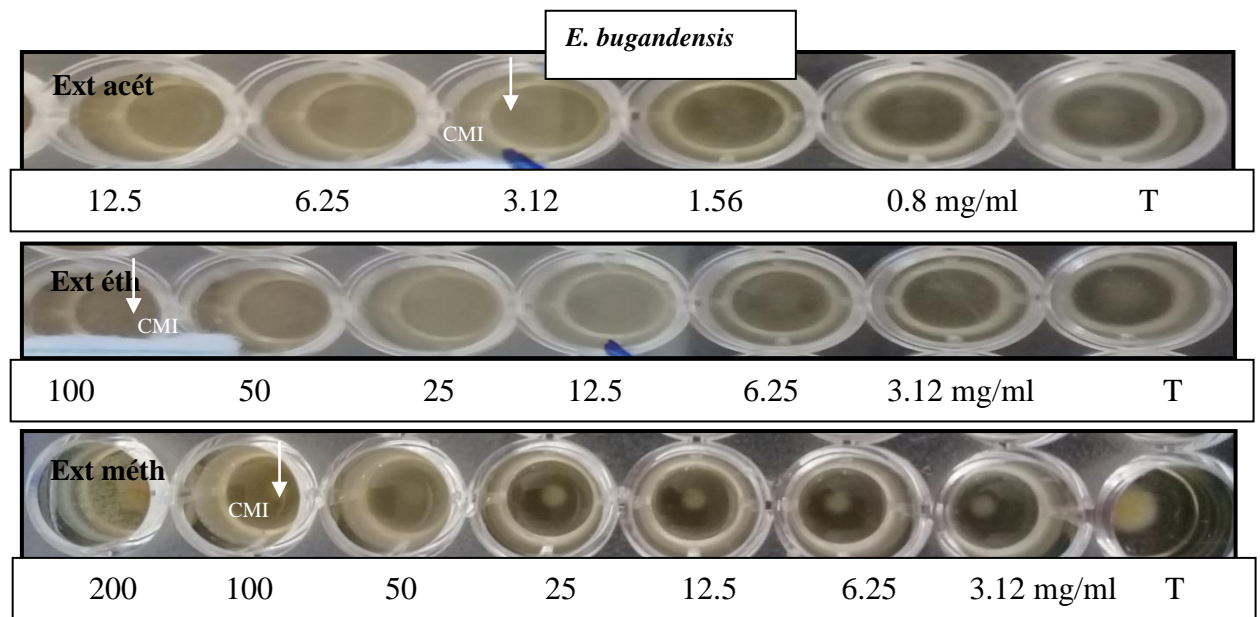
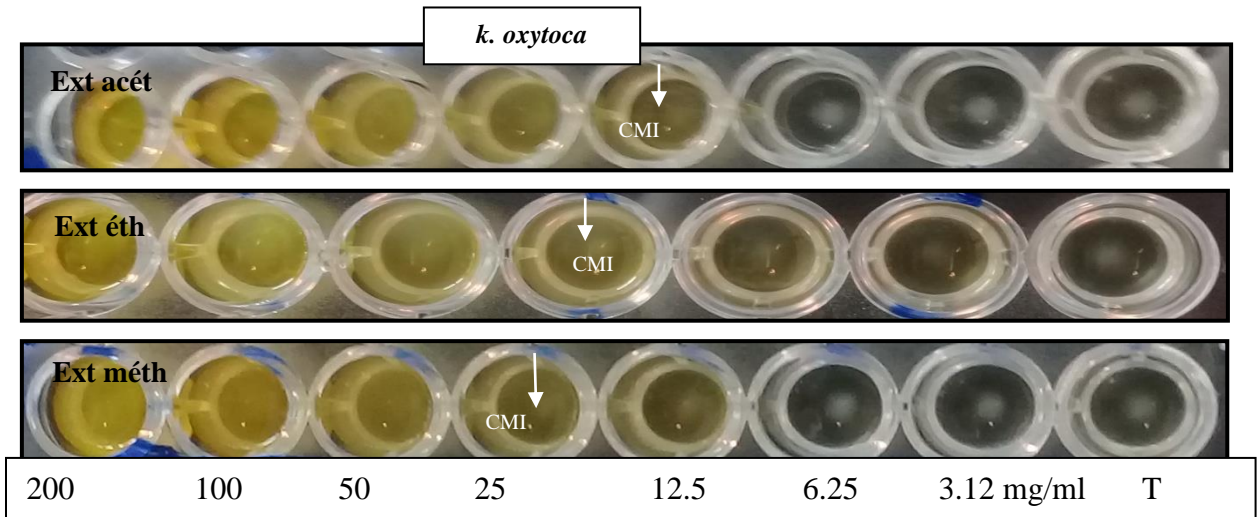


Figure 1. Types d'hémolyse des souches bactériennes sur la gélose au sang. A : *K. oxytoca*, B : *G. morbillorum*, C : *S. epidermidis*, D : *E. bugandensis*, E : *S. mutans*, F : *E. fecalis*.







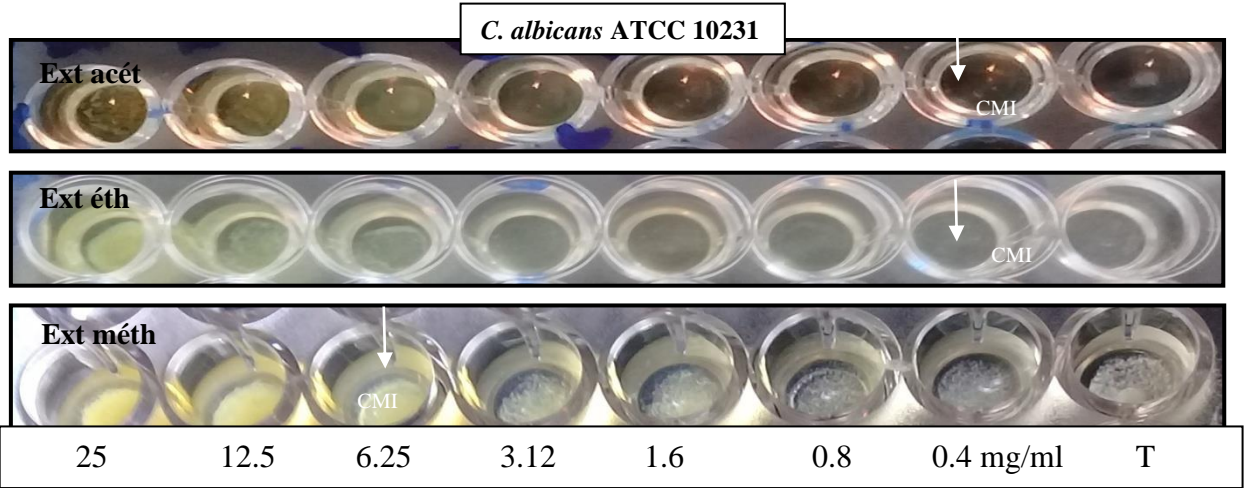
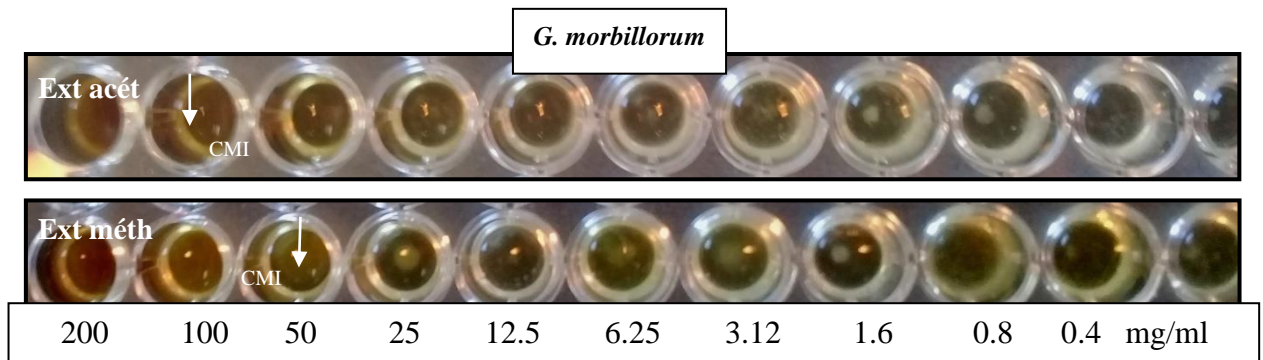
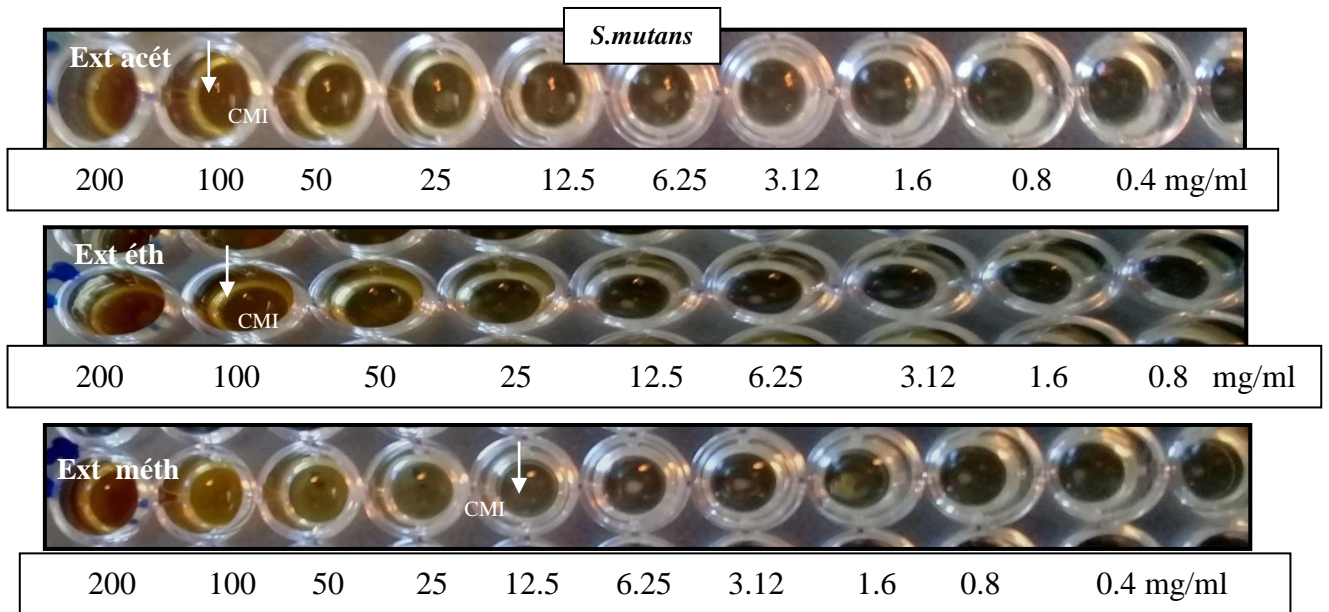
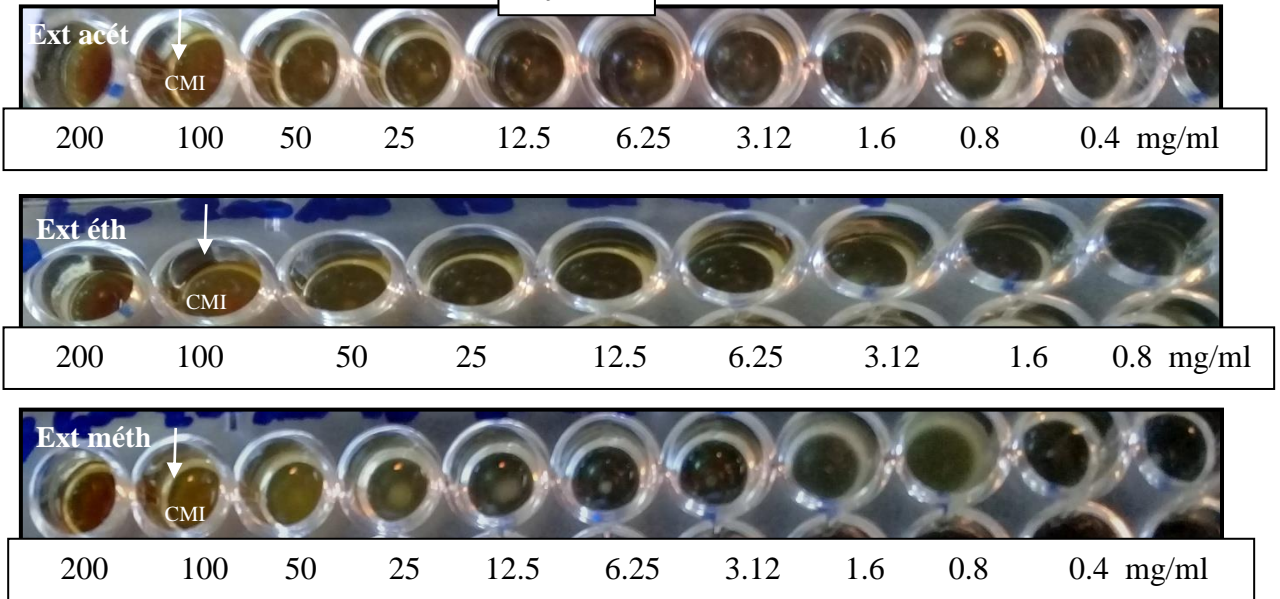


Figure 2. Détermination de la CMI des extraits d'écorces du fruit de *P.granatum* vis-à-vis de certains germes responsables d'infections bucco-dentaires.

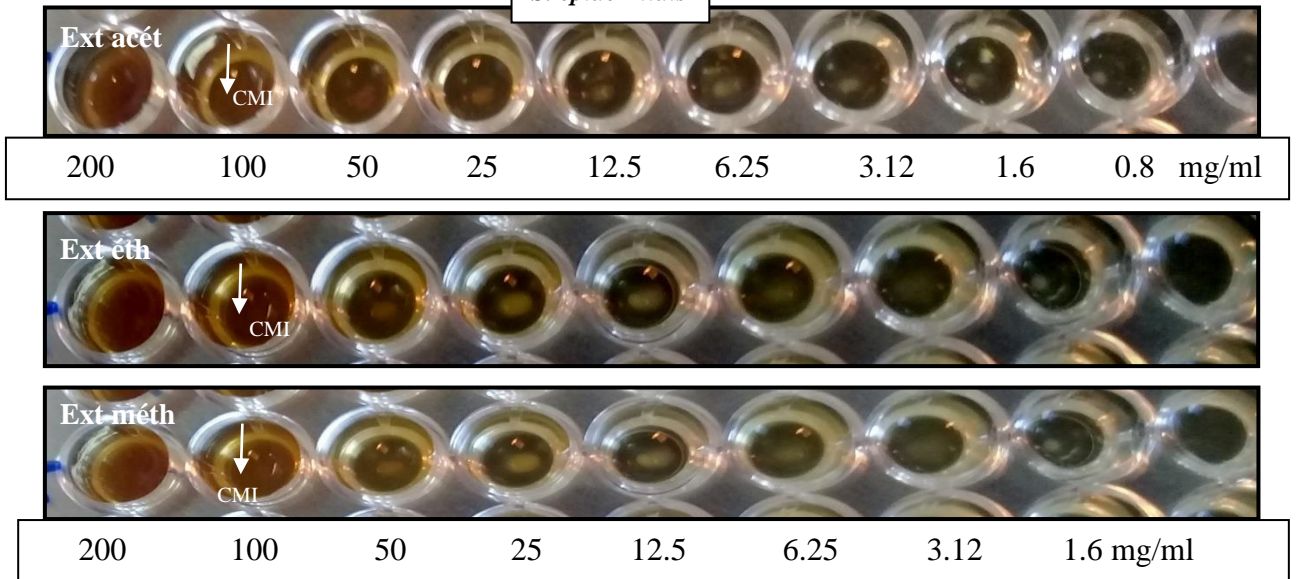
Ext acét: extrait hydro-acétonique ; Ext éth : extrait hydro-éthanolique ; Ext méth : extrait hydro-méthanolique. T : témoin, CMI : concentration minimale inhibitrice.



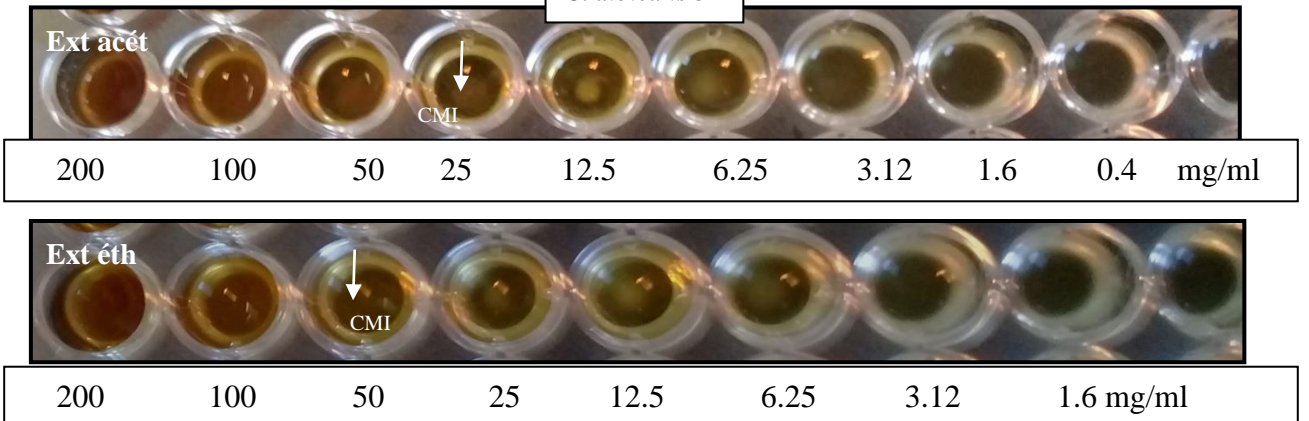
E. faecalis



S. epidermidis



C. albicans 3



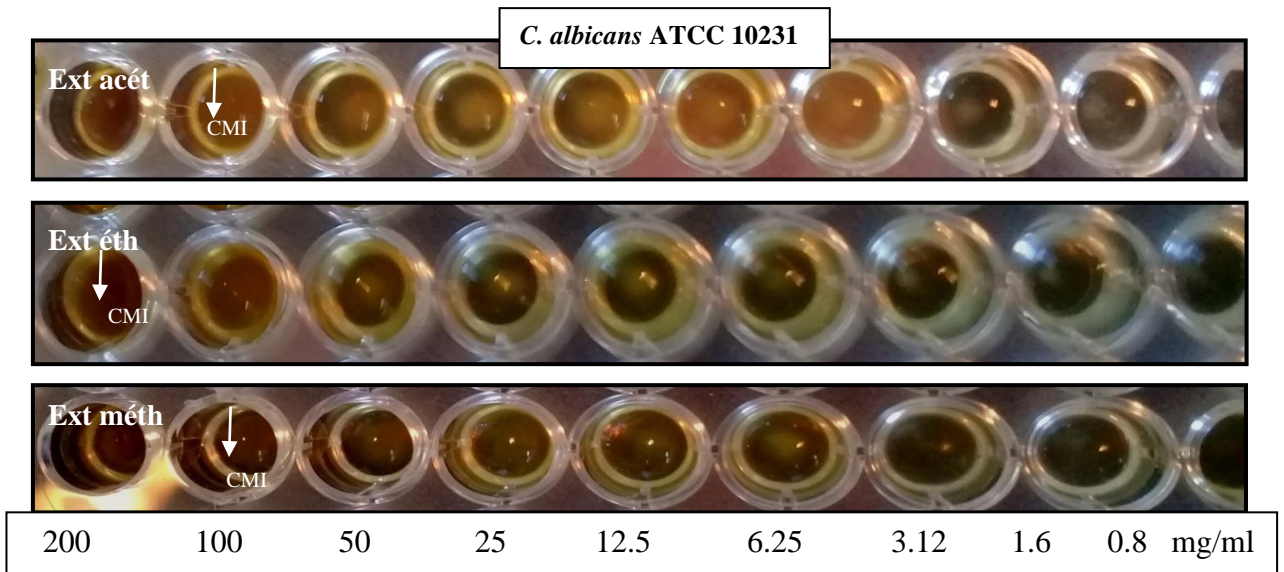


Figure 3. Détermination de la CMI des extraits des graines de *C. cyminum* vis-à-vis de certains germes responsables d'infections bucco-dentaires.

Ext acét : extrait acétonique ; Ext éth : extrait éthanolique ; Ext méth : extrait méthanolique.

*Travaux
scientifiques*

Travaux scientifiques

Communications Nationales :

- BENSLIMANE Sabria et REBAI Ouafa. Activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum*. IX èmes Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem, Algérie), 6 et 7 Novembre 2019.

Communications internationales :

- BENSLIMANE Sabria, REBAI Ouafa et BELKACEM Imane. Screening phytochimique, activité antioxydante et pouvoir antifongique de *Cuminum cyminum*. VIIème congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (Association Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Tabarca-Tunisie), 20 au 23 mars 2019.
- BENSLIMANE Sabria, REBAI Ouafa et ARABI Abed. Effets des solvants d'extractions sur les teneurs en polyphénols, flavonoides, tanins, et sur l'activité antioxydante des grains de *Cuminum cyminum*. Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) (Université de Larbi Tebessi, Tebessa-Algérie), 25 au 27 février 2020.
- BENSLIMANE Sabria, REBAI Ouafa, ARABI Abed. Propriétés antioxydantes, antibactériennes et anti-biofilm des extraits d'écorces du fruit de *Punica granatum* contre les pathogènes oraux *Klebsiella oxytoca* et *Enterobacter bugandensis*. Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) (Université de Larbi Tebessi, Tebessa- Algérie), 25 au 27 février 2020.