

Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 15 Décembre 2023

Par

Charlène LOPES

Etude des tanins hydrolysables comme antimicrobiens naturels dans les produits cosmétiques.

Thèse dirigée par Lengo MAMBU

Examineurs :

Mme. Lengo MAMBU, Professeur des Universités, Présidente

Mme. Marion MILLOT, Maître de Conférences des Universités, Juge

Mme. Carine BEZIVIN, Docteur en Pharmacie, Juge



Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 15 Décembre 2023

Par Charlène LOPES

Etude des tanins hydrolysables comme antimicrobiens naturels dans les produits cosmétiques.

Thèse dirigée par Lengo MAMBU

Examineurs :

Mme. Lengo MAMBU, Professeur des Universités, Présidente

Mme. Marion MILLOT, Maître de Conférences des Universités, Juge

Mme. Carine BEZIVIN, Docteur en Pharmacie, Juge



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} octobre 2023

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
Mme POUGET Christelle	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques
Mme VIANA Marylène	Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme DEMIOT Claire-Élise (*)	Pharmacologie
M. JOST Jérémie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme BEAUBRUN-GIRY Karine	Pharmacie galénique
Mme BÉGAUD Gaëlle	Chimie analytique et bromatologie
M. BILLET Fabrice	Physiologie
Mme BONAUD Amélie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. CALLISTE Claude	Biophysique et mathématiques
M. CHEMIN Guillaume	Biochimie et biologie moléculaire
Mme CLÉDAT Dominique	Chimie analytique et bromatologie
M. COMBY Francis	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme DELEBASSÉE Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. FABRE Gabin	Biophysique et mathématiques
M. LABROUSSE Pascal (*)	Botanique et cryptogamie
Mme LAVERDET Betty	Pharmacie galénique
M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. HAMION Guillaume Pharmacognosie, Botanique et Mycologie

Mme SONDA Amar Chimie analytique et bromatologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew Chargé de cours

Mme VERCELLIN Karen Professeur certifié

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, Madame **Lengo MAMBU**, Professeur des Universités de pharmacognosie, pour avoir accepté de superviser ce travail. Mes remerciements sincères pour vos conseils avisés, votre disponibilité et votre patience. Je suis reconnaissante que vous m'ayez offert l'opportunité de collaborer avec vous lors d'un stage de recherche il y a quelques années, explorant un sujet passionnant alliant pharmacognosie et microbiologie. Cette expérience riche en découvertes a indéniablement contribué à l'émergence de ce sujet de thèse.

Je souhaite également remercier le **Docteur Marion MILLOT** du département de pharmacognosie, qui a accepté de faire partie du jury et pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail. Merci pour la pédagogie dont vous avez fait preuve lors de vos enseignements tout au long de mon cursus de pharmacienne, participant également à mon intérêt pour la pharmacognosie.

Ma profonde reconnaissance au **Docteur Carine BEZIVIN** pour son soutien dans la rédaction de cette thèse, pour ses précieux conseils et son accompagnement constant tout au long de cet exercice. Un grand merci d'avoir accepté de faire partie du jury et de faire le déplacement jusque dans notre belle région du Limousin. Je suis ravie de t'avoir à mes côtés pendant cette soutenance car l'aboutissement de ce travail est en grande partie grâce à toi. Je suis très heureuse d'avoir eu la chance de croiser ton chemin chez Lucas Meyer Cosmetics, tu représentes une véritable source d'inspiration tant sur le plan professionnel que personnel.

Mes remerciements les plus sincères à Monsieur **Alain DELORME** pour avoir été une réelle source de motivation. Merci d'avoir initié nos premières réunions pour discuter de l'avancée de cette thèse, merci pour votre disponibilité et pour votre écoute !

Merci également à toute l'équipe de LMC pour leur soutien et particulièrement à ma très chère collègue **Lucie** pour nos nombreux échanges sur les joies de la rédaction et pour ses encouragements constants ! Un grand merci également à **Aurélie**, dont la bienveillance et les encouragements personnalisés ont été des moteurs essentiels pour moi.

Je souhaite remercier sincèrement mes amis pharmaciens, des rencontres qui ont marquées mes études et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Bientôt 10 ans que vous êtes dans ma vie et j'en suis tellement heureuse !

A commencer par **Anna**, complice des retards de bus impliquant le petit déjeuner dans l'amphi D et de nos cours à forma pas toujours très productifs, merci pour tous ces instants partagés ! Merci également d'avoir été présente, particulièrement lors des moments difficiles et pour toutes tes petites attentions qui te caractérisent si bien.

Je remercie également **Igor**, pour sa bonne humeur, son rire communicatif et son enthousiasme à toute épreuve, même lorsqu'il s'agit d'organiser un voyage à 15 ! Merci de m'avoir toujours encouragé au quotidien mais également au travers de tes « derniers messages d'anniversaire » qui me touchent profondément !

Je remercie chaleureusement **Manon**, un véritable rayon de soleil qui m'a apporté tant de rire avec sa petite touche du sud. Merci pour nos mémorables repas, souvent marqué par une salade thon avocat, qui se prolongeaient tard dans la nuit et que j'ai tellement plaisir à poursuivre maintenant. Merci pour ton soutien, ton écoute et ta présence constante à mes côtés. Merci pour tous ces moments partagés où on refaisait le monde et qui m'ont fait grandir. Aller promis, un jour je te l'offre ta barque !

Enfin, un grand merci à **Sarah**, mon binôme, ma partenaire, avec qui j'ai partagé tant de péripéties ! Les périodes de révision, initialement perçues comme des épreuves, sont maintenant source de souvenirs agréables. Les TUC, le cagibi, le renne, les cookies, et bien d'autres éléments resteront toujours associés à ces moments passés ensemble. Merci de m'avoir toujours épaulée et cette thèse en est un bel exemple. Jusqu'à la fin de nos études, nous achevons cela ensemble !

A tous mes amis qui, par leur présence et leur joie de vivre, m'ont encouragé de près ou de loin pour cette thèse et au cours de mes années d'études : **Cloé, Pauline, Isamara, Caroline, Eva et Jade** merci ! Une attention particulièrement à **Albéric**, pour ses encouragements et son soutien. Même si parfois une soirée consacrée à la rédaction dévie sur des discussions avec pleins d'idées incroyables. Un sincère merci à **Emilien**, pour sa bienveillance et bien sûr, son humour ! Je tiens également à te remercier pour tous tes précieux conseils concernant la thèse, qui ont été source de réconfort et de motivation.

Je remercie également ma famille par alliance, ma famille de cœur : **Pascal, Annick, Aude et Charlotte**. Votre écoute attentive, votre gentillesse et tous vos encouragements ont été une source inestimable de motivation tout au long de cette thèse. Merci du fond du cœur pour votre soutien précieux.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à ma famille ! Tout d'abord, un immense merci à mes parents qui m'ont offert l'opportunité d'étudier. Je remercie très chaleureusement ma **mère**, qui a toujours cru en moi et m'a fourni toutes les conditions nécessaires à la réussite de mes études. Que ce soit tes nombreux déplacements à Limoges ou la touche ensoleillée de ton tableau plein d'énergie, ce ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres ! J'exprime toute ma gratitude à mon **père**, pour ses encouragements, sa positivité et son soutien. Merci beaucoup d'être à mes côtés ! Merci à mon très cher frère **Miguel** dont la simple présence me permettait d'aborder les choses plus sereinement. Merci d'avoir été une source d'inspiration pour moi. Enfin, un grand merci à ma très chère sœur **Mylène**, dont l'importance dans ma vie est fondamentale. Je te remercie du fond du cœur pour tous les petits mots d'encouragements que tu m'as m'envoyé avant chaque examen et qui m'ont donné de la force ! Merci d'être toujours là, de me soutenir et de croire en moi.

Enfin, je terminerai en remerciant très chaleureusement **Charles**, pour son soutien permanent tous au long de ces années d'études qui n'ont pas été un long fleuve tranquille ! Qu'il s'agisse de relire cette thèse jusqu'à 4 heures du matin lors de notre voyage à Venise ou d'une manière générale durant toutes ses nuits blanches où tu m'as épaulé, un immense merci ! Ces dernières années écoulées n'auraient pas été les mêmes sans tes encouragements constants,

ta positivité infaillible, tes conseils avisés et ton écoute attentionnée. A toutes ces DOI et aux innombrables fous rires à en avoir mal aux abdos pendant les périodes de rédaction, j'en garde de précieux souvenirs. C'est l'occasion pour moi de te témoigner à quel point je suis chanceuse de t'avoir dans ma vie. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui sans ta présence à mes côtés.

Je remercie également toutes les personnes qui prendront le temps de lire cette thèse.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ATP : Adénosine TriPhosphate

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CFU : Colony-Forming Unit

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMI₅₀ : Concentration Minimale Inhibitrice qui inhibe 50%

CoA : coenzyme A

CPT : Contenu Phénolique Total

Da : Dalton

DO : Densité Optique

EGCG : Epigallocatechine Gallate

FDA : Food and Drug Administration

GAE : Equivalent en Acide Gallique

HHDP : Hexahydroxydiphénique

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

LOG : logarithme

m-DOG : méta Hexahydroxydiphénoyl Oxygène Galloyl

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

m-GOD : méta Galloyl Oxygène Hexahydroxydiphénoyl

m-GOG : méta Galloyl Oxygène Galloyl

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

RF : Rapport frontal

SCCS : Scientific Committee on Consumer Safety

SCCP : Scientific Committee on Consumer Products

Table des matières

Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges.....	4
Remerciements.....	7
Droits d'auteurs.....	10
Liste des abréviations.....	11
Table des matières.....	12
Table des illustrations.....	14
Table des tableaux.....	16
Introduction.....	18
I. Les produits cosmétiques.....	20
1.1. Définition d'un produit cosmétique.....	20
1.2. Les différents ingrédients composant un produit cosmétique.....	20
1.3. Les conservateurs.....	21
1.3.1. Définition d'un conservateur.....	21
1.3.2. Réglementation Européenne et conservateurs autorisés.....	21
1.3.3. Quels critères pour choisir un conservateur ?.....	22
1.3.4. Evaluation de l'efficacité du système conservateur.....	23
1.3.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
1.3.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
1.3.4.3. <i>Escherichia coli</i>	26
1.3.4.4. <i>Candida albicans</i>	27
1.3.4.5. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	27
1.4. Controverse autour des conservateurs de synthèse.....	28
1.4.1. Les parabènes.....	28
1.4.2. Le phénoxyéthanol.....	29
1.4.3. Emergence des applications de scans.....	30
1.4.4. Intérêt de développer des alternatives aux conservateurs de synthèse.....	30
II. Les métabolites secondaires des plantes.....	32
2.1. Qu'est-ce qu'un métabolite secondaire ?.....	32
2.2. Le biomimétisme.....	33
2.3. Les familles chimiques d'intérêt ayant des propriétés antimicrobiennes.....	34
2.3.1. Les terpénoïdes.....	34
2.3.2. Les alcaloïdes.....	35
2.3.3. Les lectines.....	37
III. Les composés phénoliques.....	38
3.1. Classification des composés phénoliques.....	38
3.1.1. Les non-flavonoïdes.....	39
3.1.2. Les flavonoïdes.....	40
3.2. Utilisation traditionnelle et intérêt des composés phénoliques.....	46
IV. Etude des tanins hydrolysables.....	47
4.1. Propriétés antimicrobiennes des tanins hydrolysables.....	47
4.2. Mécanismes d'action des tanins hydrolysables.....	53
4.2.1. Liaison aux enzymes microbiennes et aux protéines.....	53
4.2.2. Phosphorylation oxydative.....	54
4.2.3. Privation en fer.....	54

4.2.4. Intégrité membranaire	54
4.2.5. Action sur les protéines de virulence	57
V. Cas concret : étude de la plante <i>Punica granatum</i>	59
5.1. Description de la plante.....	59
5.2. Composition phytochimique de la plante	60
5.3. Propriétés antimicrobiennes de la plante	62
5.3.1. Activités antibactériennes sur <i>Staphylococcus aureus</i>	69
5.3.2. Activités antibactériennes sur <i>Escherichia coli</i>	75
5.3.3. Activités antibactériennes sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
5.3.4. Activités antifongiques sur <i>Candida albicans</i>	78
5.3.5. Activités antifongiques sur <i>Aspergillus brasiliensis</i>	81
5.4. Mode d'obtention des tanins hydrolysables présents chez <i>Punica granatum</i>	82
5.4.1. Choix des solvants d'extraction des tanins hydrolysables.....	82
5.4.2. Méthodes d'extraction des tanins hydrolysables	82
5.4.3. Identification des tanins hydrolysables extraits	83
5.5. Mise en formules des tanins hydrolysables	83
5.6. Synergie des polyphénols	84
5.7. Valorisation des sous-produits de la <i>Punica granatum</i>	85
VI. Matériels et méthodes.....	87
6.1. Moteurs de recherche	87
6.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	87
6.3. Identification.....	89
Conclusion	91
Références bibliographiques	92
Annexes	99
Annexe 1. Liste des agents conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques selon l'annexe V du Règlement Européen.....	100
Annexe 2. Composés testés dans l'étude de Funatogawa et al. et les sources des plantes	105
Serment De Galien.....	106

Table des illustrations

Figure 1 : Structure morphologique de <i>Staphylococcus aureus</i> observée par MEB.....	25
Figure 2 : Structure morphologique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observée par MEB	26
Figure 3 : Structure morphologique de <i>Escherichia coli</i> observée par MEB.....	26
Figure 4 : Structure morphologique de <i>Candida albicans</i> observée par MEB	27
Figure 5 : Structure morphologique de <i>Aspergillus brasiliensis</i> observée par MEB.....	28
Figure 6 : Schéma de la voie du mévalonate	32
Figure 7 : Schéma de la voie du shikimate	33
Figure 8 : Schéma de la voie des polyacétates-polymalonates.....	33
Figure 9 : Structure chimique du thymol (à gauche) et du carvacrol (à droite)	35
Figure 10 : Structure chimique de la colchicine.....	36
Figure 11 : Structure chimique des pyridines, tropanes et quinoléines	36
Figure 12 : Structure chimique de l'acide cinnamique (à gauche) et l'acide benzoïque (à droite).....	39
Figure 13 : Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique (à gauche) et de l'acide hydroxybenzoïque (à droite).....	39
Figure 14 : Structure chimique des lignanes.....	40
Figure 15 : Structure chimique du noyau flavonoïde.....	40
Figure 16 : Structure chimique des chalcones	41
Figure 17 : Structure chimique des stilbènes	41
Figure 18 : Structure chimique des flavonols, flavones et isoflavones	42
Figure 19 : Structure chimique des flavanones.....	42
Figure 20 : Structure chimique des anthocyanidines (à gauche) et des anthocyanes (à droite).....	43
Figure 21 : Structure chimique des flavanols	43
Figure 22 : Structure chimique de la catéchine et épicatechine	43
Figure 23 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable (à gauche) et d'un tanin condensé (à droite).....	44
Figure 24 : Structure chimique de l'acide gallique (à gauche), de l'acide hexahydroxydiphénique (au centre) et de l'acide ellagique (à droite).....	44
Figure 25 : Structure chimique d'un gallotanin (à gauche) et d'un ellagitanin (à droite).....	45
Figure 26 : Croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en CFU/mL	50
Figure 27 : Effet de la taille moléculaire des ellagitanins sur l'activité antimicrobienne contre <i>E. coli</i>	51
Figure 28 : Structure chimique de la tellimagrandine I et II et de la rugosine D et E	51

Figure 29 : Structure chimique du pyrogallol.....	52
Figure 30 : Structure chimique de la corilagine	52
Figure 31 : Absorption du cristal violet par <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. albicans</i> après traitement à la corilagine pendant 8 heures. EM (Erythromycine) et SM (Streptomycine) ont été choisis comme contrôle positif pour <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> , et NS (Nystatine) pour <i>C. albicans</i>	55
Figure 32 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif.....	55
Figure 33 : Structure de la paroi cellulaire des champignons.....	56
Figure 34 : Images par microscopie à force atomique de <i>E. coli</i> (A), <i>S. aureus</i> (B) et <i>C. albicans</i> (C) traités avec différentes concentrations de corilagine (contrôle, CMI et 4xCMI) pendant 8 heures	57
Figure 35 : Fruit du grenadier	59
Figure 36 : Structure chimique de la punicalagine	60
Figure 37 : Croissance des mycéliums de <i>F. oxysporum</i> (en mm).....	65
Figure 38 : Essai antimicrobien par diffusion sur agar sur <i>S. epidermidis</i> avec des extraits provenant de deux variétés de <i>P. granatum</i>	66
Figure 39 : Effet de la punicalagine sur la croissance de <i>S. aureus</i>	71
Figure 40 : Microscopie électronique à balayage (A - B - C) et à transmission (D - E - F) de <i>S. aureus</i> traités avec différentes concentrations de punicalagine. (A et D) : contrôle ; (B et E) : cellules traitées avec 2 x CMI de punicalagine ; (C et F) : cellules traitées avec 4 x CMI de punicalagine	71
Figure 41 : Activité anti-biofilm de la punicalagine contre <i>S. aureus</i>	72
Figure 42 : Antibiogramme de l'extrait aqueux (gauche), de l'extrait méthanolique (milieu) et éthanolique (droite) contre <i>E. coli</i>	76
Figure 43 : Microscopie électronique à balayage : A. Cellules témoins de <i>Candida albicans</i> , B. Cellules traitées avec 125 µg/mL d'extrait d'écorces, C. <i>Candida albicans</i> hyphe témoin, D. Cellules traitées avec 500 µg/mL d'extrait d'écorce avec desquamation (flèche fine) et rupture dans la cellule (flèches épaisses)	80
Figure 44 : Méthode de diffusion sur disque	87
Figure 45 : Méthode de la micro-dilution en bouillon pour déterminer la CMI.....	88

Table des tableaux

Tableau 1 : Evaluation de l'efficacité de la conservation selon le référentiel de la Pharmacopée Européenne.....	24
Tableau 2 : Evaluation de l'efficacité de la conservation selon le référentiel ISO 11930	24
Tableau 3 : Diamètre d'inhibition (en mm) des extraits de feuilles et d'écorces de tige de <i>F. elastica</i>	47
Tableau 4 : Activité antimicrobienne des extraits de feuilles et d'écorces de tige de <i>F. elastica</i>	48
Tableau 5 : Composition phytochimique de la grenade	61
Tableau 6 : Activité antibactérienne des jus de grenade de "Persephone", "Porphiroyeneti" et "Wonderful.....	63
Tableau 7 : Activité antifongique des jus de grenade de "Persephone", "Porphiroyeneti" et "Wonderful.....	64
Tableau 8 : Diamètres d'inhibition (en mm) d'extraits d'écorces de la grenade sur <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. epidermidis</i>	66
Tableau 9 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits méthanoliques de grenade sur les cultures bactériennes.....	67
Tableau 10 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits aqueux de grenade sur les cultures bactériennes	68
Tableau 11 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits méthanoliques de grenade sur les cultures fongiques.....	68
Tableau 12 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits éthanoliques de grenade sur les cultures fongiques.....	69
Tableau 13 : Pourcentage d'isolats sensibles à <i>S. aureus</i> pour chaque extrait ou composé pur.....	70
Tableau 14 : Diamètre d'inhibition (en mm) de la punicalagine sur <i>S. aureus</i>	70
Tableau 15 : Diamètre d'inhibition (en mm) de différents extraits de la grenade sur <i>S. aureus</i>	73
Tableau 16 : Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits de la grenade sur <i>S. aureus</i>	73
Tableau 17 : Activité antimicrobienne des extraits de graines de <i>P. granatum</i> sur <i>S. aureus</i>	74
Tableau 18 : Diamètre d'inhibition (en mm) d'un extrait d'écorce de grenade sur <i>E. coli</i>	75
Tableau 19 : Diamètre d'inhibition (en mm) de différents extraits de grenade sur <i>E. coli</i>	76
Tableau 20 Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits de la grenade contre <i>E. coli</i>	77
Tableau 21 : Activité antimicrobienne des extraits de graines de <i>P. granatum</i> sur <i>P. aeruginosa</i>	78

Tableau 22 : Activité antifongique des extraits éthanoliques de <i>P. granatum</i> sur <i>C. albicans</i>	79
Tableau 23 : Propriétés physico-chimiques des gels formulés avec 5% et 10% d'une fraction enrichie en tanins	84
Tableau 24 : Evaluation de la synergie entre l'acide ellagique et la punicalagine contre <i>S. aureus</i>	85

Introduction

Le domaine de l'industrie cosmétique ne cesse d'évoluer, poussé à la fois par la volonté d'innover pour améliorer l'efficacité et la sécurité des produits mais également pour répondre aux demandes changeantes du consommateur. Ainsi pour satisfaire aux tendances de ces dernières années, les principaux enjeux pour développer un produit cosmétique sont d'utiliser des matières premières naturelles, non controversées, sans danger pour la santé humaine et pour l'environnement et avec une liste d'ingrédients restreinte.

Ainsi, pour faire face à la demande grandissante de naturalité en cosmétique, différents labels ont vu le jour avec notamment la création d'Ecocert en 1991 qui est une entreprise française permettant de délivrer des certifications principalement autour de la thématique de l'agriculture biologique. Le référentiel cosmétique Européen Cosmos a ensuite vu le jour et permet de garantir qu'un produit cosmétique est naturel et/ou biologique à travers les certifications « cosmos naturel » et « cosmos organic » pour les produits finis et « cosmos approved » et « cosmos certified » qui est l'équivalent pour les matières premières. Enfin, la mise en place de la norme internationale ISO 16128-1 parue en 2016 suivi en 2017 par la norme ISO 16128-2, permet d'harmoniser mondialement la définition des ingrédients biologiques et naturels et de définir le calcul permettant d'obtenir le pourcentage naturel et biologique des produits finis.

En parallèle de cette quête de naturalité dans les produits cosmétiques, le domaine pharmaceutique est quant à lui confronté à une problématique grandissante autour de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques qui représente un risque de santé publique mondial et a ainsi fait émerger la nécessité de trouver de nouveaux composés antimicrobiens. Cela a poussé les chercheurs à se tourner vers des substances naturelles présentes chez les végétaux puisque depuis des milliers d'années, les plantes sont utilisées pour conserver des aliments ou traiter des maladies (1,2). En effet, depuis l'Antiquité, les herbes et les épices sont utilisées dans le domaine alimentaire pour apporter du goût mais également comme agents de conservation (3). Quant aux plantes, elles ont largement été utilisées en médecine traditionnelle pour développer des solutions thérapeutiques à de nombreuses pathologies grâce à leur composition riche en composés bioactifs (4).

Dans ce contexte actuel, développer des antimicrobiens naturels pour l'industrie cosmétique suscite un intérêt considérable pour répondre aux attentes des consommateurs puisque les conservateurs traditionnels sont d'origine synthétique. Les antimicrobiens sont des substances qui ont une fonction essentielle dans la préservation des produits cosmétiques. En effet, la majorité des formules contiennent une quantité importante d'eau et donc un milieu environnant propice au développement des microorganismes. La présence de conservateurs est donc nécessaire pour garantir l'innocuité du produit.

Les plantes synthétisent des composés bioactifs pour se défendre contre les prédateurs. Il semble donc pertinent de s'en inspirer afin d'identifier des agents antimicrobiens naturels. Parmi les métabolites secondaires chez les plantes, la grande classe des polyphénols a beaucoup été étudiée pour ses nombreuses propriétés. L'activité antimicrobienne des tanins qui appartiennent à la classe des polyphénols est très décrite dans la littérature (3,5).

Ces molécules ainsi que les extraits botaniques riches en polyphénols pourraient donc représenter une nouvelle alternative pour lutter contre les microorganismes. Une activité antimicrobienne puissante est corrélée principalement à la composition en polyphénols et aux concentrations de chacun de ces composés (5).

Ainsi, au travers ce travail de recherche bibliographique, nous allons nous intéresser aux tanins hydrolysables en tant que potentiels antimicrobiens naturels pour l'industrie cosmétique puis nous nous focaliserons sur la grenade et plus particulièrement la punicalagine comme molécule d'intérêt antimicrobienne.

I. Les produits cosmétiques

1.1. Définition d'un produit cosmétique

Selon l'article L5131-1 du Code de la Santé Publique, « un produit cosmétique se définit comme toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles » (6).

Ainsi, les produits cosmétiques sont composés de divers ingrédients ayant une action sur l'efficacité, la sécurité ou la texture et la galénique du produit avec entre autres des agents hydratants, des émoullients, des colorants, des filtres solaires mais également des conservateurs. Selon les matières premières utilisées, les objectifs principaux des produits cosmétiques sont divers : améliorer l'apparence physique, avoir une action sur le soin de la peau, des cheveux ou des ongles, parfumer ou encore contribuer à l'hygiène personnelle et à la protection solaire.

Afin de garantir la sécurité et la conformité de ces produits, ils sont soumis à de nombreuses réglementations. Ces réglementations varient d'un pays à l'autre mais des normes et directives internationales servent de support aux réglementations nationales. En Europe par exemple, le règlement (CE) n°1223/2009 définit les normes de sécurité, d'étiquetage et de commercialisation des produits cosmétiques dans l'Union Européenne. En comparaison, aux Etats-Unis, il s'agit de la Food and Drug Administration (FDA) qui réglemente l'utilisation des produits cosmétiques. En France, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) est l'organisme en charge de la réglementation des produits cosmétiques. Enfin, l'organisme international de normalisation nommé ISO définit des normes qui garantissent la qualité et la sécurité des produits cosmétiques. Les fabricants ont l'obligation de suivre ces différentes réglementations permettant ainsi de protéger le consommateur et lui assurer que le produit est sans danger pour sa santé. En effet, à la différence du domaine pharmaceutique, la mise sur le marché d'un produit cosmétique ne nécessite pas une autorisation de mise sur le marché préalable (7).

1.2. Les différents ingrédients composant un produit cosmétique

Un produit cosmétique est constitué d'un mélange d'ingrédients pertinemment sélectionnés et avec des ratios optimisés entre ces composants. Ces derniers peuvent être classés en trois fonctions principales.

La première fonction est celle des ingrédients actifs qui permettent d'apporter l'efficacité au produit. Il s'agit par exemple d'extraits végétaux, de peptides, d'extraits d'algues, des eaux florales ou encore de molécules pures. Ces ingrédients permettent de répondre aux

allégations du produit comme les actions anti-âges, anti-cheveux grisonnant, anti-inflammatoires, anti-imperfections ...

La seconde fonction est celle des ingrédients appelés ingrédients fonctionnels, que l'on pourrait comparer aux excipients dans le domaine pharmaceutique. Ils permettent de définir la galénique et la texture du produit fini. Les gélifiants permettent d'apporter de la viscosité quant aux émulsionnants, ils permettent de stabiliser des émulsions puisqu'il s'agit d'un mélange de deux phases non miscibles. Les phospholipides par exemple, sont des ingrédients fonctionnels ayant des propriétés gélifiantes et co-émulsionnantes grâce à leurs structures amphiphiles avec leur tête hydrophile et leurs queues lipophiles. Par ailleurs, ces ingrédients permettent également d'hydrater, d'apaiser et d'améliorer la pénétration des molécules actives. Ils contribuent également à la sensorialité du produit en apportant un toucher frais et doux par exemple.

Enfin, la dernière fonction correspond aux additifs qui sont les ingrédients permettant d'assurer la sécurité et la stabilité du produit fini ou bien d'apporter une note parfumée ou une touche colorée. On retrouve dans cette catégorie les chélatants, les anti-oxydants comme le tocophérol ou l'extrait de romarin, les parfums avec les huiles essentielles par exemple, les pigments mais également les conservateurs (8).

1.3. Les conservateurs

1.3.1. Définition d'un conservateur

Les agents conservateurs sont définis comme étant des « substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de microorganismes dans le produit cosmétique » d'après le règlement du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (6).

Les conservateurs permettent donc de protéger le produit cosmétique d'une contamination microbienne pouvant avoir lieu lors de la fabrication du produit à travers les matières premières, les outils de fabrication et les conditionnements utilisés mais également lors de l'utilisation classique du produit par le consommateur. Par conséquent, ils sont retrouvés dans la plupart des produits cosmétiques hormis dans les formules exemptes d'eau, telles que les produits cosmétiques solides ou les huiles ainsi que dans ceux présentant une teneur élevée en corps gras ou en alcool. En effet, dans ces formules, l'environnement n'étant pas propice au développement microbien, l'utilisation d'un conservateur n'est pas requise (8).

1.3.2. Règlementation Européenne et conservateurs autorisés

L'annexe V du règlement cosmétique Européen recense la liste positive des agents conservateurs qu'il est possible d'utiliser dans les produits cosmétiques. Cette liste comporte 57 familles de substances. Elle précise également s'il y a des restrictions d'usage à respecter ainsi que les concentrations maximales à ne pas dépasser (6). La liste complète des conservateurs autorisés en cosmétique est présentée en annexe 1.

Parmi tous les composés listés dans le règlement cosmétique, les différentes classes chimiques des conservateurs utilisés principalement sont (9):

- Les parabènes et leurs sels : méthylparabène, éthylparabène, etc.
- Le phénoxyéthanol
- Les acides carboxyliques et leurs sels : sorbate de potassium, benzoate de sodium, déhydroacétate de sodium, etc.
- Les hétérocycles avec les isothiazolinones : méthylisothiazolinone, méthylchloroisothiazolinone
- Les composés organohalogénés avec la chlorphénésine
- L'alcool benzylique

Toutes ces substances sont d'origine synthétique. Cependant, si elles sont retrouvées dans la nature, elles sont acceptées par le référentiel européen Cosmos. Ce référentiel permet de délivrer des certifications selon quatre axes principaux qui sont :

- Utiliser des matières premières issues de l'agriculture biologique et durable
- Utiliser des matières premières respectueuses de l'environnement et de la biodiversité
- Mettre en œuvre des procédés de fabrication respectueux de la santé et de l'environnement
- Intégrer le concept de la chimie verte

Parmi les 57 familles de substances, seuls certains acides organiques tels que l'acide benzoïque et ses sels, l'acide salicylique et ses sels, l'acide sorbique et ses sels et l'acide déhydroacétique et ses sels ainsi que l'alcool benzylique sont autorisés par ce référentiel.

Pour toutes les autres substances tels que les extraits végétaux ou encore les huiles essentielles utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes mais n'étant pas référencées dans l'annexe V du règlement cosmétique européen, le terme « conservateur » ne peut être employé, on parle alors d'antimicrobien (8).

1.3.3. Quels critères pour choisir un conservateur ?

De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour le choix des conservateurs.

Dans l'idéal, il présenterait tous les critères suivants (8) :

- La législation : listé dans l'Annexe V du règlement cosmétique pour garantir l'efficacité tout en s'assurant de la non-toxicité jusqu'à une concentration maximale autorisée.
- L'innocuité : aux concentrations d'utilisation, le conservateur doit être dépourvu d'effet toxique local ou systémique, d'effet irritant ou sensibilisant au niveau cutané, de la même manière que pour tous les ingrédients cosmétiques.
- Le spectre d'activité : le plus large possible pour avoir une action sur un plus grand nombre de microorganismes (bactéries à Gram positif et à Gram négatif, levures et

moisissures). L'association de plusieurs conservateurs peut être envisagée pour avoir une activité la plus large possible.

- La solubilité dans l'eau : la phase aqueuse est le milieu propice à la multiplication microbologique, il est donc important que le conservateur y soit présent à une concentration efficace.
- Le pH de formulation : l'efficacité de nombreux conservateurs est étroitement liée aux conditions acido-basiques du milieu. Si le conservateur est actif en milieu acide, son efficacité risque de baisser avec l'augmentation du pH. Il est donc souhaité que le conservateur soit efficace sur une large gamme de pH.
- La compatibilité avec le processus de fabrication, les matériaux de conditionnement et les autres composants de la formule.
- L'efficacité à long terme.
- Être incolore, inodore et insipide.
- Sans incidence sur la texture et la viscosité de la formule.

1.3.4. Evaluation de l'efficacité du système conservateur

Les fabricants cosmétiques doivent garantir les trois éléments suivants pour être en conformité avec la réglementation (6,8):

- Le produit doit contenir à l'ouverture le moins de germes possibles,
- Il doit être exempt d'agents pathogènes,
- Il doit pouvoir lutter contre la charge bactérienne préexistante ou provenant d'apports extérieurs.

En effet, les industriels doivent être capables d'assurer la stabilité microbologique du produit mis sur le marché, de son ouverture jusqu'à la dernière utilisation par le client. Ainsi, des contrôles microbiologiques sont réalisés au cours du développement pour s'assurer que le produit n'est pas contaminé. De plus, afin de garantir la bonne stabilité microbologique du produit au cours du temps, l'efficacité du conservateur est testée à l'aide de la méthode du challenge test (9). Cette méthode permet s'assurer que les microorganismes qui vont être introduits lors d'une utilisation classique du produit n'affecteront pas sa qualité ou sa sécurité. La réalisation de ce contrôle biologique est obligatoire d'après le règlement cosmétique (6).

Ce test consiste à inoculer de façon intentionnelle des concentrations connues de cinq souches différentes de microorganismes et d'observer leur décroissance dans le temps. Les propriétés de conservation du produit sont adéquates s'il y a une baisse significative ou aucune augmentation, selon le cas, du nombre de microorganismes après 2, 7, 14 et 28 jours. Les souches testées sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. En fonction de la cinétique de cette décroissance, un critère A ou B ou un échec sera attribué au produit testé. En Europe, deux référentiels peuvent être appliqués dans le domaine des cosmétiques : la Pharmacopée Européenne et la norme ISO 11930. Selon le référentiel utilisé, les exigences ne sont pas les mêmes pour obtenir les critères A ou B [Tableau 1 ;Tableau 2]

Tableau 1 : Evaluation de l'efficacité de la conservation selon le référentiel de la Pharmacopée Européenne

TEMPS	CRITÈRES	2 JOURS	7 JOURS	14 JOURS	28 JOURS
BACTÉRIES	A	≥ 2 log de réduction	≥ 3 log de réduction	-	Pas d'augmentation
	B	-	-	≥ 3 log de réduction	Pas d'augmentation
LEVURES	A	-	-	≥ 2 log de réduction	Pas d'augmentation
	B	-	-	≥ 1 log de réduction	Pas d'augmentation
MOISSURES	A	-	-	≥ 2 log de réduction	Pas d'augmentation
	B	-	-	≥ 1 log de réduction	Pas d'augmentation

Tableau 2 : Evaluation de l'efficacité de la conservation selon le référentiel ISO 11930

TEMPS	CRITÈRES	7 JOURS	14 JOURS	28 JOURS
BACTÉRIES	A	≥ 3 log de réduction	Pas d'augmentation	Pas d'augmentation
	B	-	≥ 3 log de réduction	Pas d'augmentation
LEVURES	A	≥ 1 log de réduction	Pas d'augmentation	Pas d'augmentation
	B	-	≥ 1 log de réduction	Pas d'augmentation
MOISSURES	A	-	Pas d'augmentation	≥ 1 log de réduction
	B	-	Pas d'augmentation	Pas d'augmentation

Le protocole de la Pharmacopée Européenne a été conçu pour les produits pharmaceutiques et applique donc des critères plus stricts que la norme ISO 11930 avec une décroissance dès le 2^{ème} jour pour les bactéries, ainsi qu'une réduction de 2 logs au 14^{ème} jour pour les champignons pour atteindre l'efficacité de conservation critère A [Tableau 1].

1.3.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, aussi connu sous le nom de Staphylocoque doré, est une bactérie cocci à Gram positif, souvent regroupé en amas [Figure 1] et qui fait partie de la famille des *Micrococcaceae* (13).

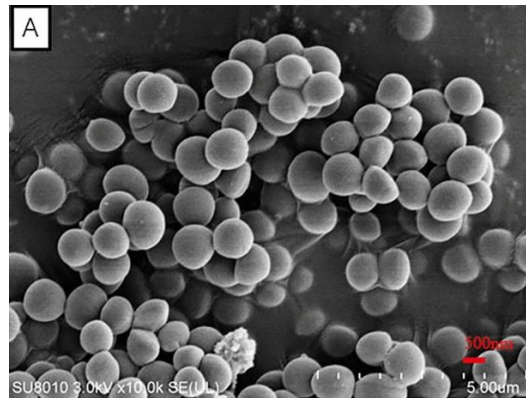


Figure 1 : Structure morphologique de *Staphylococcus aureus* observée par MEB

C'est une espèce ubiquitaire et commensale de la peau. Mais lorsque l'équilibre hôte-bactérie est rompu, ces bactéries sont responsables de nombreuses infections allant des infections cutanées jusqu'à des pathologies invasives mortelles. En effet, elle provoque des infections des voies respiratoires comme des pneumonies mais également des infections cardiovasculaires et des bactériémies nosocomiales. Il s'agit de l'agent pathogène le plus communément impliqué dans les infections de la peau chez l'homme tels que des furoncles, des impétigos, des abcès, des panaris, des onyxis et des infections de plaies. Ces pathologies n'impliquent généralement pas le pronostic vital du patient mais elles sont à l'origine de morbidités et de douleurs importantes. Dans la majorité des cas, cela est provoqué par certaines toxines produites par la bactérie tels que la leucocidine de Panton Valentine (PVL), les exfoliatines (ET), les entérotoxines et la toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1). Une bactériémie peut être responsable d'autres pathologies cutanées qui sont moins fréquentes. Cette bactérie joue aussi un rôle dans le développement de la dermatite atopique.

Les infections causées par *S. aureus* sont fréquentes et le phénomène de résistance aux antibiotiques de plus en plus répandue ne fait qu'accentuer ce problème de santé publique mondial (14–16).

1.3.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie bacille à Gram négatif [Figure 2], commensale du tube digestif chez l'homme (17).

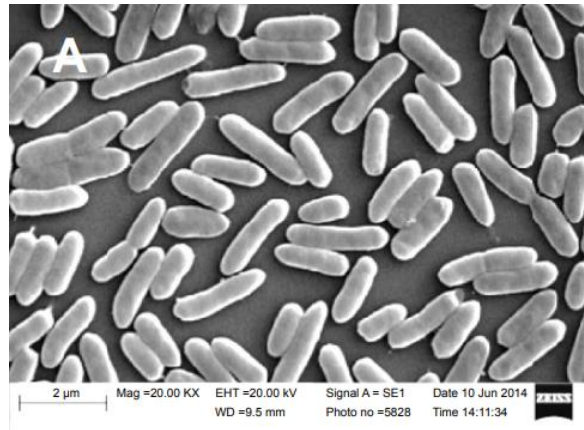


Figure 2 : Structure morphologique de *Pseudomonas aeruginosa* observée par MEB

Elle est responsable de pathologies opportunistes allant des infections localisées de la peau aux maladies systémiques qui peuvent être mortelles. Parmi ces infections, on retrouve des infections pulmonaires, des septicémies, des infections urinaires (18). Les manifestations cutanées causées par ce microorganisme sont caractéristiques, avec des infections de l'ongle notamment (19).

P. aeruginosa a également développé une très forte résistance aux antibiotiques.

1.3.4.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie bacille à Gram négatif [Figure 3], commensale du tube digestif chez l'homme (20).

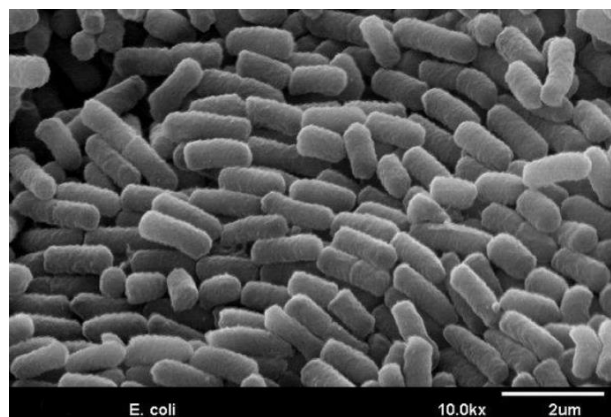


Figure 3 : Structure morphologique de *Escherichia coli* observée par MEB

Cette bactérie est un agent opportuniste responsable de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales pouvant aller de la gastro-entérite jusqu'au choc septique. Ainsi, les infections intestinales sont généralement dues à l'ingestion de souches d'*E. coli*.

Quant aux pathologies extra-intestinales telles que les infections des voies urinaires, les pneumonies, les bactériémies et les péritonites, elles sont souvent provoquées par la migration

de ces bactéries hors du tractus gastro-intestinal (21,22). Cet agent pathogène est aussi résistant à de nombreux antibiotiques (23).

Ainsi, cette bactérie est principalement responsable d'infections intestinales mais pas d'infection cutanée. La méthode du challenge test intègre l'efficacité du système conservateur sur ce microorganisme car elle a été conçue pour les produits pharmaceutiques.

1.3.4.4. *Candida albicans*

Candida albicans est un champignon polymorphe commensal de la surface des muqueuses du microbiote chez l'homme. Cette levure est formée de cellules ovoïdes presque sphérique, uni-nuclées [Figure 4] (24).

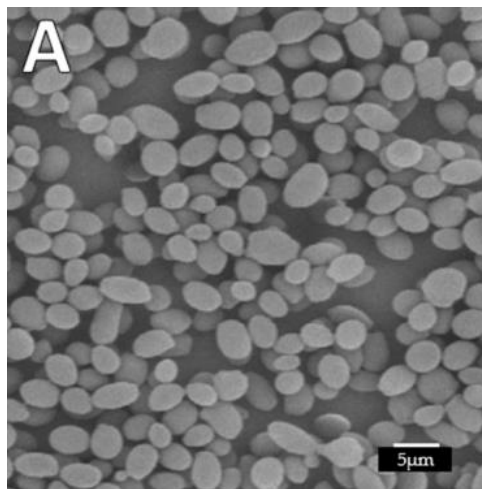


Figure 4 : Structure morphologique de *Candida albicans* observée par MEB

Lorsque ce microorganisme opportuniste devient pathogène pour l'homme, il est responsable d'infections cutanées pouvant aller jusqu'à des infections systémiques mortelles. Les infections cutanées fongiques les plus courantes sont dues à *Candida spp.* dont 80 à 90% sont causées par *Candida albicans*. Cette transition d'une forme commensale, bénigne à une forme pathologique s'explique par un déséquilibre entre le système immunitaire et les facteurs de virulence du champignon. Parmi ces facteurs de virulence, on retrouve le changement morphologique entre les formes levure et hyphes, l'expression d'adhésines et d'invasines à la surface des cellules, le thigmotropisme qui permet à la levure de contrôler la direction de sa croissance par contact avec un substrat biologique ou synthétique, la formation de biofilms, le changement de phénotype et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (25–27).

1.3.4.5. *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus brasiliensis est un champignon qui se caractérise par des spores brun foncé à noir, sous forme de conidies [Figure 5] (28,29).

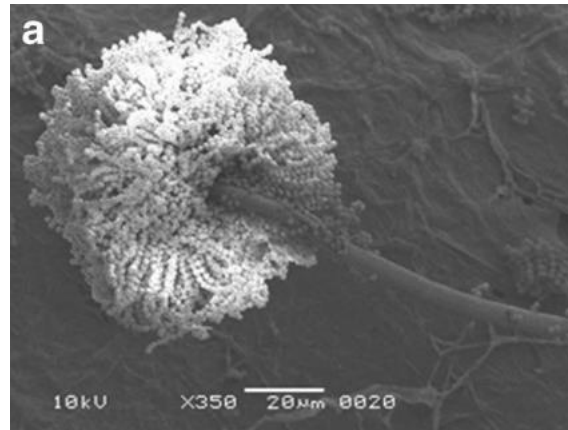


Figure 5 : Structure morphologique de *Aspergillus brasiliensis* observée par MEB

Cette moisissure est à l'origine de nombreuses contaminations alimentaires car ce champignon est présent dans le sol. Dans le domaine de la cosmétique, certains ingrédients nous viennent du domaine alimentaire, d'où l'intérêt de tester l'action des conservateurs sur cet agent pathogène (30).

Ce champignon est rarement responsable de pathologies chez l'homme contrairement aux autres espèces d'*Aspergillus*. Cependant, dans de rares cas, ce pathogène opportuniste a été décrit comme étant responsable de kératites, d'onychomycoses et d'aspergillose qui est une infection pulmonaire (31,32).

1.4. Controverse autour des conservateurs de synthèse

1.4.1. Les parabènes

Les parabènes sont des substances qui présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques, par conséquent, ils sont utilisés comme conservateurs dans les produits cosmétiques. Ils regroupent les esters de l'acide parahydroxybenzoïque (méthylparabène, éthylparabène, propylparabène et butylparabène).

En 2004, une étude britannique a mis en évidence une possible relation entre le cancer du sein chez la femme et l'utilisation de parabènes. L'étude a montré que l'on retrouvait des parabènes intacts dans les biopsies de tumeurs mammaires à une concentration moyenne de 20 ng par gramme de tumeur. Cela démontre qu'au moins une proportion des parabènes présents dans les produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques peut être absorbée et conservée dans les tissus du corps humain (33). A la suite de cette étude, les médias et les organismes de protection des consommateurs ont commencé à alerter la population face au danger que pouvait provoquer ces potentiels perturbateurs endocriniens.

La communauté scientifique a alors mis en place des études pour évaluer la sécurité d'utilisation et la toxicité de ces substances. L'étude réalisée par le SCCS ainsi que l'avis de la Commission Européenne en 2008 par les experts du SCCP concluent que dans les conditions normales d'utilisation, les parabènes à chaînes courtes comme le méthylparabène et l'éthylparabène ne présentent aucun danger pour le consommateur et ne sont pas

considérés comme des perturbateurs endocriniens. Concernant les parabènes à chaînes longues comme le butylparabène et le propylparabène, leur utilisation est sans danger tant qu'ils sont utilisés conformément aux restrictions de concentrations indiquées dans la réglementation à 0,14%. Les données sont insuffisantes pour conclure que ces substances sont des perturbateurs endocriniens. En revanche, le SCCS a mis en évidence que certains utilisateurs pourraient développer des réactions allergiques aux parabènes et en particulier au propylparabène (10,34,35) .

Malgré l'opinion du SCCS sur la sécurité d'utilisation des parabènes, les industriels ont préféré remplacer les parabènes dans leurs produits. L'allégation « sans parabènes » s'est répandue sur de nombreuses étiquettes, ce qui a renforcé la méfiance des consommateurs et l'idée que tous les parabènes étaient des substances nocives à éviter. Face à l'impossibilité d'utiliser ces molécules, il a donc fallu se tourner vers des alternatives pour les remplacer, comme le phénoxyéthanol.

1.4.2. Le phénoxyéthanol

Le phénoxyéthanol est un conservateur ayant un spectre d'activité antimicrobienne très large ainsi qu'une efficacité sur une large gamme de pH ce qui justifie qu'il soit très utilisé dans les produits cosmétiques. Il appartient à la grande famille des éthers de glycol, comprenant environ 80 substances chimiques, aux caractéristiques et aux propriétés toxicologiques très diverses.

En effet, certains éthers de glycol, tels que l'éther éthylique d'éthylène glycol ou l'éther méthylique d'éthylène glycol, ont révélé avoir des effets néfastes sur la reproduction et ont été interdites en Europe. Cependant, les propriétés chimiques et physiques du phénoxyéthanol diffèrent de celles de ces éthers de glycol. Il n'a pas été classé comme un toxique pour la reproduction dans le règlement (CE) n° 1272/2008, ni dans le règlement CLP contrairement à d'autres éthers de glycol. Néanmoins, certaines inquiétudes concernant son innocuité persistent en raison de son appartenance à la famille des éthers de glycol ainsi que de potentiels effets indésirables hématologiques et hépatologiques (6,36).

Pour répondre à l'emballage médiatique autour de ce conservateur, le comité européen SCCS ainsi que l'ANSM ont évalué le risque pour l'homme d'utiliser le phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques. Le SCCS a conclu en 2016 que le phénoxyéthanol était sans danger pour la santé de tous les consommateurs, y compris pour les enfants de tous âges, lorsqu'il est utilisé comme conservateur dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 1%. Par la suite l'ANSM a donné comme indications de ne pas l'utiliser comme conservateur dans les produits cosmétiques destinés à être appliqués sur le siège des enfants de moins de 3 ans et de restreindre son utilisation à 0,4% pour les autres produits. Cependant, en application de la décision N° 416798 du Conseil d'Etat du 4 décembre 2019, cette recommandation de l'ANSM n'est plus en vigueur au regard des données scientifiques disponibles actuellement dans la littérature qui suggèrent qu'il peut être considéré comme un conservateur sans danger pour la santé des consommateurs lorsque les réglementations sont respectées (37,38).

Malgré ces recommandations, la méfiance des consommateurs pour le phénoxyéthanol persiste et la tendance actuelle qui tend vers les produits cosmétiques naturels dessert l'image de ce conservateur de synthèse. Ainsi, de la même manière que pour les parabènes, les consommateurs sont à la recherche de produits où figure la mention « sans phénoxyéthanol ». A l'avenir, les industriels n'auront pas d'autres choix que d'enlever ce conservateur de tous leurs produits et se tourner vers des alternatives plus naturelles. Par conséquent, malgré sa grande efficacité ainsi que sa bonne tolérance à la concentration maximale de 1% qui fait de lui l'un des conservateurs les plus polyvalents et les plus utilisés, il est de moins en moins employé dans l'industrie cosmétique.

1.4.3. Emergence des applications de scans

Ces dernières années, les consommateurs sont à la recherche d'informations concernant la composition, l'origine et la traçabilité des matières premières utilisées dans les produits cosmétiques. Cette demande de transparence a fait émerger des applications comme Yuka en France ou bien EWG's Skin Deep utilisée principalement en Asie. Ces applications, qui rencontrent de plus en plus de succès auprès des consommateurs, permettent de connaître la composition d'un produit et chaque ingrédient de la formule est noté par l'application. Un score final est ensuite attribué et permet en théorie, aux consommateurs de faire un choix plus éveillé et plus averti parmi les différents produits cosmétiques disponibles sur le marché.

Bien qu'il soit légitime pour les consommateurs de vouloir connaître les ingrédients qui composent leurs produits cosmétiques ainsi que leur fonction, ces applications sont de plus en plus décriées. En effet, elles participent à alimenter la controverse et l'anxiété des consommateurs alors qu'elles n'ont pas accès aux concentrations des ingrédients dans le produit fini.

1.4.4. Intérêt de développer des alternatives aux conservateurs de synthèse

L'innovation dans le secteur des cosmétiques s'inspire en partie des tendances actuelles qui se basent sur les attentes du consommateur. Depuis plusieurs années, ces derniers sont à la recherche de produits naturels et biologiques, respectueux de l'environnement et de leur santé avec des formules vegan, 100% naturelles et sans substances controversées. Ainsi, des concepts tels que l'éco-conception, le zéro déchet, la cosmétique en vrac et solide voient le jour. Des questionnements sur l'origine des matières premières, la transparence et la traçabilité émergent également et poussent le consommateur à acheter des produits sans huile de palme ou sans soja car la culture de ces derniers entraîne des conséquences parfois désastreuses sur l'environnement et notamment sur la déforestation.

Parmi ces différentes tendances, les produits cosmétiques naturels sont devenus un critère essentiel pour les consommateurs. Cependant, les conservateurs autorisés dans l'annexe V du règlement cosmétique Européen sont tous des molécules de synthèse et nombreux d'entre eux ne peuvent plus être employés car leur utilisation est controversée. Ainsi, allier la naturalité et l'innocuité à partir de cette liste de conservateurs devient un véritable défi pour les

formulateurs. En outre, garantir la protection des produits cosmétiques contre les contaminations microbiennes est une obligation légale pour les fabricants de produits finis d'après l'annexe I du règlement cosmétique européen. Pour pallier cela, il devient nécessaire de trouver des alternatives naturelles en s'inspirant par exemple des métabolites secondaires des végétaux.

II. Les métabolites secondaires des plantes

Traditionnellement, les plantes ont été largement utilisées pour traiter de nombreuses pathologies. Actuellement, de nombreux traitements médicamenteux sont élaborés à partir de composés présents chez les plantes. En effet, les plantes représentent une source riche en composés bioactifs et leurs métabolites secondaires pourraient représenter une alternative naturelle pour lutter contre les microorganismes (5,39).

2.1. Qu'est-ce qu'un métabolite secondaire ?

Les métabolites secondaires ou métabolites spécialisés sont synthétisés par les végétaux principalement pour se défendre contre les prédateurs tels que les microorganismes, les insectes et les herbivores. Le terme « secondaire » est utilisé car ces substances sont non essentielles à la croissance, à la survie et à la reproduction de la plante mais nécessaire à la communication (40). Parmi ces composés bioactifs très divers et complexes, nous retrouvons les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins), les terpénoïdes et les alcaloïdes. Ces composés confèrent certaines caractéristiques aux plantes comme l'odeur ou la saveur qui est donnée par les terpénoïdes et la couleur qui est due aux quinones et aux tanins. Ces métabolites secondaires sont également décrits à de nombreuses reprises pour leur activité antimicrobienne *in vitro* (1). La grande diversité de métabolites spécialisés est due à la capacité des plantes à synthétiser une très large gamme de composés pour s'adapter à son milieu environnant (41).

La production de ces composés naturels implique trois voies de biogénèse majeures qui sont : la voie du mévalonate, la voie du shikimate et la voie des polyacétates-polymalonates.

La voie du mévalonate permet la production des terpènes et des stéroïdes. Elle débute par la condensation de deux unités d'acétyl-coenzyme A par l'acétoacétyl-CoA thiolase pour former l'acétoacétyl-CoA. Ensuite, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) synthase condense l'acétoacétyl-CoA avec une molécule d'acétyl-CoA pour former la HMG-CoA. Enfin, la HMG-CoA est convertie en mévalonate par la HMG-CoA réductase [Figure 6] (42–44).

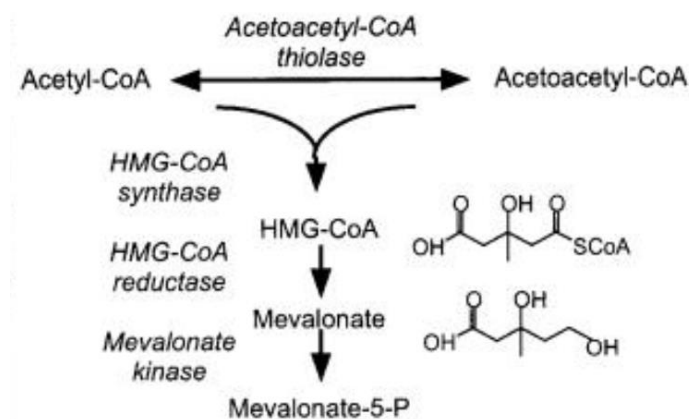


Figure 6 : Schéma de la voie du mévalonate

Le mévalonate est par la suite transformé en différents composés dont les isoprènes qui sont les précurseurs des terpènes (42,43).

La voie du shikimate permet quant à elle la production d'acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine et tyrosine) qui seront les précurseurs des alcaloïdes entre autres. Elle conduit aussi à la formation des lignanes, des coumarines et des flavonoïdes. Cette voie commence par la conversion de l'érythrose-4-phosphate et du phosphoénolpyruvate en acide shikimique [Figure 7] qui sera le précurseur des flavonoïdes, des lignanes et des alcaloïdes (45–47).

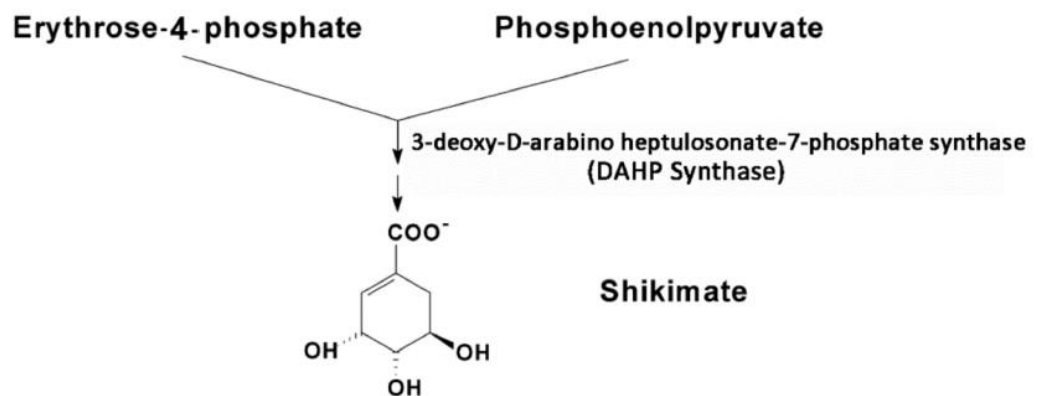


Figure 7 : Schéma de la voie du shikimate

Enfin, la voie des polyacétates-polymalonates est la voie de biosynthèse de certains polyphénols dont les tanins. Elle consiste en une condensation d'une unité de base issue du métabolisme primaire : l'acétyl-CoA. Cette association d'unités acétates va donner un poly-β-cétoester [Figure 8] qui sera le précurseur de nombreuses molécules ayant une structure très diversifiée (48).

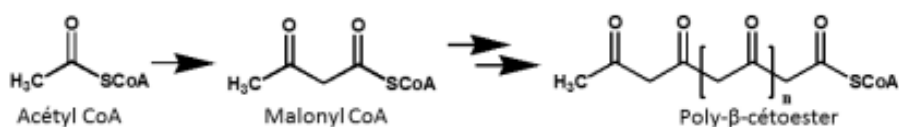


Figure 8 : Schéma de la voie des polyacétates-polymalonates

2.2. Le biomimétisme

La nature est en évolution permanente pour développer de nouvelles solutions ingénieuses et uniques pour s'adapter à l'environnement hostile auquel elle fait face.

Le terme « biomimétisme » est composé de deux mots dérivés du grec : « bios » qui signifie la vie et « mimesis » qui signifie l'imitation. Ainsi, le concept du biomimétisme consiste à imiter la nature pour développer de nouvelles innovations et répondre à de nombreuses problématiques. A travers cette inspiration de la nature, l'objectif principal est de concevoir des produits plus efficaces mais surtout plus durables qui s'alignent avec les enjeux

environnementaux actuels. Le biomimétisme est utilisé dans de nombreux secteurs de la science et de l'ingénierie pour développer de nouvelles solutions ou améliorer celles déjà existantes (49,50). Le biomimétisme diffère du concept de bioinspiration qui consiste à s'inspirer d'une idée qui provient de la nature mais sans reproduire exactement le mécanisme qui entre en jeu (50).

Les plantes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes de défense naturels spécifiques pour se défendre contre les prédateurs dont les microorganismes. Ces mécanismes passent par la synthèse de métabolites secondaires tels que des composés chimiques pourvus d'une activité antimicrobienne (1,41). Il paraît donc intéressant de s'inspirer de ces molécules que la nature a fait évoluer au cours du temps pour développer des antimicrobiens naturels.

2.3. Les familles chimiques d'intérêt ayant des propriétés antimicrobiennes

Les métabolites secondaires des plantes tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes sont largement décrits dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobiennes (39,41).

Il existe deux grandes catégories d'antimicrobiens en fonction du mécanisme d'action. Ces substances vont soit tuer ou soit inhiber la croissance des microorganismes. Dans le premier cas, il s'agit d'agents microbicides et dans le second cas, il s'agit d'agents microbiostatiques qui vont interférer avec les activités métaboliques des microorganismes nécessaires à leur survie (2).

Dans la littérature, il est décrit que la majorité des molécules ayant des propriétés antimicrobiennes appartiennent aux familles chimiques des polyphénols, des terpénoïdes, des alcaloïdes ou des lectines (1,51).

2.3.1. Les terpénoïdes

Les huiles essentielles représentent la fraction volatile des plantes. Elles confèrent leurs odeurs et sont composées majoritairement de terpénoïdes. Ce sont des métabolites secondaires des plantes ayant une structure isoprénique. Les huiles essentielles sont un mélange de composés concentrés et hydrophobes décrits entre autre pour leurs propriétés antimicrobiennes (1).

En effet, des extraits d'huiles essentielles issus de 5 plantes (*Satureja cuneifolia*, *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra*, *Thymus syriacus*, et *Thymbra spicata*) ont été testés contre *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *P. aeruginosa*, et *Bacillus subtilis* (52). Ces extraits ont été isolés par hydrodistillation. Les

Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) obtenues étaient comprises entre 100 et 800 µg/mL. L'huile essentielle de *C. capitatus* était efficace contre tous les pathogènes testés. Quant à l'huile essentielle de *S. thymbra*, elle s'est avérée avoir le potentiel antimicrobien le plus élevé. L'analyse phytochimique de ces huiles essentielles a montré la présence majoritairement de thymol (54,3%) ou de carvacrol (60,9%) [Figure 9]. Ces deux molécules sont des monoterpènes cycliques possédant une fonction phénol et appartenant à la famille des terpénoïdes (52).

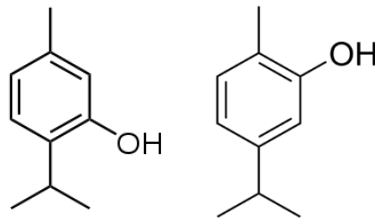


Figure 9 : Structure chimique du thymol (à gauche) et du carvacrol (à droite)

Dans une autre étude, les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir de six végétaux (*Abies cilicica*, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus excelsa*, *Juniperus oxycedrus*, *Cedrus libani* et *Cupressus macrocarpa*) ont été testées contre des microorganismes responsables d'infections cutanées chez l'homme. Ces extraits ont été particulièrement efficaces contre *S. aureus* et les espèces de *Trichophyton* avec des CMI allant de 32 µg/mL à 64 µg/mL (53).

Ainsi, les huiles essentielles riches en terpénoïdes pourraient être utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes d'autant plus qu'elles sont déjà largement employées en tant qu'ingrédient actif et agent parfumant dans les produits cosmétiques. En effet, ces molécules présentent de nombreuses propriétés bénéfiques pour la peau et les cheveux avec des activités anti-âge, anti-acné, apaisante, régulatrice de la production de sébum et antipelluculaires. Par conséquent, ces composés peuvent jouer le rôle d'ingrédients multifonctionnels dont celui de conserver les produits. Cependant, l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques peut être limitée par différents facteurs comme l'incompatibilité entre son odeur marquée avec les autres composants de formule. De plus, les huiles essentielles peuvent être composées de molécules allergènes responsables de réactions cutanées. Par exemple, le linalol présent dans l'huile essentielle de lavande est un allergène naturel. Ainsi, l'utilisation de ces composés peut être limitée chez les femmes enceintes, les enfants et les personnes ayant la peau sensible (8).

2.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires ayant des structures très diversifiées. On les retrouve dans environ 300 familles de plantes. Ce sont des structures présentant un ou plusieurs atomes d'azote. La structure chimique définit deux grandes catégories. La première regroupe les alcaloïdes où l'azote n'est pas présent dans l'hétérocycle, également appelés proto-alcaloïdes ou amines biologiques. Dans cette catégorie, on retrouve la colchicine [Figure 10].

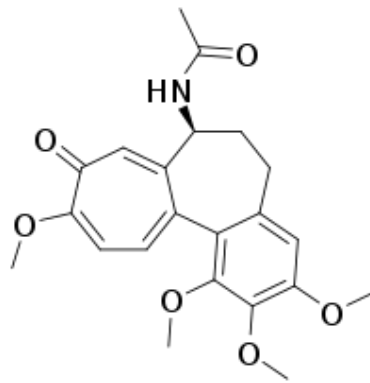


Figure 10 : Structure chimique de la colchicine

La deuxième catégorie est composée d'alcaloïdes hétérocycliques comme la nicotine appartenant au groupe des pyridine ou l'atropine ayant un noyau tropane. La quinine appartient quant à elle au groupe des quinoléines [Figure 11].

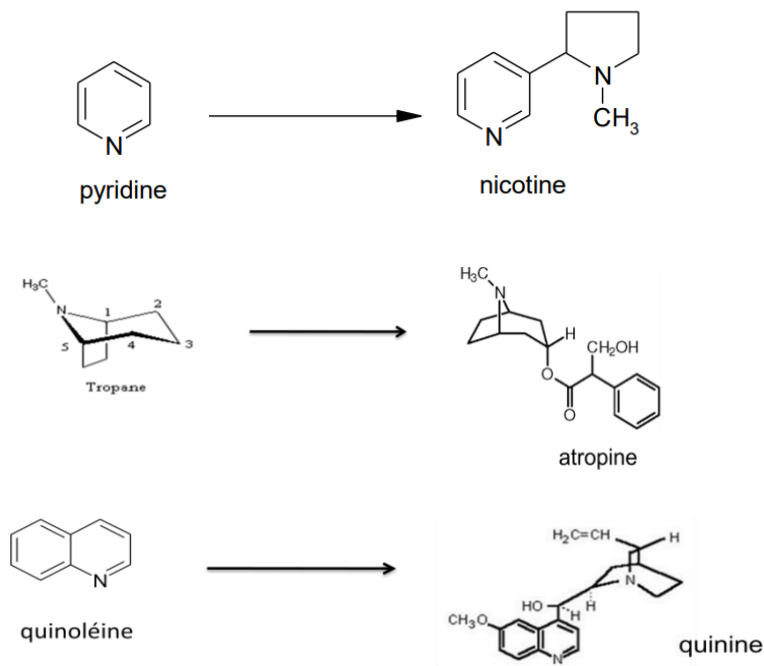


Figure 11 : Structure chimique des pyridines, tropanes et quinoléines

Cette famille de molécules a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle et est encore employée dans la médecine moderne pour ces nombreuses propriétés pharmacologiques. On retrouve des activités stimulantes par la caféine, antalgiques et sédatives avec la codéine ou encore antiparasitaires avec la quinine. Toutefois, certains alcaloïdes sont connus pour leur nocivité notamment la cocaïne qui est une drogue psychotrope addictive ayant des effets délétères sur la santé (41). Parmi les différentes activités des alcaloïdes, des propriétés antimicrobiennes sont décrites (1).

En effet, ces molécules exercent leur efficacité de diverses manières : en affectant la division cellulaire ; par inhibition respiratoire et enzymatique nécessaire à la survie des

microorganismes ; en impactant l'intégrité de la membrane ; en affectant les gènes de virulence ou encore en empêchant la formation d'un biofilm bactérien.

Actuellement, des recherches sont menées sur ces composés structurellement très diversifiés pour découvrir de nouveaux agents antimicrobiens notamment pour lutter contre les bactéries résistantes aux antibiotiques (41).

2.3.3. Les lectines

Les lectines sont des protéines naturelles largement répandues dans la nature qui peuvent être présentes chez les microorganismes, chez de nombreux végétaux, chez les animaux et qui sont décrites pour leur activité antimicrobienne. En effet, les lectines impactent la croissance des microorganismes par différents mécanismes d'action. Ces protéines ont la capacité à se lier de manière spécifique et réversible aux sucres présents à leur surface. Cela aura pour effet d'empêcher l'adhérence et la propagation des microorganismes aux cellules des hôtes. Chez les bactéries, elles agissent également en formant des pores qui affecteront l'intégrité membranaire conduisant à la mort ou à l'inhibition de la croissance bactérienne. Elles peuvent également affecter la formation du biofilm. Quant à l'activité antifongique, les lectines peuvent se lier à la chitine provoquant une déstabilisation ou un arrêt de la synthèse de la paroi cellulaire au cours du développement du champignon (1,54).

Au-delà de ces familles chimiques précédemment décrites, des propriétés antimicrobiennes ont été rapportées pour la famille des polyphénols (5,39).

III. Les composés phénoliques

Les polyphénols représentent l'une des classes de produits naturels les plus prépondérantes dans le règne végétal. De nombreuses structures phénoliques ont été décrites et ces structures très diversifiées vont du simple cycle phénolique substitué à des molécules hautement polymérisées (41,55).

Ces composés ont largement été décrits pour les nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé qu'ils possèdent : activités antioxydantes ; anti-inflammatoires ; antidiabétiques ; antiallergiques ; antihypertensives ; antithrombotiques ; anticancéreuses ; cardioprotectrices ; ostéoprotectrices ; neuroprotectrices et hépatoprotectrices. Des activités antibactériennes et antifongiques sont également mises en évidence (55). Actuellement, ces molécules sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour leur propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Les polyphénols sont retrouvés dans différentes parties des plantes (56). Il serait donc intéressant d'évaluer les polyphénols extraits des végétaux en tant qu'antimicrobien naturel pour l'industrie cosmétique car ils représenteraient une alternative potentielle aux conservateurs synthétiques (5,39).

3.1. Classification des composés phénoliques

La classe des polyphénols compterait plus de 10 000 composés qui ont tous pour point commun d'avoir au moins un cycle aromatique non azoté avec un ou plusieurs groupes hydroxyles dans leur structure. Ainsi, cette description permet d'intégrer un nombre important de composés hétérogènes. Il existe donc différentes classifications, soit simplement en flavonoïdes et non flavonoïdes ou bien en fonction du nombre d'unités phénoliques, des groupes de substituants ou du type de liaison entre les cycles phénoliques dans la structure. Par conséquent, cette classe de molécules peut être divisée en de nombreuses familles de polyphénols. Ces molécules peuvent également former des liaisons avec des polysaccharides, des formes glycosides ou aglycones sont donc retrouvées. Ainsi, la diversité structurelle de ces molécules donne la classification suivante : les flavonoïdes avec les chalcones ; les stilbènes ; les flavonols ; les flavones ; les isoflavones ; les flavanones ; les anthocyanes et anthocyanidines ; les flavanols et les tanins et les molécules non-flavonoïdes avec les phénols simples et acides phénoliques et les lignanes (5,41,56).

Les polyphénols décrits comme étant les molécules les plus actives sont les tanins et plus particulièrement les tanins hydrolysables. En effet, ces derniers font partie des composés principaux dans les extraits évalués (*Pisidium guajava*, *Punica granatum*, *Rheum rhabonticum* et *Vitis vinifera*) et ont démontrés des propriétés antimicrobiennes contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *C. albicans* et *Aspergillus niger* (41).

3.1.1. Les non-flavonoïdes

La structure de base des composés non-flavonoïdes est caractérisée par un seul noyau aromatique. Parmi ces composés, on retrouve les phénols simples et les acides phénoliques, les acides phénylpropanoïques (exemple : acide cinnamique) qui conduisent à la formation des coumarines (56). Les lignanes sont issus de la dimérisation des acides phénylpropanoïques.

Les phénols simples et les acides phénoliques :

La famille principale de ces composés non-flavonoïdes est celle des acides phénoliques.

Les phénols simples et les acides phénoliques ont une structure allant d'un simple cycle phénolique avec une seule substitution comme l'acide cinnamique et l'acide benzoïque à diverses substitutions et hydroxylations [Figure 12].

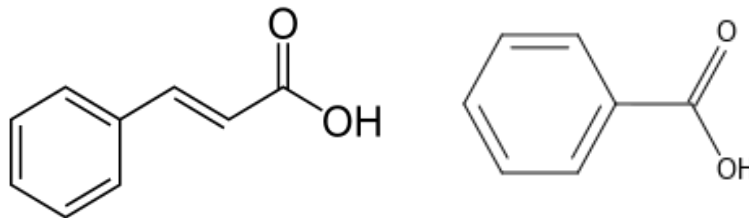


Figure 12 : Structure chimique de l'acide cinnamique (à gauche) et l'acide benzoïque (à droite)

Ces molécules sont souvent couplées à d'autres polyphénols, du glucose ou autre composant structural de la plante.

Parmi les acides phénoliques, on différencie deux groupes, les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques [Figure 13].

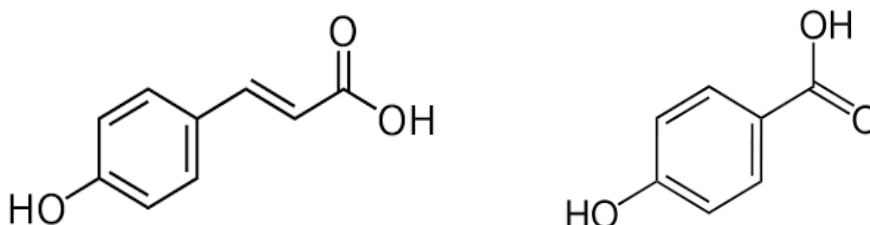


Figure 13 : Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique (à gauche) et de l'acide hydroxybenzoïque (à droite)

Les acides caféique, férulique, coumarique et sinapique sont les acides hydroxycinnamiques les plus répandus dans les aliments. Quant aux acides gallique, syringique et vanillique, ce sont les acides hydroxybenzoïques les plus courants (56).

Les lignanes

Les lignanes sont également des molécules classées dans les non-flavonoïdes. Elles sont composées de deux unités de propylbenzène reliées entre elles [Figure 14]. Elles sont présentes dans les légumineuses, les graines et les huiles végétales (56).

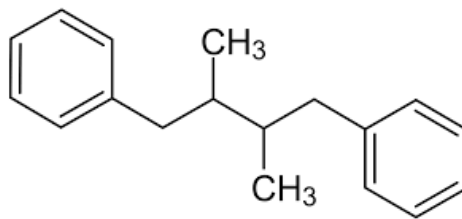


Figure 14 : Structure chimique des lignanes

3.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont de molécules de faible poids moléculaire et sont issues de la voie de biosynthèse mixite du shikimate et de l'acétate. Ces molécules sont caractérisées par leur structure de base diphenylpropane appelée le noyau flavonoïde [Figure 15]. Les deux noyaux phénoliques A et B sont liés par un noyau ou cycle qui est un pyrane (56).

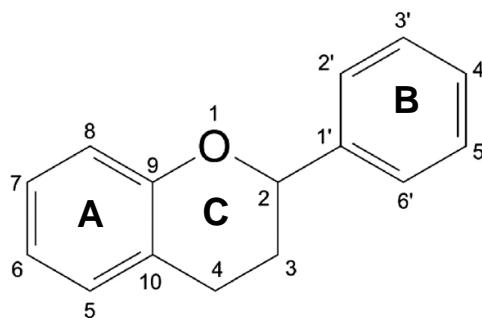


Figure 15 : Structure chimique du noyau flavonoïde

Les chalcones :

Les chalcones sont constituées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne carbonée insaturée à trois carbones avec une fonction cétone [Figure 16]. Ces molécules sont les

précurseurs de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Elle représente le squelette des flavonoïdes ayant une chaîne ouverte.

Les chalcones sont retrouvées en abondance dans les fruits, les légumineuses, les légumes et les boissons comme le thé, le café, le vin rouge et la bière (57).

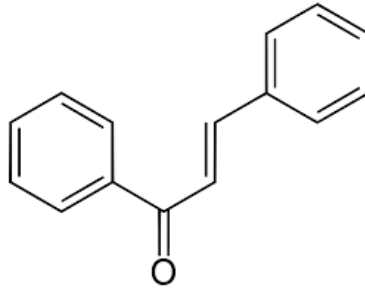


Figure 16 : Structure chimique des chalcones

Les stilbènes :

Les stilbènes se caractérisent par deux cycles phényles liés par un groupe éthylène [Figure 17]. Le cycle A est généralement substitué par deux groupes hydroxyles alors que le cycle B peut être substitué par des groupes hydroxyles et méthoxyles.

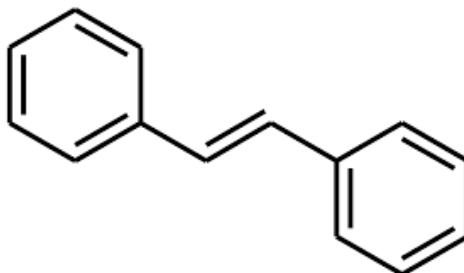


Figure 17 : Structure chimique des stilbènes

Le resvératrol représente l'un des stilbènes les plus connus et est retrouvé dans le raisin, les arachides et les baies (56).

Les flavones, isoflavones et flavonols :

La structure des flavones est constituée d'un cycle aromatique lié à un cycle présentant une seule fonction cétone en position C4. Ces molécules ont également une double liaison entre C2 et C3. Le cycle aromatique B est lié au noyau hétérocyclique C en position C2 [Figure 18]. Les molécules les plus importantes appartenant à cette famille sont la lutéoline et l'apigénine. Dans les cas des isoflavones, le cycle B est positionné sur l'hétérocycle C en position C3 et non en C2 [Figure 18].

Les flavonols diffèrent des flavones par un groupement hydroxyle en position C3 [Figure 18]. Les molécules les plus répandues et étudiées sont le kaempférol et la quercétine (56).

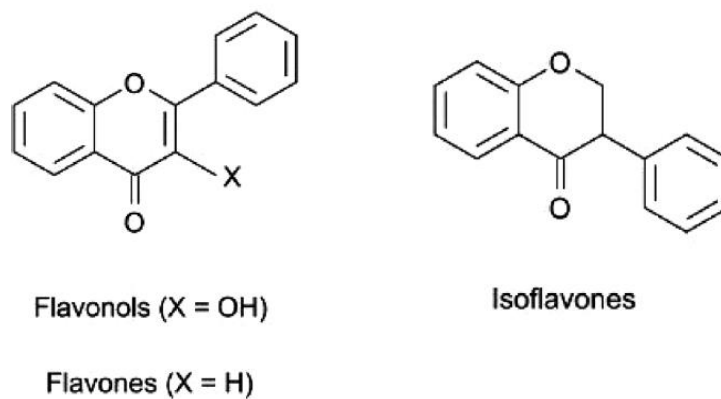


Figure 18 : Structure chimique des flavonols, flavones et isoflavones

Les flavanones :

Les flavanones n'ont pas de double liaison en C2-C3, ni de groupement hydroxyle en C3 [Figure 19]. Ces molécules se différencient par un grand nombre de dérivés substitués. En effet, la substitution du groupement hydroxyle en position C7 par un disaccharide correspond à la forme commune des flavanones glycosylées. Ce groupe de molécules a de nombreux bénéfices pour la santé avec notamment une activité antioxydante qui est due aux groupements hydroxyles sur le noyau B. Les flavanones sont présentes en fortes concentrations dans les agrumes comme l'orange qui est riche en hespéridine ou bien dans les citrons comme l'ériodictyol (41,55,56).

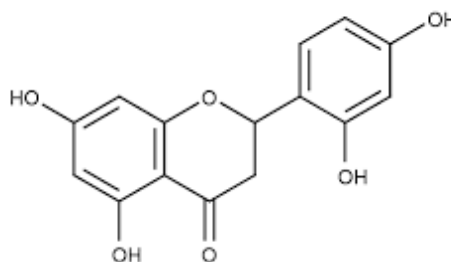


Figure 19 : Structure chimique des flavanones

Anthocyanidines et anthocyanes :

Ces molécules se différencient des autres flavonoïdes par la présence de deux doubles liaisons dans le noyau C et l'absence de la fonction cétone en position C4. Les anthocyanes représentent la forme glycosylée des anthocyanidines [Figure 20].

Le cycle B est également constitué de groupes hydroxyles et méthoxyles. Le fragment sucre qui compose les anthocyanes est généralement un monosaccharide comme le glucose, le galactose et l'arabinose. Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles qui donnent leur couleur aux fleurs et aux fruits colorés (56).

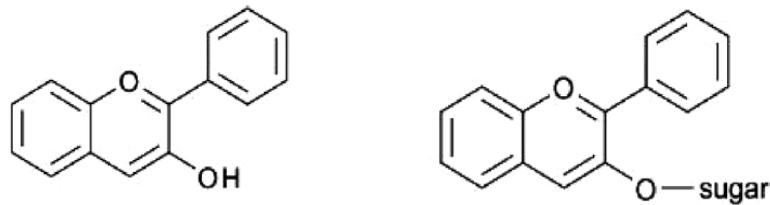


Figure 20 : Structure chimique des anthocyanidines (à gauche) et des anthocyanes (à droite)

Flavanols et tanins :

Le noyau hétérocyclique des flavanols est saturé, sans double liaison entre C2 et C3, sans groupement carbonyle et avec un groupe hydroxyle en position C3 [Figure 21] (56).

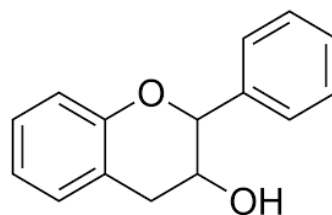


Figure 21 : Structure chimique des flavanols

La présence de ce groupement permet d'identifier deux centres chiraux et ainsi caractériser les catéchines et les épicatechines comme étant des diastéréoisomères [Figure 22] (56).

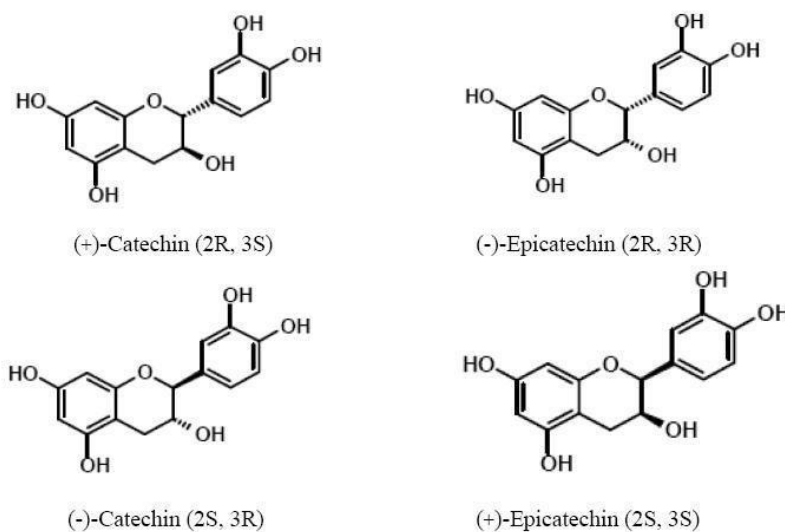


Figure 22 : Structure chimique de la catéchine et épicatechine

La polymérisation de ces unités monomériques forment des tanins condensés (56). Ce sont des molécules qui ont pour caractéristique d'avoir un haut poids moléculaire allant de 500 à 3000 Da mais certaines de ces substances phénoliques polymériques peuvent aller jusqu'à 30 000 Da (55).

Ces polymères sont divisés en deux catégories principales en fonction de leur structure : les tanins hydrolysables (avec les ellagitanins et les gallotanins) et les tanins condensés (avec les proanthocyanidines). Comme le nom l'indique, les tanins hydrolysables ont la capacité de s'hydrolyser facilement grâce aux groupements esters. Quant aux tanins condensés, ils proviennent de la condensation de molécules de flavonoïdes [Figure 23] (3,58).

Les tanins hydrolysables sont composés d'acides phénoliques qui sont liés par des liaisons esters à un polyol qui est généralement un D-glucose et qui constitue le centre de la molécule (41,59).

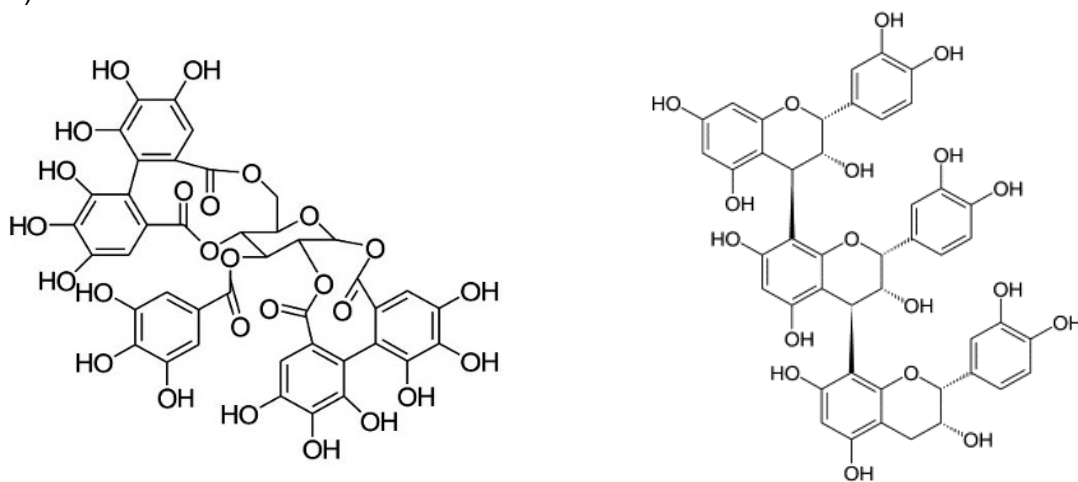


Figure 23 : Structure chimique d'un tanin hydrolysable (à gauche) et d'un tanin condensé (à droite)

L'unité de base des tanins hydrolysables est l'acide gallique. Parmi les tanins hydrolysables, on retrouve deux groupes : les gallotanins dont l'acide phénolique est l'acide gallique et les ellagitanins où les acides phénoliques sont des dérivés de l'oxydation de l'acide gallique (acide ellagique) (59). En effet, deux groupements d'acide gallique vont se coupler par une liaison carbone-carbone pour former l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP). Une réaction de lactonisation de l'HHDP en solution aqueuse va former l'acide ellagique [Figure 24] (60).

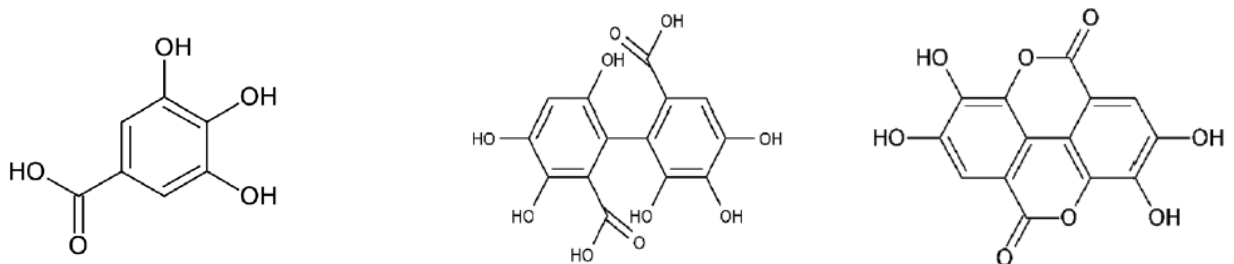


Figure 24 : Structure chimique de l'acide gallique (à gauche), de l'acide hexahydroxydiphénique (au centre) et de l'acide ellagique (à droite)

En fonction du nombre de polyols, les tanins hydrolysables peuvent être monomériques, dimériques ou trimériques et ont un poids moléculaire entre 500 et 5000 Da [Figure 25] (60).

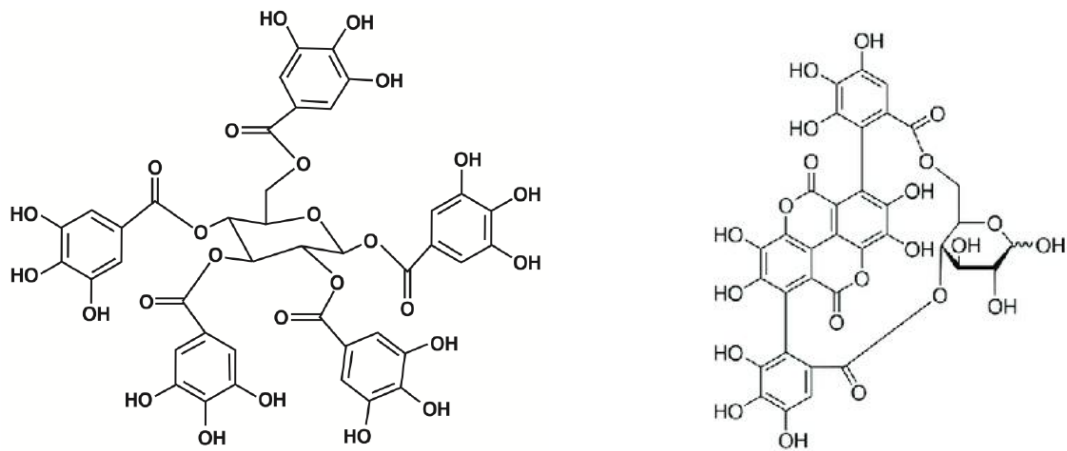


Figure 25 : Structure chimique d'un gallotanin (à gauche) et d'un ellagitanin (à droite)

Quant aux tanins condensés, ils sont plus abondants et sont dérivés de monomères de flavonoïdes. Ils peuvent également être appelés proanthocyanidines (1,41).

Ces deux classes de tanins ont des propriétés chimiques et biologiques différentes. On les retrouve dans de nombreuses plantes (3). Ce sont des molécules solubles dans l'eau qui se différencient de la plupart des autres composés phénoliques par leur capacité à se lier et à précipiter les macromolécules (protéines, polysaccharides) (59,60).

Les tanins hydrolysables ont largement été décrits dans la littérature pour leurs nombreuses activités pharmacologiques notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, cardio-protectrices, anticancéreux, antibactériennes, antivirales et antifongiques (58,60).

Ces substances phénoliques polymériques sont retrouvées dans quasiment toutes les parties de la plante : bois, écorce, feuille, racine et fruit (55).

Pour conclure, la classe des polyphénols fait partie des métabolites secondaires les plus abondants chez les plantes. Ils sont synthétisés notamment pour que la plante puisse se défendre contre ses prédateurs. Différents mécanismes pourraient expliquer cette activité antimicrobienne comme l'inhibition des enzymes, la liaison aux adhésines à la surface des cellules des microorganismes, la liaison aux protéines de la paroi cellulaire, l'interaction avec des substrats qui ne seraient donc plus disponibles pour la croissance des pathogènes ou encore la formation de complexes avec les ions métalliques (41).

3.2. Utilisation traditionnelle et intérêt des composés phénoliques

Les végétaux contenant des flavonoïdes sont utilisés dans la médecine ancestrale pour leurs nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé tels que des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes. Traditionnellement, ils étaient également utilisés pour traiter les douleurs rhumatismales et pour prévenir les cancers gastriques (55).

L'activité antimicrobienne des composés phénoliques est de plus en plus décrite dans la littérature (61). Par exemple, les extraits aqueux des feuilles ou des fleurs d'*Erica arboea* L. riches en polyphénols et particulièrement en flavonoïdes ont montré une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *B. subtilis* et *B. cereus* (62). Dans une autre étude, l'acide tannique, le gallate d'épigallocatechine et la rutine qui font partie respectivement des familles des tanins hydrolysables, des flavanols et des flavonoïdes présentent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa* (63). Ainsi, de nombreuses recherches ont mis en lumière les activités antibactériennes et antifongiques des polyphénols et en particulier des tanins (55). En effet, les propriétés antimicrobiennes des tanins extraits des grains de sorgho ont été évaluées et ont montrées une efficacité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Saccharomyces cerevisiae* (64). Ainsi, l'utilisation des composés phénoliques dans l'industrie cosmétique représente un réel atout puisqu'ils permettent d'allier la naturalité et l'efficacité grâce aux nombreuses propriétés que possèdent ces composés. Ces deux critères étant considérés comme des points majeurs pour le consommateur.

IV. Etude des tanins hydrolysables

4.1. Propriétés antimicrobiennes des tanins hydrolysables

Parmi les différents composés de la classe des polyphénols, les tanins hydrolysables ont été décrits pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, les tanins sont des métabolites secondaires présents chez de nombreuses espèces végétales et synthétisés pour leur rôle dans la défense naturelle contre des agents pathogènes (1,51). Ainsi, la suite de cette étude se focalisera uniquement sur ces composés d'intérêts.

Une analyse *in vitro* a été entreprise afin d'évaluer l'activité antibactérienne de 36 polyphénols et 4 terpénoïdes provenant de 28 plantes différentes [Annexe 2] (65). Ces composés ont été testés vis-à-vis de leur capacité à inhiber la croissance de quatre souches d'*Helicobacter pylori*. Il a été conclu que les 20 tanins hydrolysables testés présentaient une activité antibactérienne contre cette bactérie. Les tanins hydrolysables monomériques se sont démarqués pour leur activité (avec des CMI allant de 6,25 à 50 µg/mL) dont le tellimagrandin I qui avait une activité bactéricide dose et temps dépendant. Les oligomères ont obtenu des valeurs de CMI allant de 12,5 µg/mL à 50 µg/mL. Ensuite, les tanins hydrolysables ont été testés sur les membranes et il a été mis en évidence une action dose-dépendante sur leur intégrité. Pour les autres composés testés : catéchines, proanthocyanidines, autres polyphénols et terpénoïdes, dans la grande majorité, peu d'activité antimicrobienne a été observée. Ainsi, ces résultats montrent qu'au sein de la classe des polyphénols, les tanins hydrolysables semblent être prometteurs pour leur activité antimicrobienne (65).

Dans une autre étude, les propriétés antimicrobiennes d'extraits à l'éthanol de feuilles et d'écorces de la tige de *Funtumia elastica* ont été évalués sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *A. flavus*. La méthode de diffusion sur gélose a permis d'obtenir les diamètres d'inhibition et la méthode de micro-dilution a permis de déterminer les CMI. Le clotrimazole a été utilisé en tant que contrôle positif [Tableau 3 ; Tableau 4].

Tableau 3 : Diamètre d'inhibition (en mm) des extraits de feuilles et d'écorces de tige de *F. elastica*

	Concentration testée (en mg/mL)	Diamètre d'inhibition	Diamètre d'inhibition	Diamètre d'inhibition	Diamètre d'inhibition	Diamètre d'inhibition
		<i>E. coli</i> (en mm)	<i>P. aeruginosa</i> (en mm)	<i>C. albicans</i> (en mm)	<i>A. niger</i> (en mm)	<i>A. flavus</i> (en mm)
Extrait de feuilles	10	11,50	0,0	0,0	0,0	0,0
	25	15,91	0,0	0,0	0,0	11,53
	50	17,20	12,50	14,52	11,65	11,60

Extrait d'écorce de la tige	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	25	16,12	0,0	11,56	0,0	0,0
	50	17,17	12,64	14,52	0,0	11,20
Clotrimazole	1	27,17	22,5	23,12	17,50	20,50

Tableau 4 : Activité antimicrobienne des extraits de feuilles et d'écorces de tige de *F. elastica*

	CMI <i>E. coli</i>	CMI <i>P. aeruginosa</i>	CMI <i>C. albicans</i>	CMI <i>A. niger</i>	CMI <i>A. flavus</i>
Extrait de feuilles	0,125	1,55	1,25	1,50	1,50
Extrait d'écorce de la tige	0,250	1,75	1,50	1,75	1,55
Clotrimazole	0,025	0,055	0,025	0,055	0,075

Les CMI sont exprimées en mg/mL

Pour *E. coli*, les diamètres d'inhibition étaient de 11,50 mm, 15,91 mm et 17,20 mm aux concentrations de 10, 25 et 50 mg/mL pour l'extrait des feuilles et de 16,12 mm et 17,17 mm aux concentrations de 25 et 50 mg/mL pour l'extrait d'écorces de la tige. Le témoin a montré une zone d'inhibition de 27,17 mm à 1 mg/mL. Les CMI étaient de 0,125 mg/mL pour l'extrait des feuilles, 0,250 mg/mL pour l'extrait d'écorce de la tige et 0,025 mg/mL pour le chloramphénicol.

Pour *P. aeruginosa*, les diamètres d'inhibition étaient de 12,50 mm et 12,64 mm à la concentration de 50 mg/mL pour l'extrait des feuilles et de l'écorces de la tige respectivement. Le chloramphénicol, utilisé comme contrôle positif, a présenté une zone d'inhibition de 22,5 mm à 1 mg/mL. Les CMI étaient de 1,55 mg/mL pour l'extrait des feuilles, 1,75 mg/mL pour l'extrait d'écorces de la tige et 0,055 mg/mL pour le chloramphénicol.

Concernant *C. albicans*, le diamètre d'inhibition était de 14,52 mm à la concentration de 50 mg/mL pour l'extrait des feuilles et de 11,56 mm et 14,52 mm aux concentrations de 25 et 50 mg/mL pour l'extrait d'écorces de la tige. Le clotrimazole, utilisé comme contrôle positif, a montré une zone d'inhibition de 23,12 mm à 1 mg/mL. Les CMI étaient de 1,25 mg/mL pour

l'extrait des feuilles, 1,50 mg/mL pour l'extrait d'écorces de la tige et 0,025 mg/mL pour le clotrimazole.

Par ailleurs, seul l'extrait des feuilles a montré une efficacité sur *A. niger*, mais avec une activité 1,5 fois inférieure malgré une concentration supérieure par rapport au témoin. L'efficacité des molécules extraites de *F. elastica* semble modérée sur le genre *Aspergillus*.

L'analyse phytochimique a révélé que l'extrait d'écorces de la tige contenait des tanins hydrolysables, des stéroïdes et des saponines, tandis que l'extrait des feuilles contenait des tanins hydrolysables, des flavonoïdes et des alcaloïdes. De plus, la teneur en tanins était supérieure dans l'extrait des feuilles (2,4%) par rapport à celui des tiges (1,3%). L'activité antimicrobienne était globalement similaire pour les deux extraits, la présence de tanins hydrolysables pourrait expliquer cette activité. Des études ultérieures avec les tanins seuls seraient nécessaires pour confirmer ces résultats et attribuer cette efficacité à ces composés. En comparaison avec le contrôle positif, l'utilisation des extraits nécessiterait une concentration supérieure (66). Cette activité modérée pourrait se justifier par la teneur faible en tanins hydrolysables dans les extraits. L'utilisation de molécules pures pourrait éventuellement aboutir à des valeurs de CMI plus alignées sur celles du témoin.

Par ailleurs, l'activité antifongique des tanins hydrolysables extraits des feuilles de Sumac (*Rhus typhina* L.) a été évaluée en déterminant la CMI. La valeur obtenue étant de 4 mg/mL. Cet extrait est composé de galloyl-1,2,4-tri-O-galloyl-b-D-glucose (74,05%), rutine (1,15%), 2,3-di-O-galloyl-b-D-glucose (2,15%), 2-O-galloyl-b-D-glucose (2,10%), 3-O-galloyl-b-D-glucose (2,20%), 6-O-galloyl-b-D-glucose (2,05%), 1,4,6-tri-O-galloyl-b-D-glucose (5,10%), 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-b-D-glucose (10,05 %), quercétine (0,05 %), kaempférol (0,05 %) et acide gallique (1,05%). Ainsi, les composés majoritaires de cet extrait sont les tanins hydrolysables qui pourraient être responsable de cette activité (18).

Puis, la punicalagine, un tanin hydrolysable extrait du jus de grenade, a démontré des propriétés antibactériennes contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *E. coli* et *P. aeruginosa*, avec des CI_{50} respectives à 18,4 $\mu\text{g/mL}$, 9,2 $\mu\text{g/mL}$ et 3,2 $\mu\text{g/mL}$. En comparaison, le contrôle positif qui est la ciprofloxacine permet d'obtenir les CI_{50} suivantes : 0,30 $\mu\text{g/mL}$, 0,03 $\mu\text{g/mL}$ et 0,21 $\mu\text{g/mL}$ contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement (67). Bien que la molécule pure de punicalagine affiche une efficacité inférieure par rapport au témoin, les concentrations d'utilisation pour obtenir une activité antimicrobienne restent faibles.

En outre, dans une autre étude, 22 ellagitannins isolés des fleurs et feuilles de la salicaire, des glands du chêne, des feuilles d'argousier, des inflorescences de la reine des prés, des feuilles du framboisier, des fruits du haritaki, des feuilles et fleurs du géranium des bois et des feuilles du liseron d'argenté ont été testés et ont présentés une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. perfringens* à la concentration de 60 $\mu\text{g/mL}$.

En effet, à cette concentration et après 24h de traitement, la croissance bactérienne de *S. aureus* a été complètement inhibée par la salicarinine A et la rugosine D. Pour *E. coli*, la tellimagrandine II, la rugosine D, l'agrimoniine, la sanguine et la lambertianine C ont permis de réduire la croissance bactérienne de 10^9 CFU/mL à 10^7 CFU/mL. Enfin, pour *C. perfringens*,

la salicarinine A et l'agrimoniine ont diminué la croissance de 10^8 CFU/mL à 10^7 CFU/mL. L'inhibition de la croissance bactérienne s'est avérée plus importante pour *S. aureus* que pour *E. coli* et *C. perfringens* (68).

Activité antibactérienne contre *S. aureus* :

Il s'est avéré que ces 22 composés ont des activités antimicrobiennes avec une diminution significative ($p < 0,05$) pour tous les composés sur la croissance de *S. aureus* après 24 heures de traitement à une concentration de 60 $\mu\text{g/mL}$ [Figure 26].

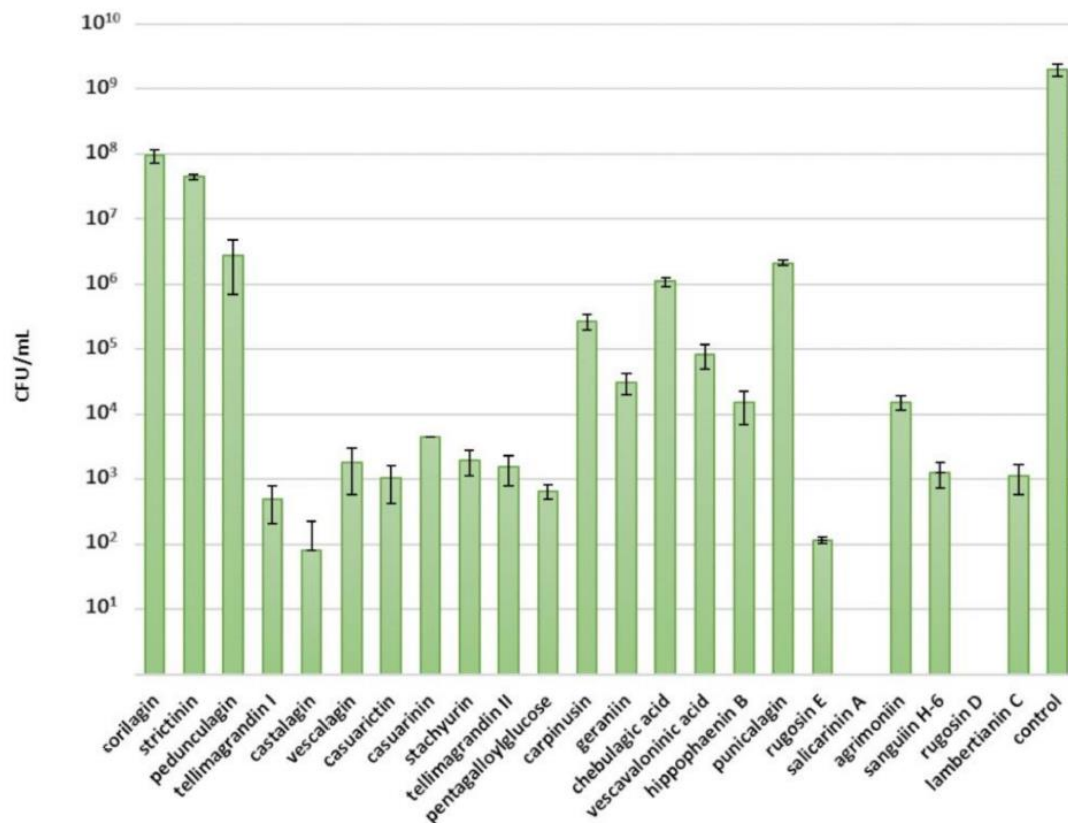


Figure 26 : Croissance de *Staphylococcus aureus* en CFU/mL

Cette activité pourrait s'expliquer par le type de liaison oligomérique de l'ellagitanin puisque les dimères d'ellagitanins avec une liaison m-DOG, comme la salicarinine A et la rugosine D, ont montré une inhibition antimicrobienne plus importante que les oligomères ayant une liaison m-GOD ou m-GOG.

En revanche, la flexibilité moléculaire des ellagitanins ne semble pas avoir d'impact sur l'activité antimicrobienne. De plus, le poids moléculaire ne semble pas avoir de rôle dans l'activité antimicrobienne des ellagitanins (68).

Activité antibactérienne contre *E. coli* :

La majorité de ces 22 composés se sont avérés avoir des activités antimicrobiennes contre *E. coli*. Cette activité pourrait s'expliquer par la taille moléculaire des ellagitanins mais pas par la

flexibilité de la molécule. En effet, les ellagitanins oligomériques ayant un poids moléculaire supérieur à 1700 g/mol ont permis d'inhiber en moyenne à 97% la croissance d'*E. coli*. En revanche, les ellagitanins monomériques n'ont inhibé qu'à 63% la croissance d'*E. coli*. Seules les molécules de punicalagine et tellimagrandine II, qui sont des ellagitanins monomériques, ont montré une inhibition de la croissance de la bactérie à plus de 90% [Figure 27].

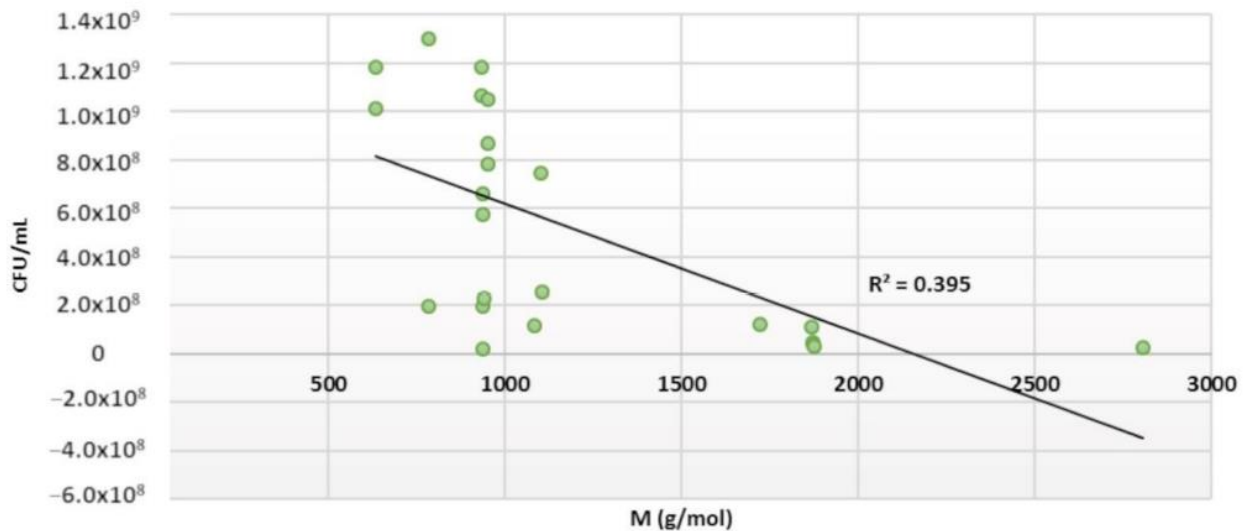


Figure 27 : Effet de la taille moléculaire des ellagitanins sur l'activité antimicrobienne contre *E. coli*

A la différence de *S. aureus*, la liaison oligomérique de l'ellagitanin n'a pas d'impact sur l'activité antimicrobienne. En outre, l'ajout d'un groupement galloyl supplémentaire semble augmenter le potentiel antimicrobien des ellagitanins sur *E. coli*. En effet, la tellimagrandine II et la rugosine D sont plus efficaces que la tellimagrandine I et la rugosine E respectivement [Figure 28] (68).

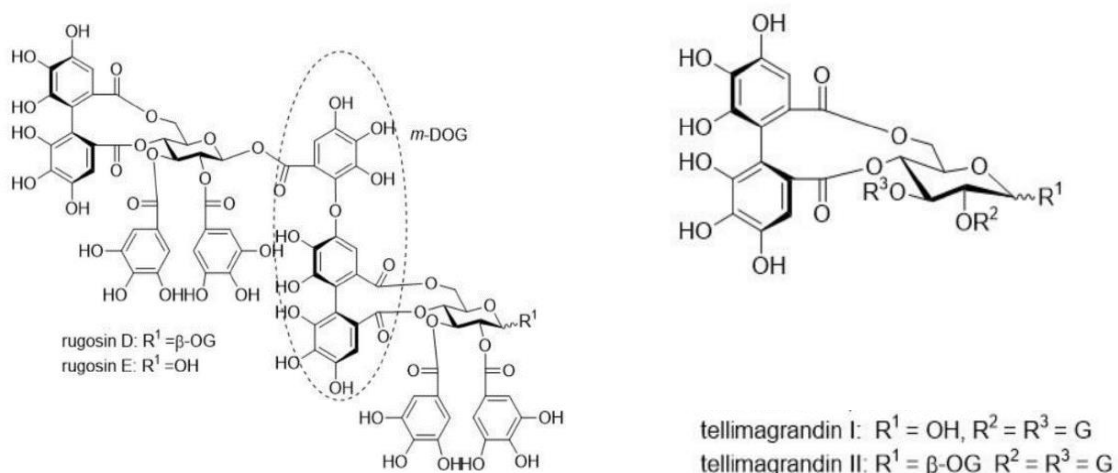


Figure 28 : Structure chimique de la tellimagrandine I et II et de la rugosine D et E

d'inhibition de 25,0 mm a été observé pour une concentration de 10 µg. Par conséquent, l'activité de l'extrait présente une efficacité modérée en comparaison avec le contrôle positif.

En continuant, la composition phytochimique de cet extrait a été analysée, révélant la présence d'alcaloïdes, de saponines et de tanins hydrolysables (75). À la lumière des résultats précédemment décrits, il pourrait être supposé que les tanins hydrolysables, conjointement avec les alcaloïdes, pourraient être responsables de cette activité, étant donné que ces deux familles de composés ont été documentées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes (1,41,65).

Pour conclure sur cette partie, les propriétés antibactériennes et antifongiques des polyphénols et plus précisément des tanins hydrolysables ont largement été décrits ces dernières années. Des divergences dans les résultats et dans l'efficacité de certains composés sont parfois constatées et cela pourrait s'expliquer entre autres par la provenance des végétaux, les méthodes d'extraction, les solvants utilisés et la technique *in vitro* utilisée. De manière générale, les différentes recherches décrites précédemment indiquent un réel intérêt à utiliser les tanins hydrolysables comme potentiel antimicrobien naturel. En revanche, les CMI obtenues tendent à conclure qu'il faut les utiliser à une concentration plus importante puisque l'efficacité est plus modérée si on la compare aux antibiotiques ou aux antifongiques. A noter également que l'activité antifongique des tanins hydrolysables semble plus limitée sur le genre *Aspergillus*.

4.2. Mécanismes d'action des tanins hydrolysables

La littérature décrit plusieurs mécanismes d'action des tanins pour lutter contre les agents pathogènes : inhibition de la phosphorylation oxydative, inhibition des enzymes microbiennes, liaisons aux protéines, modification de l'intégrité membranaire, privation des substrats, et privation en fer. Tous ces modes d'action entraîneront des conséquences sur le métabolisme et la croissance des microorganismes (1,51,58,68,70).

4.2.1. Liaison aux enzymes microbiennes et aux protéines

Les tanins peuvent se lier aux enzymes microbiennes entraînant leur inhibition, ou aux protéines entraînant leur précipitation. Ces deux modes d'action vont conférer aux tanins leurs propriétés antimicrobiennes.

Cette capacité s'explique entre autres par la taille moléculaire, la mobilité conformationnelle et l'affinité des tanins pour l'eau. Selon la structure de la molécule, les tanins peuvent établir des interactions faibles ou fortes avec les protéines (1,51,58,68,70).

4.2.2. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est indispensable au métabolisme des microorganismes pour assurer leur survie. En effet, cette chaîne de transfert des électrons, appelée également chaîne respiratoire, permet la production d'énergie qui est stockée sous forme d'ATP et qui est une source d'énergie indispensable dans le mécanisme de respiration par exemple. Les tanins hydrolysables ont la capacité d'inhiber la phosphorylation oxydative ce qui aurait un impact sur le métabolisme et la croissance des pathogènes (1,51,58,68).

4.2.3. Privation en fer

Les ions métalliques sont des éléments essentiels pour la croissance des microorganismes (58). Les tanins possèdent plus de deux groupes o-diphénol ou catéchol dans leur structure ce qui leur permet de chélater des ions ferriques. Cette complexation des tanins avec le fer va réduire la disponibilité de ces ions métalliques et avoir un impact pour les microorganismes puisque leur association avec des ions métalliques est nécessaire à leur croissance (59). Cela entraînera des conséquences sur le métabolisme des pathogènes. C'est une des propriétés antimicrobiennes des tanins qui les différencient des phénols ayant une structure chimique plus petite (58,68).

4.2.4. Intégrité membranaire

Parmi les autres mécanismes d'action des tanins hydrolysables, on retrouve leur capacité à déstabiliser la membrane cellulaire microbienne entraînant ainsi une modification de la perméabilité (51,58).

En effet, plusieurs tanins hydrolysables ont été étudiés pour évaluer leur impact sur l'intégrité membranaire. Parmi les molécules testées, on retrouve la tellimagrandine I et II, la géraniine, l'épigallocatechine gallate et l'épicatéchine. Un marquage de la membrane a été réalisé avec de la carboxyfluorescéine. La libération de carboxyfluorescéine qui est directement corrélée à la perméabilité membranaire a montré que tous les tanins testés avaient une action sur la membrane (65).

Par ailleurs, les propriétés antimicrobiennes de la corilagine, qui est un tanin hydrolysable, ont été évaluées sur *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*. Cette molécule a empêché la croissance de *E. coli* et *C. albicans* en agissant sur l'intégrité membranaire alors que pour la bactérie *S. aureus*, la corilagine a ciblé les protéines Fib, Sae R et Sar S. En effet, la coloration au cristal violet a permis de mettre en évidence ce phénomène car le colorant pénètre peu dans une membrane intègre mais y pénètre beaucoup plus facilement si l'intégrité membranaire est altérée. Ainsi, l'absorption du colorant par *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* était respectivement de 31,16%, 19,9% et 31,16% lorsque la molécule de corilagine était absente. Et en présence de la molécule à la CMI déterminée, soit 62,5 µg/mL pour *E. coli* et *C. albicans* et 31,25 µg/mL pour *S. aureus*, cette absorption a augmenté à 77,94%, 21,91% et 57,92% respectivement. Si

la concentration augmente à 500 µg/mL, cette absorption est augmentée à 85,06 %, 30,61 % et 75,94 % respectivement [Figure 31]. Ainsi une augmentation significative est observée pour *E. coli* et *C. albicans* uniquement.

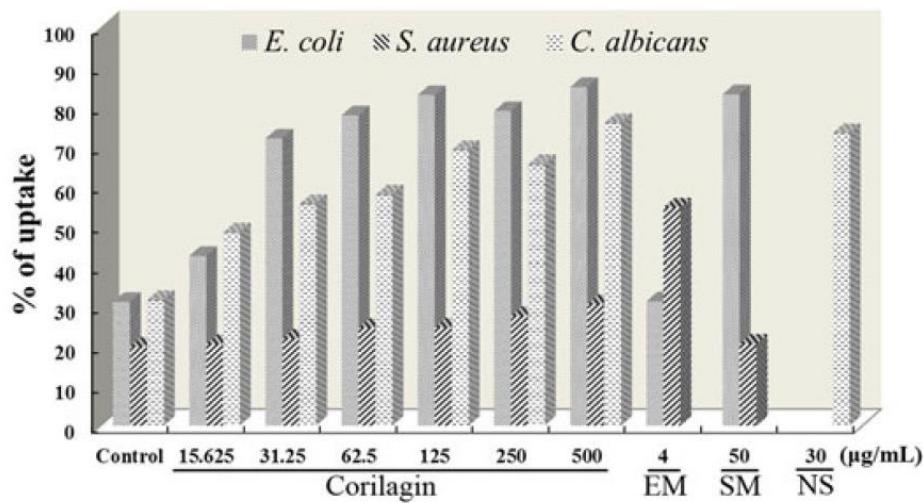


Figure 31 : Absorption du cristal violet par *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* après traitement à la corilagine pendant 8 heures. EM (Erythromycine) et SM (Streptomycine) ont été choisis comme contrôle positif pour *E. coli* et *S. aureus*, et NS (Nystatine) pour *C. albicans*

Cette perte de l'intégrité membranaire va engendrer l'inhibition de la croissance de *E. coli* et *C. albicans* et provoquer la mort du microorganisme. Cela met en lumière l'efficacité des tanins qui varient en fonction de la structure et la composition membranaire des microorganismes. La structure de la membrane entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif est différente avec respectivement une membrane lipidique versus deux membranes cellulaires (membranes interne et externe) [Figure 32].

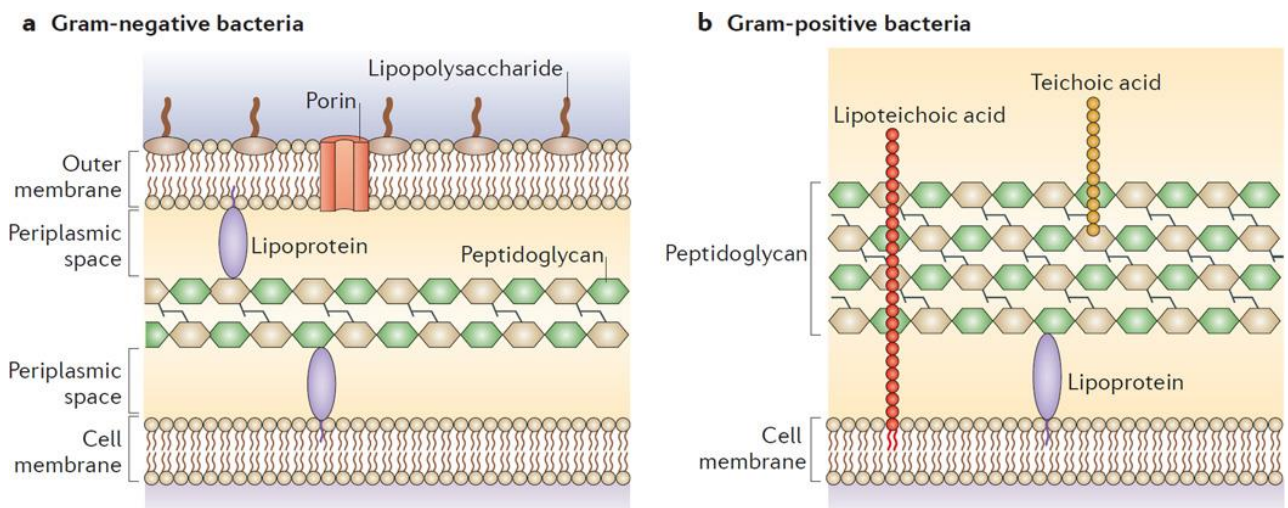


Figure 32 : Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif

Concernant la structure des cellules fongiques, la membrane plasmique est entourée d'une paroi qui est composée de 80 à 90% de polysaccharides. En effet, la paroi est constituée principalement de β -glucane et de chitine qui sont respectivement des polymères de glucose et de N-acétylglucosamine. Des protéines sont également présentes dans cette structure. La paroi est en contact direct avec le milieu extérieur et elle joue un rôle fondamental dans la virulence des champignons à travers les processus d'adhérence et d'invasion [Figure 33] (71).

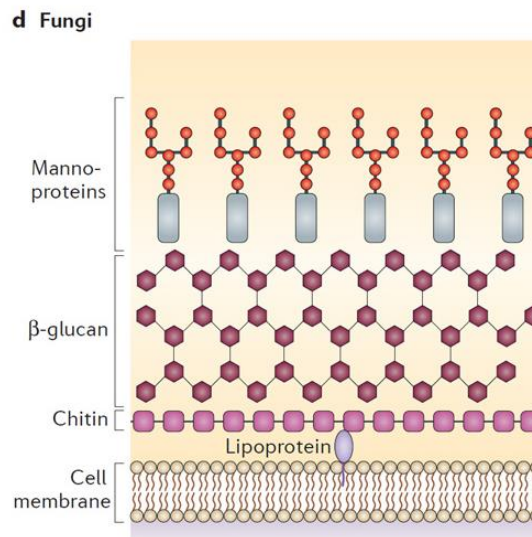


Figure 33 : Structure de la paroi cellulaire des champignons

Ensuite, la localisation de la β -lactamase et de la β -galactosidase, qui sont deux enzymes présentes dans la membrane des bactéries à Gram négatif, a été étudiée chez *E. coli*. La présence de corilagine a entraîné une forte libération de ces deux enzymes dans le milieu. Cette molécule est donc capable de se lier aux membranes externe et interne de *E. coli*, perturbant ainsi l'intégrité de la membrane et provoquant une perte de la fonction barrière. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment avec la coloration au cristal violet.

Enfin, la morphologie de ces différents microorganismes a également été observée par microscopie à force atomique. Pour les cellules non traitées, les membranes ne présentent pas de ruptures notables, ni de pores importants. En revanche, pour les cellules de *E. coli* et *C. albicans* traitées à la corilagine, des changements morphologiques importants sont observés (longueur, largeur, hauteur) confirmant l'augmentation de la perméabilité membranaire. La morphologie de *S. aureus* n'a pas changé malgré le traitement à la corilagine [Figure 34]. Tous ces résultats concordent et indiquent que la corilagine impacte l'intégrité membranaire de *E. coli* et *C. albicans* mais pas celle de *S. aureus* (51).

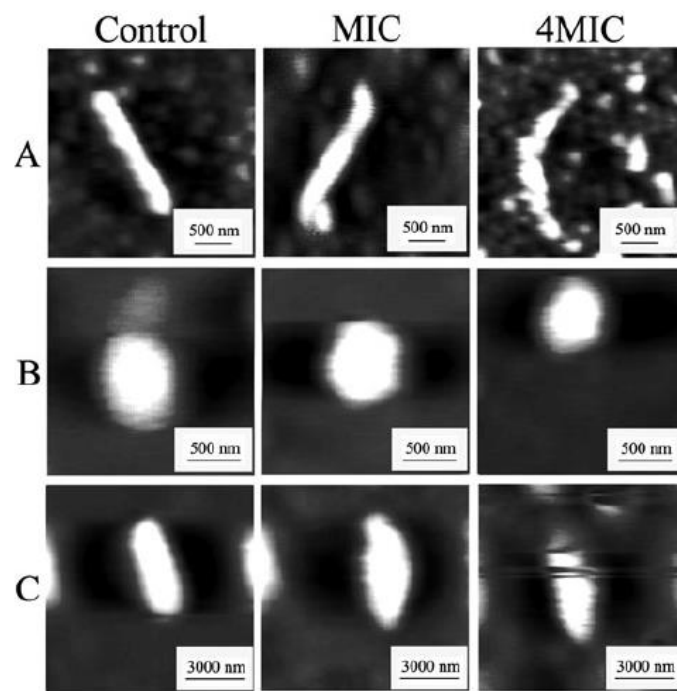


Figure 34 : Images par microscopie à force atomique de *E. coli* (A), *S. aureus* (B) et *C. albicans* (C) traités avec différentes concentrations de corilagine (contrôle, CMI et 4x CMI) pendant 8 heures

Ainsi les tanins hydrolysables agiraient sur la structure des levures et des bactéries à Gram négatif mais n'auraient pas d'action sur la structure des membranes des bactéries à Gram positif. Ces composés agiraient plutôt sur les protéines de virulence pour ces bactéries.

4.2.5. Action sur les protéines de virulence

L'action de la corilagine a été étudiée sur *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* et a montré une diminution du niveau d'expression de Fib, Sae R, Sae S présents chez *S. aureus* et de Tye 7p chez *C. albicans* en comparaison au contrôle non traité par cette molécule (51). Cependant la corilagine n'a pas eu d'action sur l'expression des protéines de *E. coli*.

La protéine Fib est un facteur de virulence présent uniquement chez *S. aureus*. La diminution de l'expression de ces trois protéines chez *S. aureus* permet de diminuer la capacité de cet agent pathogène à s'adapter aux différentes conditions environnementales et a ainsi inhibé sa croissance.

En revanche, après application de la corilagine chez *E. coli*, le niveau d'expression de Sae R et Sae S est inchangé. Cette molécule n'agit donc pas sur les protéines de virulence de cette bactérie à Gram négatif.

Les protéines Tye 7p et Gal 4p jouent un rôle chez *C. albicans* dans son métabolisme énergétique et donc dans sa croissance. Il a été observé une diminution de l'expression de Tye 7p après application de la corilagine qui aura des conséquences sur la croissance de

Candida albicans (51). Cela confirme que la différence membranaire entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif conduit les tanins à agir d'une manière différente.

Pour conclure sur cette partie, l'activité antimicrobienne des tanins implique de nombreux mécanismes d'action qui sont variables d'un microorganisme à l'autre. Cela expliquerait l'efficacité différente de ces molécules entre les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures (59).

V. Cas concret : étude de la plante *Punica granatum*

5.1. Description de la plante

Parmi les plus anciens fruits comestibles connus, on retrouve la *Punica granatum* L. plus connue sous le nom de grenadier. Originaire de Perse, le grenadier s'est ensuite répandu dans les régions à climat chaud en Asie du Sud-Est, en Afrique du Nord, dans tous le Moyen-Orient et en Europe méditerranéenne (61).

Selon la classification phylogénétique APGII, le grenadier appartient aux (72):

- Règne : Plantae
- Classe : Equisetopsida
- Clade : Spermatophyta
- Ordre : Myrtales
- Famille : *Lythraceae*
- Genre : *Punica* L.
- Espèce : *Punica granatum* L.

Le nom du grenadier est dérivé du latin avec pōmum qui signifie la pomme et grānātum qui signifie la graine (73).

Le grenadier est un arbuste dont le fruit, la grenade, est une baie entourée par un calice. Le diamètre du fruit peut atteindre 10 centimètres. Ce fruit est protégé par une écorce coriace de couleur rouge. La grenade contient de nombreuses graines appelées arilles qui sont entourées par une peau blanche et membraneuse [Figure 35]. Le jus de ces graines est rouge et acidulé (67,74).



Figure 35 : Fruit du grenadier

Ce fruit a été utilisé depuis l'Antiquité dans la médecine traditionnelle puisqu'il a été décrit dans les textes Ayurvédiques, Grecs et Egyptiens (67).

En effet, en Europe méditerranéenne, la grenade était largement utilisée pour traiter de nombreuses pathologies tels que la diarrhée, les helminthiases, les hémorragies et les pathologies respiratoires. En Egypte, la grenade était utilisée pour soigner des infections parasitaires tels que le ver solitaire (61). Quant à la médecine traditionnelle ayurvédique, la grenade traitait les ulcères, les aphtes, la diarrhée et permettait de lutter contre les infections parasitaires (4,74).

Différentes parties de la grenade sont valorisées en médecine traditionnelle. Par exemple, les écorces séchées permettent de palier aux maux d'estomac, à la diarrhée et favorise la cicatrisation (1,14). Quant à la coque qui entoure le fruit, elle est utilisée pour traiter les infections parasitaires, les maladies respiratoires, les ulcères et les hémorragies (67). Traditionnellement en Inde, cette coque est exploitée pour ses propriétés anti-diarrhéique, antihelminthique, diurétique et cardiotonique (2). Cette écorce est donc particulièrement intéressante à valoriser car elle représente environ 25 à 30% du fruit et est un sous-produit de l'industrie alimentaire. Elle est composée principalement de tanins hydrolysables et de flavonoïdes.

Actuellement, les intérêts nutritionnels et médicinales pour la grenade ne cessent de croître. En effet, les chercheurs, les industriels mais également les consommateurs sont de plus en plus intéressés par les propriétés biologiques de l'écorce de la grenade (67).

Elle a beaucoup été décrite pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, antidiabétiques et antimicrobiennes (73,75,76).

5.2. Composition phytochimique de la plante

La grenade est composée de nombreuses molécules actives comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins hydrolysables (ellagitanins et gallotanins), les lignanes, les triterpénoïdes, les phytostérols, les acides gras et les acides organiques. Mais parmi toutes ces molécules bioactives, la grenade est décrite pour sa composition riche en polyphénols et plus précisément en tanins hydrolysables avec notamment la punicalagine [Figure 36 ; Tableau 5]. Ces tanins sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ces molécules présentent de nombreuses propriétés pharmacologiques comme des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-hypertensives et antimicrobiennes (61,74).

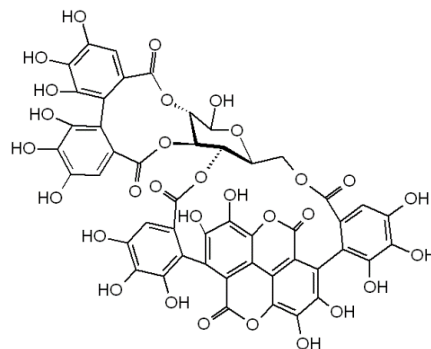


Figure 36 : Structure chimique de la punicalagine

Ces tanins hydrolysables sont particulièrement prédominants dans la coque qui entoure le fruit. En revanche, des alcaloïdes sont retrouvés dans les écorces et les racines du grenadier et pourraient avoir une toxicité. Les alcaloïdes majoritaires sont la pelletière, l'isopelletière, pseudopelletière et méthylpelletière [Tableau 5] (72,77,78).

Tableau 5 : Composition phytochimique de la grenade

Composants de la plante	Composés
Jus de la grenade	Anthocyanes, glucose, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, catéchine, EGCG, quercétine, rutine, nombreux minéraux, en particulier le fer, acides aminés
Huile de pépins de la grenade	95 % d'acide punique, autres constituants dont l'acide ellagique, autres acides gras, stérols
Coque de la grenade	Punicalagine, punicaline, acide gallique, acide ellagique et autres acides gras, catéchine, EGCG, quercétine, rutine et autres flavonols, flavones, flavonones, anthocyanidines
Feuilles du grenadier	Tanins (punicaline et punicalagine) et glycosides de flavones, dont la lutéoline et l'apigénine
Fleurs du grenadier	Acide gallique, triterpénoïdes dont l'acide ursolique, l'acide maslinique et l'acide asiatique, autres constituants non identifiés
Racines et écorces du grenadier	Ellagitannins dont punicaline et punicalagine, nombreux alcaloïdes de pipéridine

Ainsi, en fonction de la partie de la plante utilisée, la composition en molécules bioactives varie.

En effet, des extraits de *P. granatum* provenant du jus de la grenade et de l'écorce qui entoure le fruit ont été comparés (74). La composition et les concentrations en polyphénols totaux sont différentes dans ces deux extraits. Les extraits à partir de l'écorce ont une concentration en polyphénols plus importante. L'extrait du jus contient 2703 ± 18 mg GAE/l, soit $18,6 \pm 2,1\%$ de polyphénols totaux alors que l'écorce contient 3019 ± 26 mg GAE/l soit $20,9 \pm 5,4\%$ de polyphénols totaux.

Le jus de la grenade est composé principalement de polyphénols tels que les anthocyanes (avec essentiellement des glucosides de delphinidine, de cyanidine et de pelargonidine), les tanins hydrolysables (ellagitannins et gallotannins), l'acide hydroxybenzoïque et l'acide hydroxycinnamique. La couleur caractéristique rouge du jus est due aux anthocyanes (73). L'extrait d'écorce est riche en ellagitannins (α - et β -punicalagine et corilagine) et en acide ellagique et ses dérivés glycosylés (74).

Si l'on compare maintenant les écorces qui entourent le fruit avec les arilles, il s'avère que les écorces sont plus riches en composés phénoliques que les arilles avec 249,4 mg/g et 24,4 mg/g respectivement. En effet, dans cette partie de la plante, les tanins hydrolysables peuvent représenter jusqu'à 30%. Cela est d'autant plus intéressant que les écorces représentent le déchet principal de la grenade lors de la production des jus pour le domaine alimentaire (3,70).

En revanche, il a été montré que la quantité de polyphénol totaux, d'acide ellagique et de punicalagine changeaient considérablement entre les variétés de grenadier. La teneur en polyphénols totaux de 21 génotypes de grenadier a été analysée et la concentration variait de 146,0 mg GAE/g à 612,7 mg GAE/g de matière sèche. Pour l'acide gallique, la teneur était comprise entre 0,6 mg/g et 40,1 mg/g de matière sèche. Enfin, pour la punicalagine, la concentration fluctuait entre 1,6 mg/g et 476,7 mg/g de matière sèche (79).

Ces variations ont été confirmées au travers d'une autre étude qui s'est intéressée à la composition et à la concentration des extraits éthanoliques d'écorces de deux variétés de grenade (76). Ces deux variétés étaient essentiellement constituées des composés phénoliques suivants : pédonculagines I et II, acide ellagique, acide ellagique-O-pentoside, et les punicalagines α et β . La composition entre les deux variétés était similaire mais la concentration des composés variait. Par ailleurs, dans ces deux extraits à l'éthanol, les composés majoritaires étaient l' α - et la β -punicalagine qui sont des tanins hydrolysables (76).

Globalement, des fluctuations dans la composition et la concentration en composés phytochimiques des extraits de *P. granatum* sont constatées. Cela pourrait s'expliquer par l'âge de la plante, la partie de la plante utilisée, les solvants d'extractions choisis, le climat et la région où la plante est cultivée mais également la période et la maturité du fruit lors de la récolte, les pratiques agricoles, la méthode d'extraction et les conditions de stockage (78,80).

Pour conclure, l'un des composés bioactifs majoritaires présent chez la grenade et particulièrement dans l'écorce qui entoure le fruit est la punicalagine. Cette molécule est décrite comme ayant des nombreuses propriétés antioxydantes, antiprolifératives, antivirales, immunosuppressives mais également antimicrobiennes (3,14,81).

5.3. Propriétés antimicrobiennes de la plante

La grenade présente des propriétés antivirales notamment sur le virus de l'herpès mais également sur le virus de la grippe. Sa composition en polyphénols et plus particulièrement en

anthocyanines lui confère son activité antioxydante. Elle est également décrite dans la littérature pour ses propriétés antimicrobiennes grâce à sa composition riche en polyphénols et particulièrement en tanins hydrolysables (61,74).

En effet, l'activité antibactérienne du jus de la grenade provenant de trois variétés d'une même espèce végétale a été évaluée. Ces trois variétés ont été appelées "Persephone", "Porphiroyenetî" et "Wonderful" (80). Les fruits utilisés pour cette étude ont été récoltés à la même période et proviennent du même producteur local en Grèce. Les bactéries testées sont : *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* et *Salmonella typhimurium*. Les valeurs des CMI et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) obtenues sont indiquées ci-dessous [Tableau 6].

Tableau 6 : Activité antibactérienne des jus de grenade de "Persephone", "Porphiroyenetî" et "Wonderful"

Bacteria	"Persephone"	"Porphiroyenetî"	"Wonderful"	Ampicillin	Streptomycin
	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)
	MBC (mg mL ⁻¹)	MBC (mg mL ⁻¹)	MBC (mg mL ⁻¹)	MBC (mg mL ⁻¹)	MBC (mg mL ⁻¹)
<i>Bacillus cereus</i>	0.05 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.03 ^{a,b}	0.10 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.00 ^c
<i>Micrococcus flavus</i>	0.10 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.02 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.10 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.00 ^b	0.30 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^b
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.40 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.00 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.01 ^a
<i>Escherichia coli</i>	0.10 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.02 ^c	0.10 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.01 ^d	0.05 ± 0.00 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.20 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.01 ^d	0.10 ± 0.01 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.40 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^b
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.02 ^d	0.30 ± 0.02 ^c
	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.30 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^a
	0.40 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.02 ^c	0.30 ± 0.01 ^a
	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.80 ± 0.01 ^c	0.20 ± 0.02 ^b
	0.20 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^a	1.25 ± 0.01 ^c	0.30 ± 0.01 ^b
	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.40 ± 0.02 ^c	0.30 ± 0.01 ^b
	0.20 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^a	0.70 ± 0.01 ^c	0.50 ± 0.01 ^b
	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.30 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^b
	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.40 ± 0.02 ^c	0.30 ± 0.01 ^b

Les extraits du jus de la grenade ont montré des propriétés antimicrobiennes intéressantes avec une efficacité équivalente voir supérieure à l'ampicilline et à la streptomycine particulièrement sur *P. aeruginosa*. En revanche, sur les bactéries *M. flavus*, *S. aureus*, *E. coli*, les extraits étaient moins efficaces que la streptomycine. En effet, l'activité bactériostatique de ces extraits a été observée à une CMI allant de 0,05 à 0,20 mg/mL et pour l'activité bactéricide, la CMB était comprise entre 0,10 à 0,40 mg/mL. En comparaison, l'ampicilline a une CMI allant de 0,25 mg/mL à 0,80 mg/mL et une CMB de 0,40 mg/mL à 1,25 mg/mL. Quant à la streptomycine, la CMI varie de 0,05 mg/mL à 0,30 mg/mL et l'activité bactéricide varie de 0,20 mg/mL à 0,50 mg/mL.

Ensuite différents champignons ont été testés, on retrouve : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium*

funiculosum, *Penicillium ochrochloron* et *Penicillium verrucosum*. Les valeurs des CMI et des Concentrations Minimales Fongicides (CMF) obtenues sont indiquées ci-dessous [Tableau 7].

Tableau 7 : Activité antifongique des jus de grenade de "Persephone", "Porphyroeneti" et "Wonderful"

Fungi	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	Bifonazole MIC (mg mL ⁻¹)	Ketoconazole MIC (mg mL ⁻¹)
	MFC (mg mL ⁻¹)	MFC (mg mL ⁻¹)	MFC (mg mL ⁻¹)	MFC (mg mL ⁻¹)	MFC (mg mL ⁻¹)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.10 ± 0.02 ^a	0.40 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.00 ^b	0.15 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^c
	0.80 ± 0.01 ^c	0.80 ± 0.03 ^c	0.80 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.02 ^a	0.50 ± 0.02 ^b
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.10 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.002 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.02 ^c
	0.20 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.02 ^c
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.02 ^b	1.50 ± 0.07 ^c
	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	2.00 ± 0.10 ^b
<i>Aspergillus niger</i>	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.20 ^b
	0.20 ± 0.07 ^a	0.20 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.10 ^b
<i>Trichoderma viride</i>	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.10 ^b
	0.10 ± 0.00 ^{a,b}	0.10 ± 0.02 ^{a,b}	0.05 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	1.00 ± 0.10 ^c
<i>Penicillium funiculosum</i>	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^b
	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.02 ^c
<i>Penicillium ochrochloron</i>	0.05 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^{a,b}	0.05 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.01 ^b	2.50 ± 0.10 ^c
	0.10 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^{a,b}	0.10 ± 0.02 ^{a,b}	0.25 ± 0.01 ^b	3.50 ± 0.10 ^c
<i>Penicillium verrucosum</i>	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.02 ^c
	0.20 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.02 ^b

Concernant l'activité antifongique, l'efficacité est également équivalente ou supérieure au bifonazole et au kétoconazole excepté pour *Aspergillus fumigatus* où l'activité est plus faible.

En effet, la concentration varie de 0,03 mg/mL à 0,40 mg/mL pour l'activité fongistatique et de 0,05 mg/mL à 0,80 mg/mL pour l'activité fongicide. Pour le bifonazole, la CMI varie de 0,10 mg/mL à 0,20 mg/mL et la CMF varie de 0,20 mg/mL à 0,25 mg/mL. Pour le kétoconazole, la CMI va de 0,20 mg/mL à 2,50 mg/mL et la CMF varie de 0,20 mg/mL à 3,50 mg/mL.

L'efficacité antimicrobienne du jus de grenade s'explique par sa composition en polyphénols et notamment grâce à sa concentration élevée en tanins hydrolysables, mais aussi grâce aux flavonoïdes, aux acides phénoliques et aux anthocyanes (80). L'utilisation du jus de grenade est intéressante puisque l'efficacité est similaire aux témoins.

Par ailleurs, l'activité antifongique d'extraits d'écorces de grenade sur le champignon *Fusarium oxysporum* a également été étudiée (79). Vingt et un génotypes de grenade ont été évalués et les teneurs en α- et β-punicalagine ont été analysées. Sur ces vingt et un génotypes, neuf provenaient de la région méditerranéenne et douze du Moyen-Orient.

Les résultats obtenus indiquent qu'en comparaison avec le contrôle non traité, tous les extraits se sont montrés plus efficaces avec une croissance du mycélium inférieure. Concernant la comparaison avec le fongicide standard représentant le contrôle positif, onze génotypes sur les vingt et un se sont avérés plus efficaces [Figure 37].

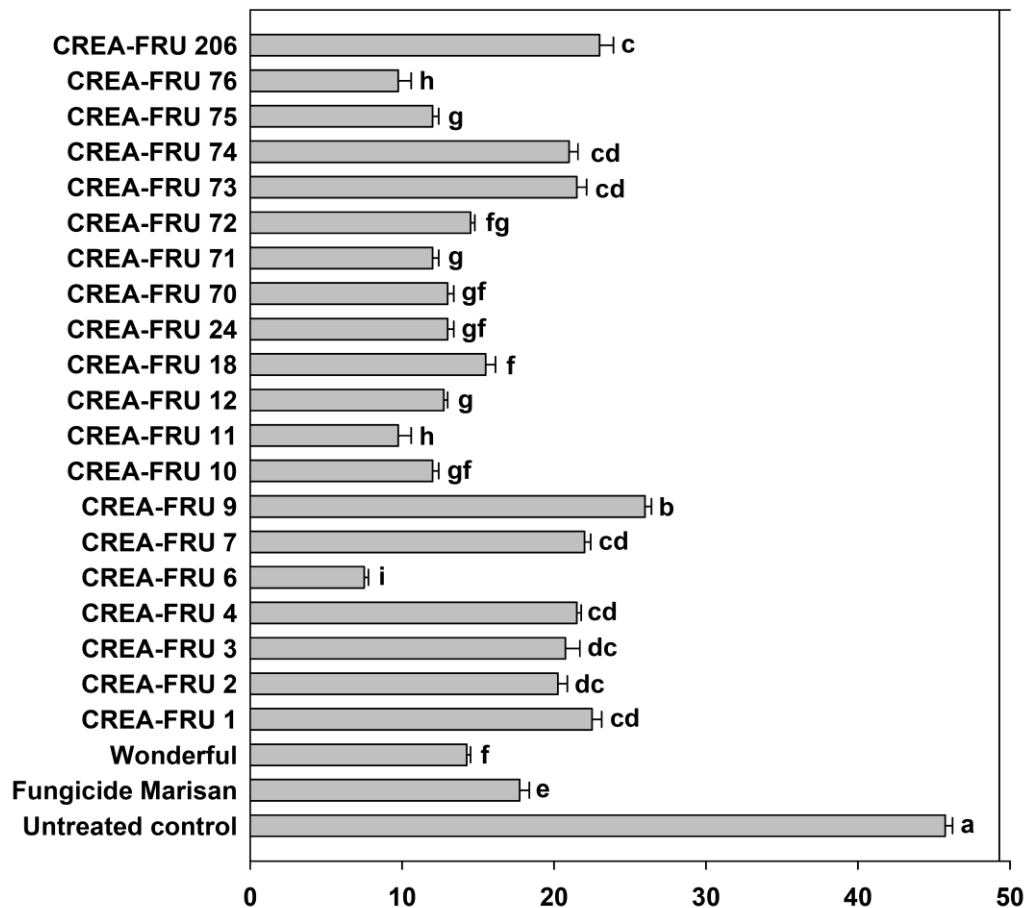


Figure 37 : Croissance des mycéliums de *F. oxysporum* (en mm)

Par ailleurs, il a ensuite été démontré que les génotypes ayant des teneurs importantes en composés phénoliques et en punicalagine étaient significativement corrélées avec l'activité antifongique. Quant aux extraits faibles en composés phénoliques et en punicalagine, l'activité antifongique était faible. En effet, l'écorce de la grenade est une source riche en composés bioactifs qui justifie de cette activité.

Enfin, l'efficacité antifongique de la molécule de punicalagine isolée à partir de l'écorce a été comparée à l'extrait brut et aucune différence d'efficacité n'a été relevée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette molécule est le composé bioactif principal de l'écorce (79).

Une autre étude vient confirmer les résultats précédents puisqu'elle a évalué l'efficacité de l'écorce de la grenade (76). Des extractions avec des solvants de différentes polarités (eau et/ou l'éthanol, acétone et heptane) ont été réalisées sur deux variétés de grenades différentes. Ces extraits ont ensuite été évalués avec le test de diffusion sur gélose pour déterminer leur potentiel antimicrobien sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*. Les résultats ont été concluants sur les deux variétés de grenades pour les extraits eau et/ou éthanol avec des diamètres d'inhibition mesurés jusqu'à 20 mm [Tableau 8]. Les extraits à l'acétone et à l'heptane n'ont donné aucune zone d'inhibition [Figure 38].

Tableau 8 : Diamètres d'inhibition (en mm) d'extraits d'écorces de la grenade sur *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*

Extraction solvent	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027			<i>S. epidermidis</i> ATCC 12,228		
	Blank	Sweet PgP	Sour-sweet PgP	Blank	Sweet PgP	Sour-sweet PgP
Water	0	14	14	0	13	16
Water/ethanol (1:1; v/v)	0	16	17	0	14	17
Ethanol	0	20	19	0	17	17
Acetone	0	0	0	0	0	0
Heptane	0	0	0	0	0	0

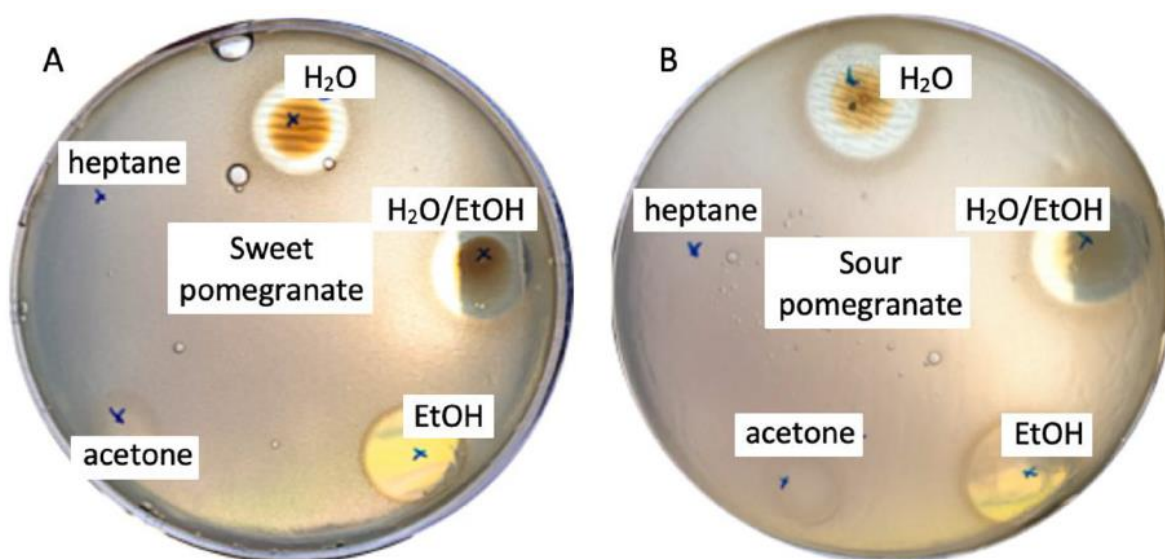


Figure 38 : Essai antimicrobien par diffusion sur agar sur *S. epidermidis* avec des extraits provenant de deux variétés de *P. granatum*

Les extraits à l'éthanol se sont avérés être les plus actifs, suivi par les extraits issus du mélange eau/éthanol puis des extraits à l'eau. Ainsi, dans l'écorce de la grenade, les composés d'intérêt antimicrobiens sont de nature polaire puisque les extraits à l'hexane et à l'acétone n'ont donné aucun résultat.

L' α et β -punicalagine, qui sont les composés majoritaires des extraits éthanoliques d'écorces de grenade, sont à l'origine de cette activité antimicrobienne. En effet, la CMI de ces deux composés purifiés est comprise entre 0,3 et 1,2 $\mu\text{g/mL}$. Ces composés sont efficaces sur 10 des 13 bactéries à Gram positifs testées (principalement des *Staphylococcus* dont *Staphylococcus aureus*, des *Lactobacillus* et des *Enterococcus*), sur 2 des 3 bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) et sur la seule levure testée qui est *Candida albicans*. En revanche, aucune activité de ces molécules n'a été observée jusqu'à la concentration de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ contre les souches suivantes : *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* et *Salmonella enteritidis* qui sont des bactéries à Gram

positif (76). Cela vient confirmer que l'efficacité de l'extrait est variable d'un microorganisme à l'autre. Il aurait été intéressant dans cette étude d'utiliser des antibiotiques comme contrôle positif pour pouvoir comparer les résultats.

Enfin, les efficacités antibactérienne et antifongique d'extraits d'écorces, de graines rouges et blanches, du jus et du fruit entier ont été comparées (77). L'extrait d'écorces s'est avéré avoir l'activité antimicrobienne la plus importante. Parmi les différentes bactéries testées, l'efficacité la plus importante était pour *S. aureus* et pour les champignons contre *A. niger*.

En effet, pour *S. aureus* les diamètres d'inhibition pour les extraits méthanoliques allaient de 10 mm à 25 mm. L'extrait d'écorces de la grenade est celui qui a obtenu le diamètre d'inhibition de 25 mm, suivi par l'extrait du jus de grenade à 23 mm puis les graines rouges à 19 mm, ensuite le fruit entier à 16 mm et enfin les graines blanches à 10 mm [Tableau 9].

Pour *P. aeruginosa*, les diamètres d'inhibition étaient entre 9 mm et 22 mm. L'effet le plus important a été obtenu avec l'écorce, puis le jus et enfin les graines et le fruit entier [Tableau 9].

Pour *E. coli*, le classement reste identique sauf pour le fruit entier qui présente une meilleure efficacité que les graines. Le diamètre d'inhibition de l'écorce est de 20 mm et l'effet le plus faible a été obtenu avec les graines blanches (8 mm) [Tableau 9].

Tableau 9 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits méthanoliques de grenade sur les cultures bactériennes

S.No	Bacterial Culture	MTCC. No	Rind	Diameter of Inhibition Zone in mm (DIZ) ^a			
				Seed		Whole Fruit	Juice
				Red	White		
1.	<i>B. cereus</i>	1307	25	8.0	10.0	10.0	18
2.	<i>B. coagulans</i>	3164	22	4.6*	4.6*	4.6*	10
3.	<i>B. subtilis</i>	6910	18	13.0	10.0	9.0	17
4.	<i>E. coli</i>	732	20	11.0	8.0	15.0	17
5.	<i>K. pneumoniae</i>	7028	20	18.0	9.0	12.0	25
6.	<i>P. aeruginosa</i>	4302	22	10.0	10.0	9.0	21
7.	<i>S. aureus</i>	7405	25	19.0	10.0	16.0	23

Concernant les extraits aqueux, pour *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, le classement reste similaire à celui des extraits méthanoliques hormis pour le jus sur *S. aureus* qui avait un diamètre de 26 mm versus 25 mm pour l'écorce.

Pour *S. aureus*, les diamètres d'inhibition varient entre 10 mm et 26 mm, pour *P. aeruginosa* de 7 mm à 20 mm et pour *E. coli*, de 8 mm à 20 mm [Tableau 10].

Tableau 10 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits aqueux de grenade sur les cultures bactériennes

Diameter of Inhibition Zone in mm (DIZ) ^a							
S.No	Bacterial Culture	MTCC. No	Rind	Seed		Whole Fruit	Juice
				Red	White		
1.	<i>B. cereus</i>	1307	25	7.0	10.0	10.0	26
2.	<i>B. coagulans</i>	3164	23	4.6*	8.0	4.6*	19
3.	<i>B. subtilis</i>	6910	16	9.0	10.0	8.0	15
4.	<i>E. coli</i>	732	20	9.0	8.0	10.0	20
5.	<i>K. pneumoniae</i>	7028	18	12.0	7.0	10.0	20
6.	<i>P.aeruginosa</i>	4302	20	9.0	7.0	9.0	19
7.	<i>S. aureus</i>	7405	25	12.0	10.0	12.0	26

Dans cette étude, d'autres bactéries ont été testées : *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis* et *K. pneumoniae* et ont obtenus des diamètres d'inhibition allant de 18 mm à 25 mm pour l'extrait méthanolique et allant de 16 mm à 25 mm pour l'extrait aqueux d'écorces qui a une activité globalement supérieure aux autres extraits de grenade [Tableau 9 ; Tableau 10].

Ensuite, l'activité antifongique a été évaluée. Pour *A. niger*, les diamètres d'inhibition des extraits méthanoliques allaient de 8 mm à 23 mm, l'extrait d'écorce de la grenade est celui qui a obtenu le diamètre d'inhibition de 23 mm, suivi par l'extrait de jus de grenade à 20 mm puis le fruit entier à 10 mm et enfin les graines rouges et blanches à 10 mm et 8 mm respectivement [Tableau 11].

Tableau 11 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits méthanoliques de grenade sur les cultures fongiques

Diameter of Inhibition Zone in mm (DIZ) ^a							
S.No	Fungal Culture	MTCC. No	Rind	Seed		Whole Fruit	Juice
				Red	White		
1.	<i>A. niger</i>	2196	23	10.0	8.0	10.0	20
2.	<i>M. indicus</i>	3318	15	5.0	6.0	5.5	12
3.	<i>P. citrinum</i>	7124	22	8.0	6.0	8.0	18
4.	<i>R. oryzae</i>	1987	19	6.0	7.0	4.8	13
5.	<i>T. reesei</i>	3929	18	9.0	5.0	8.0	10

Concernant l'extrait aqueux, l'efficacité la plus importante a également été retrouvée pour *A. niger*. L'extrait d'écorce de la grenade a obtenu le diamètre d'inhibition de 22 mm, suivi par l'extrait de jus de grenade à 19 mm puis le fruit entier à 12 mm et enfin les graines rouges et blanches à 10 mm et 9 mm [Tableau 12].

Tableau 12 : Diamètre d'inhibition (en mm) des différents extraits éthanoliques de grenade sur les cultures fongiques

S.No	Fungal Culture	MTCC. No	Rind	Diameter of Inhibition Zone in mm (DIZ) ^a			
				Seed		Whole Fruit	Juice
				Red	White		
1.	<i>A. niger</i>	2196	22	10.0	9.0	12.0	19
2.	<i>M. indicus</i>	3318	15	6.0	5.5	6.0	11
3.	<i>P. citrinum</i>	7124	20	8.0	8.0	10.0	18
4.	<i>R. oryzae</i>	1987	17	5.0	6.0	8.0	12
5.	<i>T. reesei</i>	3929	16	5.0	5.0	9.0	10

Dans cette étude, d'autres champignons ont été testés : *M. indicus*, *P. citrinum*, *R. oryzae*, *T. reesei* et ont obtenus des diamètres d'inhibition allant de 15 mm à 22 mm pour l'extrait méthanolique et allant de 15 mm à 20 mm pour l'extrait aqueux d'écorces qui a une activité globalement supérieure aux autres extraits de grenade [Tableau 11 ; Tableau 12].

Ces résultats mettent en lumière la présence de composés antimicrobiens dans la grenade et particulièrement dans l'écorce qui entoure le fruit. Les principaux constituants de ces extraits étant les tanins hydrolysables, nous pourrions supposer que ces composés seraient responsables de cette activité. Pour confirmer ces résultats, il serait nécessaire de tester les composés purifiés et non les extraits de plantes. Par ailleurs, l'extrait au méthanol a une activité globalement légèrement plus importante que l'extrait aqueux (77).

Pour conclure, les résultats antimicrobiens ont été concluants avec une activité similaire voir supérieure aux témoins. Par ailleurs, il s'est avéré que les extraits issus de l'écorce de la grenade ont une activité antimicrobienne plus importante que les extraits de graines ou du jus de grenade avec une efficacité sur les Gram positif, les Gram négatif et les levures et moisissures (74,76).

L'obligation légale pour tous les fabricants de produits finis en cosmétique est de s'assurer de la conformité microbiologique des produits à l'aide de la méthode du challenge test. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail à l'action des tanins hydrolysables sur les cinq microorganismes évalués dans cette méthode : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*.

5.3.1. Activités antibactériennes sur *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne sur *S. aureus* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur trois extraits de plantes : *Punica granatum*, *Cistus salviifolius* et *Citrus paradisi* ainsi que sur des composés phénoliques purs : acide gallique, punicalagine, quercétine-3-glucuronide, myricétine, naringénine et acide ellagique (70). 29 isolats de *S. aureus* ont été testés. L'isolat était considéré comme sensible au composé testé dès lors qu'un halo d'inhibition était observé, quel que soit son diamètre. Ainsi deux extraits botaniques (*C. salviifolius* et de *P. granatum*)

et trois composés purs (punicalagine, quercétine-3-glucuronide et acide gallique) se sont avérés efficaces contre cette bactérie. Parmi ces trois composés purs, le plus efficace est la molécule de punicalagine or il s'agit du composé principal des deux extraits [Tableau 13].

Tableau 13 : Pourcentage d'isolats sensibles à *S. aureus* pour chaque extrait ou composé pur

	<i>C. salviifolius</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>P. granatum</i>	acide gallique	punicalagine	quercétine-3-glucuronide	myricétine	naringénine	acide ellagique
<i>S. aureus</i>	65,5	0	62,1	24,1	72,4	3,4	0	0	0

Les deux extraits ont donc été sélectionnés pour la suite de l'étude et ont été testés contre 100 souches de *S. aureus* dont 50 SARM en utilisant cette fois la méthode de la micro-dilution pour déterminer la CMI₅₀.

Les résultats les plus concluants ont été obtenus avec les extraits de *C. salviifolius* et de *P. granatum*, dont les CMI₅₀ étaient comprises entre 50 µg/mL et 80 µg/mL.

Ces deux extraits sont composés essentiellement de tanins hydrolysables : ellagitanins et gallotanins avec principalement de la punicalagine avec des teneurs de 32,8% et 30,5% pour les extraits de *C. salviifolius* et de *P. granatum* respectivement or la punicalagine est la molécule pure la plus efficace parmi les 6 composés testés avec la méthode du disque (5,70).

En comparaison, l'activité de la punicalagine, principal composé actif de l'écorce de la grenade a été évaluée contre *S. aureus* (14). Ce composé s'est avéré avoir une efficacité contre 7 souches de cet agent pathogène avec une CMI de 250 µg/mL. L'activité inhibitrice sur la croissance avait également été évalué avec une zone d'inhibition de 11 mm à la concentration de 1 mg/mL de punicalagine et de 13 mm à 2 mg/mL [Tableau 14].

Tableau 14 : Diamètre d'inhibition (en mm) de la punicalagine sur *S. aureus*

	Concentration (en mg/mL)	Diamètre d'inhibition sur <i>S. aureus</i> (en mm)
Punicalagine	1	11
	2	13

La cinétique d'inhibition a également été étudiée. A la CMI obtenue de 250 µg/mL, la punicalagine a diminué le nombre de cellules viables de *S. aureus*. Lors de l'utilisation de la punicalagine à 2 fois voir 4 fois la CMI, le nombre de cellules viables a diminué de manière

beaucoup plus rapide et au bout de 24 heures, le nombre de cellules viables était inférieur à la limite de détection [Figure 39].

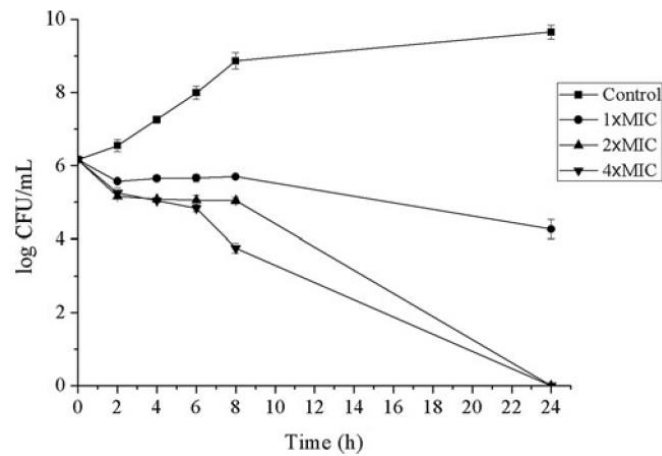


Figure 39 : Effet de la punicalagine sur la croissance de *S. aureus*

Ce composé, présent majoritairement dans l'écorce de la grenade, possède un effet bactéricide sur cette bactérie.

Par ailleurs, le mécanisme d'action de la punicalagine sur *S. aureus* a été étudié. La molécule provoque des dommages sur l'intégrité de la membrane cellulaire et impact la formation du biofilm. En effet, l'intégrité membranaire a été observée par microscopie électronique à balayage et à transmission. En l'absence de punicalagine, les cellules de *S. aureus* montrent une surface lisse, de taille uniforme alors qu'après application de la punicalagine, les cellules sont agrandies, non uniformes et de surface rugueuse. Plus la concentration en punicalagine augmente, plus la déformation des cellules est importante [Figure 40].

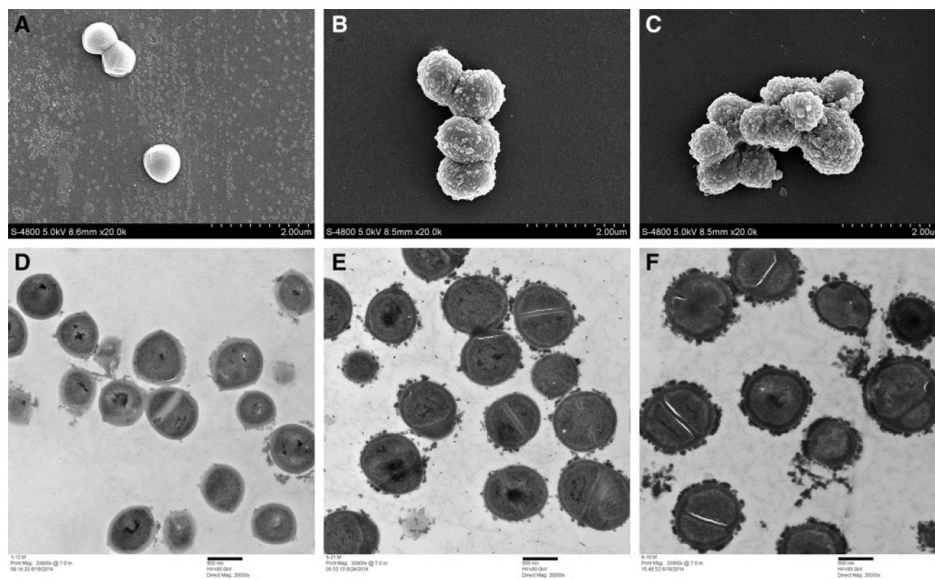


Figure 40 : Microscopie électronique à balayage (A - B - C) et à transmission (D - E - F) de *S. aureus* traités avec différentes concentrations de punicalagine. (A et D) : contrôle ; (B et E) : cellules traitées avec 2 x CMI de punicalagine ; (C et F) : cellules traitées avec 4 x CMI de punicalagine

Concernant la formation du biofilm, la coloration au cristal violet a été utilisée. La punicalagine montre un effet inhibiteur significatif sur la formation du biofilm de *S. aureus* à des concentrations inférieures à la CMI, dès 4 µg/mL [Figure 41].

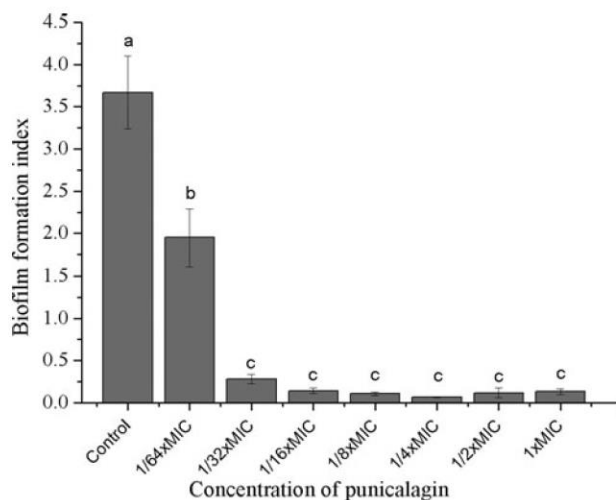


Figure 41 : Activité anti-biofilm de la punicalagine contre *S. aureus*

Ainsi, ce composé actif majoritaire dans l'écorce de la grenade possède des activités antibactériennes et anti-biofilms intéressantes (14).

Par ailleurs, l'étude de Machado confirme ces résultats car la punicalagine extraite des fruits de *P. granatum* par l'acétate d'éthyle, a également montré une efficacité contre *S. aureus* résistant à la méticilline. En effet, l'activité de la punicalagine a montré une zone d'inhibition de 20 mm à 250 µg et la CMI obtenue était de 61,5 µg/mL (75). Ainsi la punicalagine fait partie des composés responsables de l'activité antibactérienne de la grenade.

Dans une autre étude, l'activité antibactérienne d'extraits d'écorces et de jus de la grenade contre *S. aureus* a été évaluée (74). Les polyphénols ont été extraits dans un mélange éthanol et eau à 50% car c'est un des solvants d'extraction le plus efficace en termes de rendement en polyphénols totaux. La teneur en polyphénols totaux est plus importante dans l'écorce que dans le jus avec respectivement 20,9% et 18,6% de polyphénols.

Les composés d'intérêts qui ont été extraits sont les suivants : des anthocyanes, des catéchines, des tanins et des acides galliques et ellagiques.

L'efficacité de ces deux extraits sur la croissance *S. aureus* a été évaluée. Les deux extraits se sont montrés efficaces avec une inhibition de la croissance de cette bactérie. En effet, le contrôle positif qui est l'ampicilline, à la dose de 0,08 mg/disque, a montré une efficacité sur *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 15 mm. En comparaison, le jus à la concentration de 20 mg/disque a induit un diamètre d'inhibition de 13 mm. Quant à l'extrait d'écorce, son activité antibactérienne est plus importante et se rapproche de celle du contrôle positif avec une zone d'inhibition allant de 15 à 30 mm pour des concentrations compris entre 2 et 8 mg/disque [Tableau 15].

Tableau 15 : Diamètre d'inhibition (en mm) de différents extraits de la grenade sur *S. aureus*

	Concentration (mg/disque)	Diamètre d'inhibition sur <i>S. aureus</i> (en mm)
Jus de grenade	20	13
Ecorce de la grenade	2 et 8	15 à 30
Ampicilline	0.08	15

Ainsi, les extraits hydroalcooliques de la grenade ont une efficacité *in vitro* sur les bactéries à Gram positifs tels que *S. aureus*. Et cette différence d'efficacité entre les deux extraits pourrait s'expliquer par la teneur en polyphénols mais également par la composition qui diffère. En effet, le jus de la grenade est riche en anthocyanes alors que l'écorce est composée principalement d'acides ellagiques, d'acides galliques et de punicalagine. En revanche, en comparaison avec le contrôle positif, le diamètre d'inhibition est similaire pour l'extrait d'écorce mais nécessite une concentration plus importante.

Par la suite, les activités bactériostatique et bactéricide, avec la détermination des CMI et des CMB, ont été évaluées par la méthode de micro-dilution. Pour l'ampicilline, la CMI était de 10 µg/µL et la CMB de 280 µg/µL. Pour le jus, une CMI de 65 µg/µL a été obtenue et une CMB de 160 µg/µL. Et pour l'écorce la CMI était de de 20 µg/µL et la CMB de 50 µg/µL [Tableau 16].

Tableau 16 : Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits de la grenade sur *S. aureus*

	CMI contre <i>S. aureus</i> (en µg/µL)	CMB contre <i>S. aureus</i> (en µg/µL)
Jus de grenade	65	160
Ecorce de la grenade	20	50
Ampicilline	10	280

Ces résultats indiquent une efficacité similaire voir supérieure au contrôle positif sur *S. aureus*. De plus, les efficacités bactériostatique et bactéricide sont également supérieures pour l'extrait d'écorces par rapport au jus. Il est donc intéressant d'exploiter ce déchet du domaine agro-alimentaire pour extraire les molécules bioactives (74).

En complément, l'utilisation du péricarpe de la grenade en tant qu'antimicrobien a également été évalué (2). Des extractions aqueuse, méthanolique et éthanolique ont été évaluées contre *S. aureus*. La méthode de diffusion a permis d'obtenir les diamètres d'inhibition suivants : 25,5

mm, 22,5 mm et 25,5 mm pour les extraits à l'eau, au méthanol et à l'éthanol respectivement et à une concentration d'extrait à 500 mg/mL.

Un antibiotique, la tétracycline a été utilisé en tant que contrôle positif et le diamètre d'inhibition était quant à lui de 23 mm en moyenne. Les extractions à l'eau et à l'éthanol donnent de meilleurs résultats et globalement les trois extraits apparaissent comme ayant une efficacité similaire à l'antibiotique (2).

Enfin dans une autre étude, des extraits de graines de grenade obtenus par macération à l'éthanol ou à l'hexane ou bien par l'utilisation d'un Soxhlet avec comme solvant l'éthanol ont été analysés pour leurs propriétés antimicrobiennes sur *S. aureus* (73). L'ampicilline a été utilisée comme contrôle positif [Tableau 17].

Tableau 17 : Activité antimicrobienne des extraits de graines de *P. granatum* sur *S. aureus*

	Technique d'extraction	Solvant d'extraction	Concentration testée (en mg/mL)	Diamètre d'inhibition sur <i>S. aureus</i> (en mm)
Extrait de graines	Macération	Ethanol	0,5	6
			1	12
Ampicilline			1	18
Extrait de graines	Soxhlet	Ethanol	0,5	5
			1	12
Ampicilline			1	11
Extrait de graines	Macération	Hexane	0,5	0
			1	0
Ampicilline			1	10

Un effet inhibiteur sur *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 6 mm et 12 mm pour des concentrations respectives de 0,5 mg/mL et 1 mg/mL a été observé pour l'extrait obtenu par macération de l'éthanol. L'ampicilline a obtenu un diamètre d'inhibition de 18 mm à la concentration de 1 mg/mL.

Pour l'extrait à l'éthanol avec le soxhlet, des diamètres d'inhibition de 5 mm et 12 mm pour des concentrations respectives de 0,5 mg/mL et 1 mg/mL d'extraits ont été observés. Le contrôle positif à la concentration de 1 mg/mL a obtenu un diamètre d'inhibition de 11 mm.

En revanche, l'extrait à l'hexane n'a montré aucune activité. Cela confirme que les composés d'intérêts sont de nature polaire.

L'utilisation de l'éthanol est donc un bon solvant pour isoler les composés bioactifs des graines de la grenade. L'activité antibactérienne des extraits est similaire à l'ampicilline à concentration équivalente. Cela confirme l'intérêt d'utiliser la grenade en tant qu'antimicrobien naturel (73).

5.3.2. Activités antibactériennes sur *Escherichia coli*

L'activité antibactérienne de l'écorce de la grenade a été évaluée sur *E. coli* à partir d'extraits à l'hexane, acétate d'éthyle et méthanol (82). Pour une concentration d'extraits à 2,5 mg/mL, les diamètres d'inhibition obtenus sont respectivement 8 mm, 16 mm et 13 mm.

En comparaison, le contrôle positif qui est la streptomycine à la concentration de 10 µg/ disque, a obtenu un diamètre d'inhibition de 24 mm [Tableau 18].

Tableau 18 : Diamètre d'inhibition (en mm) d'un extrait d'écorce de grenade sur *E. coli*

Name of the pathogen	Antibacterial activity of extract (2.5 mg/ml) Zone of inhibition (mm)			Streptomycin (10 µg/disc)
	Hexane	Ethyl Acetate	Methanol	
MTCC Isolates				
<i>Escherichia coli</i> MTCC 441	8 ± 1	16 ± 1	13 ± 2	24 ± 1

L'extrait à l'acétate d'éthyle semble le plus efficace, en revanche, en comparaison avec le contrôle positif, il est nécessaire d'avoir une concentration plus importante pour obtenir une activité antibactérienne qui reste plus faible qu'avec la streptomycine (82). Ces solvants d'extraction ne permettent peut-être pas d'extraire complètement les composés d'intérêt justifiant cette activité plus faible.

L'utilisation du péricarpe en tant qu'antimicrobien a également été évalué (2). Des extractions aqueuse, méthanolique et éthanolique ont été évaluées sur *E. coli*.

La méthode de diffusion a permis d'obtenir les diamètres d'inhibition suivants : 22,5 mm, 21 mm et 22,5 mm pour les extraits à l'eau, au méthanol et à l'éthanol respectivement et à une concentration d'extrait à 500 mg/mL. Les extractions à l'eau et à l'éthanol donnent les meilleurs résultats [Figure 42].

Un antibiotique, la tétracycline a été utilisée en tant que contrôle positif et le diamètre d'inhibition était quant à lui de 23,7 mm en moyenne.

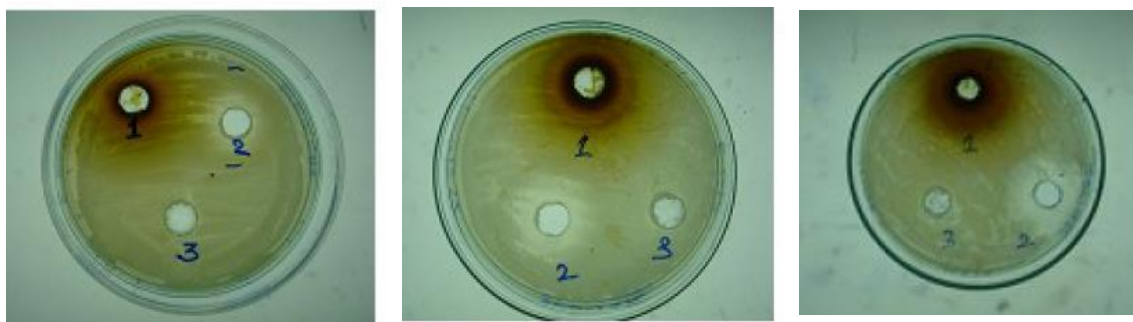


Figure 42 : Antibiogramme de l'extrait aqueux (gauche), de l'extrait méthanolique (milieu) et éthanolique (droite) contre *E. coli*

Légende : 1: extrait ; 2 : tétracycline ; 3 : eau distillée

Les extractions à l'eau et à l'éthanol donnent les meilleurs résultats mais globalement les trois extraits apparaissent comme ayant une efficacité similaire à l'antibiotique (2).

Enfin, une autre étude s'est intéressée aux extraits issus du jus et de l'écorce obtenus à partir de la grenade et l'efficacité antibactérienne contre *E. coli* a été évaluée. Les polyphénols ont été extraits dans un mélange éthanol et eau à 50%. La teneur en polyphénols totaux est plus importante dans l'écorce que dans le jus avec 20,9% et 18,6% de polyphénol respectivement. Les composés d'intérêts extraits sont les suivants : des anthocyanes, des catéchines, des tanins et des acides galliques et ellagiques.

L'efficacité de ces deux extraits sur la croissance de *E. coli* a été évaluée. Les deux extraits se sont montrés efficaces avec une inhibition de la croissance de cette bactérie. En effet, le contrôle positif qui est l'ampicilline, à la dose de 0,08 mg/disque, a montré une efficacité sur *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm.

En comparaison, le jus à la concentration de 20 mg/disque a également induit un diamètre d'inhibition de 30 mm.

Quant à l'extrait d'écorce, son activité antibactérienne est plus importante et se rapproche de celle du contrôle positif avec une zone d'inhibition allant de 15 à 30 mm pour des concentrations compris entre 2 et 8 mg/disque. Cependant, la concentration d'extraits reste supérieure pour obtenir une efficacité comparable au témoin [Tableau 19].

Tableau 19 : Diamètre d'inhibition (en mm) de différents extraits de grenade sur *E. coli*

	Concentration (mg/disque)	Diamètre d'inhibition sur <i>E. coli</i> (en mm)
Jus de grenade	20	30
Ecorce de la grenade	2 et 8	15 à 30
Ampicilline	0,08	30

Ainsi, les extraits hydroalcooliques de la grenade ont une efficacité *in vitro* sur les bactéries à Grams négatifs tels que *E. coli*. La différence d'efficacité entre les deux extraits pourrait s'expliquer par la teneur en polyphénols mais également par la composition qui diffèrent. En effet, le jus de la grenade est riche en anthocyanes alors que l'écorce est composée principalement d'acides ellagiques et galliques et en punicalagine.

Par la suite, les activités bactériostatique et bactéricide avec la détermination des CMI et des CMB ont été évaluées par la méthode de micro-dilution.

Pour l'ampicilline, la CMI était de 5 µg/µL et la CMB de 40 µg/µL. Pour le jus, une CMI de 40 µg/µL et une CMB de 160 µg/µL ont été observés. Et pour l'écorce, une CMI de 30 µg/µL et une CMB de 70 µg/µL ont été obtenues [Tableau 20].

Tableau 20 Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits de la grenade contre *E. coli*

	CMI contre <i>S. aureus</i> (en µg/µL)	CMB contre <i>S. aureus</i> (en µg/µL)
Jus de grenade	40	160
Ecorce de la grenade	30	70
Ampicilline	5	40

Ces résultats indiquent une efficacité relativement similaire entre l'extrait d'écorce et le contrôle positif sur *E. coli*. L'utilisation de l'écorce de grenade riche en molécules bioactives paraît envisageable pour une activité antibactérienne (74).

5.3.3. Activités antibactériennes sur *Pseudomonas aeruginosa*

L'utilisation du péricarpe en tant antimicrobien a été évalué. Des extractions aqueuse, méthanolique et éthanolique ont été évaluées sur *P. aeruginosa*. La méthode de diffusion a permis d'obtenir les diamètres d'inhibition suivants : 22 mm, 23,5 mm et 25,5 mm pour les extraits à l'eau, au méthanol et à l'éthanol respectivement et à la concentration de 500 mg/mL. L'extraction à l'éthanol donne les meilleurs résultats. La tétracycline a été utilisée en tant que contrôle positif et le diamètre d'inhibition était de 22,8 mm. L'extraction à l'éthanol donne les meilleurs résultats et les trois extraits apparaissent comme ayant une efficacité similaire à l'antibiotique (2).

Dans une autre étude, des extraits de graines de grenade obtenus à partir d'une macération à l'éthanol ou à l'hexane ou bien l'utilisation d'un soxhlet avec comme solvant l'éthanol ont été analysés pour leurs propriétés antimicrobiennes sur *P. aeruginosa*. L'ampicilline a été utilisée comme contrôle positif à la dose de 1 mg/mL [Tableau 21].

Tableau 21 : Activité antimicrobienne des extraits de graines de *P. granatum* sur *P. aeruginosa*

	Technique d'extraction	Solvant d'extraction	Concentration testée (mg/mL)	Diamètre d'inhibition sur <i>P. aeruginosa</i> (en mm)
Extrait de graines	Macération	Ethanol	0,5	2
			1	16
Ampicilline			1	20
Extrait de graines	Soxhlet	Ethanol	0,5	6
			1	12
Ampicilline			1	16
Extrait de graines	Macération	Hexane	0,5	0
			1	0
Ampicilline			1	17

L'extrait obtenu par macération à l'éthanol a montré un effet inhibiteur sur *P. aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 16 mm à la concentration de 1 mg/mL. L'ampicilline a montré un diamètre d'inhibition similaire de 20 mm à concentration équivalente.

Pour l'extrait avec le soxhlet, des diamètres d'inhibition de 6 mm et 12 mm pour des concentrations respectives de 0,5 mg/mL et 1 mg/mL ont été obtenus. Le témoin a présenté un diamètre d'inhibition comparable à 16 mm à la concentration 1 mg/mL.

En revanche, l'extrait à l'hexane n'a montré aucune activité (73).

L'éthanol est donc un bon solvant pour extraire les composés d'intérêt des graines comparé à l'hexane qui ne permet pas d'isoler les molécules ayant une activité antibactérienne.

5.3.4. Activités antifongiques sur *Candida albicans*

Différents extraits de la grenade ont été testés sur *C. albicans*. Les extraits testés ont été réalisés à partir des arilles et des graines, du péricarpe, de l'écorce et du fruit entier (27). La

nystatine est utilisée en tant que contrôle positif [Tableau 22]. Les composés majoritaires de ces extraits sont la punicalagine et le galladylacton.

Tableau 22 : Activité antifongique des extraits éthanoliques de *P. granatum* sur *C. albicans*

CMI (en µg/mL)	Extrait graines et arilles	Extrait péricarpe	Extrait écorce de la grenade	Extrait fruit	Nystatine
Après 24 heures	≥ 1000	125	125	500	3,9
Après 48 heures	ND	250	250	1000	3,9

Parmi ces différents extraits, ceux issus de l'écorce et du péricarpe ont obtenus l'activité antifongique la plus importante. En effet, des effets antimicrobiens ont été constatés après 24 heures pour les extraits provenant du péricarpe, de l'écorce et du fruit entier mais pas pour ceux issus des arilles et des graines. Les CMI de l'écorce et du péricarpe étaient de 125 µg/mL contre 3,9 µg/mL pour la référence qui est la nystatine. Après 48 heures, ces mêmes extraits ont continué à montrer une efficacité, les extraits de péricarpe et de l'écorce présentant encore la plus forte activité inhibitrice contre *C. albicans*. Les valeurs des CMI étant de 250 µg/mL contre 3,9 µg/mL pour la nystatine. Une efficacité antifongique est donc bien constatée pour les extraits de la grenade mais à des concentrations bien importantes que l'antifongique de référence.

La punicalagine est le composé majoritaire isolé des extraits issus du péricarpe et de l'écorce mais cette molécule n'est pas retrouvée en quantité significative dans les arilles et les graines. Elle serait donc à l'origine de cette activité antifongique. Par ailleurs, le gallagylacton est un tanin retrouvé dans l'extrait du péricarpe et pourrait également justifier de cette activité. Ainsi la punicalagine et le gallagylacton seraient les deux composés majoritaires impliqués dans l'activité antifongique.

Cependant, après 48 heures, les deux extraits ainsi que la nystatine ont été inoculés sur une gélose de Sabouraud montrant une activité fongistatique pour les extraits, tandis que la nystatine a montré une activité fongicide sur la croissance de *C. albicans*.

Ensuite l'action de ces extraits a été évaluée par microscopie électronique sur la morphologie et la structure de *C. albicans* [Figure 43].

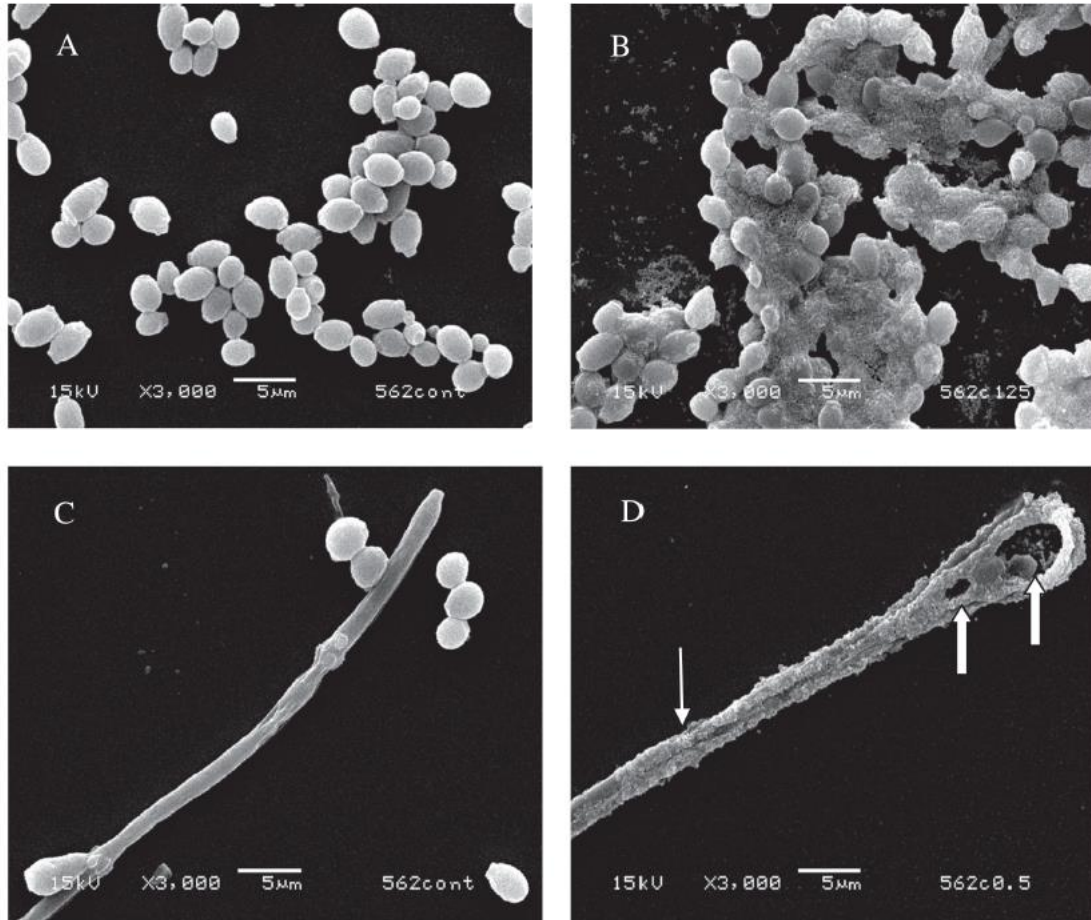


Figure 43 : Microscopie électronique à balayage : A. Cellules témoins de *Candida albicans*, B. Cellules traitées avec 125 µg/mL d'extrait d'écorces, C. *Candida albicans* hyphe témoin, D. Cellules traitées avec 500 µg/mL d'extrait d'écorce avec desquamation (flèche fine) et rupture dans la cellule (flèches épaisses)

Il a été observé que les cellules étaient agrégées et produisaient une substance visqueuse lorsqu'elles sont traitées avec l'extrait d'écorces. Des altérations morphologiques des levures ont également été observées avec une membrane irrégulière, des hyphes avec des desquamations et un épaississement et une irrégularité de la paroi cellulaire pour les levures traitées avec l'extrait. En revanche, les cellules non traitées présentaient une surface homogène, des hyphes et une membrane cytoplasmique normales et une paroi cellulaire fine. Ainsi, les extraits ont un impact important sur la structure cellulaire des levures.

En conclusion, les extraits de péricarpe et d'écorce de la grenade riche en tanins dont la punicalagine et le gallagylidilacton seraient responsables des propriétés antifongiques contre *C. albicans*. L'action de ces molécules bioactives serait d'altérer la morphologie des cellules de cette levure (27).

5.3.5. Activités antifongiques sur *Aspergillus brasiliensis*

L'activité antifongique des tanins hydrolysables sur *Aspergillus brasiliensis* sont très peu décrits. Il a donc été étudié l'efficacité des tanins sur le genre *Aspergillus*.

L'activité antifongique de l'écorce de la grenade a été évalué sur *A. niger* à partir d'extraits à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol (82). Les CMI obtenus sont respectivement 250 µg/mL, 62,5 µg/mL et 125 µg/mL. En comparaison, le contrôle positif qui est le fluconazole a obtenu une CMI de 250 µg/mL. Ainsi, l'activité antifongique est similaire voir meilleure comparée au contrôle positif (82).

En comparaison, l'extrait de l'écorce de la grenade à l'acétone/eau (70/30) s'est avéré efficace contre *A. flavus* avec une CMI de 25 µg/mL contre 45 µg/mL pour la griséofulvine (78). L'activité de l'extrait de grenade sur *A. flavus* est concluante et confirme les résultats obtenus précédemment à savoir que l'activité antifongique est similaire voir plus efficace que le témoin (78).

Ces propriétés antifongiques pourraient s'expliquer par la présence de tanins dans l'écorce de la grenade. Mais il est nécessaire d'avoir des études complémentaires sur *A. brasiliensis* ainsi que des données sur l'activité antifongique potentielle des tanins hydrolysables en testant les molécules pures pour pouvoir conclure sur cette activité.

Pour conclure sur cette partie, les extraits issus de l'écorce qui entoure la grenade présentent un large spectre d'activités antimicrobiens, que ce soit sur les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif mais également sur les levures et les moisissures (3). Son efficacité s'est avérée supérieure comparée aux extraits issus d'autres parties de la plante comme le jus du fruit, les graines ou la tige. Ces propriétés s'expliqueraient grâce à la présence des polyphénols et notamment des tanins hydrolysables. Parmi ces composés phénoliques, le composé majoritaire de l'écorce de la grenade est la punicalagine. Cette molécule a montré une efficacité antimicrobienne et représenterait donc une potentielle alternative naturelle aux conservateurs de synthèse utilisés actuellement (81). Cependant, il est important de noter les résultats sur l'activité antimicrobienne peuvent varier d'une étude à l'autre. Selon les études, l'efficacité obtenue avec les extraits est inférieure à celle obtenue avec les molécules de référence et inversement. En fonction des méthodes et des solvants d'extraction, de la saison et de la région où les plantes sont récoltées cela peut justifier de ces différences (3). Par exemple, bien que le test de diffusion offre une évaluation rapide de l'efficacité des extraits, la précision de la lecture des diamètres d'inhibition est limitée. La détermination de la CMI s'avère plus appropriée pour comparer les efficacités et évaluer si des concentrations plus élevées sont nécessaires pour atteindre une efficacité similaire aux molécules de référence. En résumé, les différentes études mentionnées précédemment soulignent un réel intérêt dans l'utilisation de la grenade comme agent antimicrobien naturel.

5.4. Mode d'obtention des tanins hydrolysables présents chez *Punica granatum*

5.4.1. Choix des solvants d'extraction des tanins hydrolysables

Parmi les différents solvants utilisés pour extraire les composés d'intérêts, on retrouve l'eau, l'éthanol, le méthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther et l'acétone. Dans le domaine de la cosmétique, afin de satisfaire aux diverses exigences des consommateurs, l'utilisation de solvants conformes aux principes de la chimie verte est indispensable. Dans cette optique, les choix à favoriser incluent l'eau, l'éthanol et le méthanol (1). Les extractions à l'eau et à l'éthanol se sont avérées avoir les meilleures efficacités en comparaison à l'extrait au méthanol (2).

En revanche, des extraits au chloroforme, au méthanol et à l'eau de l'écorce de *Punica granatum* ont été effectués pour tester *in vitro* l'efficacité antibactérien. Les rendements de ces extractions sont de 0,2%, 30% et 15% respectivement. Le méthanol est le solvant permettant d'obtenir le meilleur rendement. La composition phytochimique au chloroforme était riche en alcaloïdes ; pour le méthanol, les tanins et les alcaloïdes étaient les composés majoritaires et pour l'eau, il s'agissait des tanins (83).

Par ailleurs, dans une autre étude, les rendements d'extraction de l'eau, du méthanol et de l'éthanol ont également été étudiés (79). Les rendements obtenus pour l'eau et le méthanol étaient similaires avec 18,1% et 17,4% respectivement. L'extrait à l'éthanol a présenté un rendement plus faible de 13,8%. En revanche en associant l'eau et l'éthanol (80/20), le rendement était de 17,4%. Ainsi, l'ajout d'eau a augmenté l'efficacité du solvant d'extraction et ce mélange était plus efficace que l'acétone, l'acétate d'éthyle et le toluène (79).

Puis, dans une autre étude évaluant l'activité antibactérienne des graines de la grenade, il s'est avéré que l'éthanol était un bon solvant pour extraire les composés d'intérêt puisque les extraits se sont révélés être efficaces contre différentes souches bactériennes. En revanche, l'extrait à l'hexane n'a montré aucune activité (73).

En conclusion, l'eau associée à l'éthanol permettrait d'obtenir les meilleurs résultats. En effet, les composés d'intérêt à extraire sont les tanins hydrolysables qui sont des molécules solubles dans l'eau. Ainsi, il faut privilégier des solvants hydrophiles puisque les solvants non polaires comme l'hexane seraient inefficaces (4).

5.4.2. Méthodes d'extraction des tanins hydrolysables

Les méthodes pour extraire les composés bioactifs des plantes sont diverses mais parmi les méthodes les plus utilisées, on retrouve la macération de la plante. Une fois cette étape terminée, une filtration puis une évaporation du solvant sont réalisées pour obtenir un extrait sec brut (78).

Par exemple, dans l'étude de Spilmont, la préparation de l'extrait est la suivante : les fruits sont pelés afin de conserver uniquement la coque dure qui entoure le fruit. Cette partie est privilégiée car elle constitue un sous-produit de l'industrie alimentaire et s'avère être la partie de la plante la plus efficace. Ensuite, cette peau est mixée pour obtenir une poudre homogène. Puis une extraction hydroalcoolique est réalisée avec un mélange 70/30 éthanol/eau et l'eau utilisée provient de la peau de la grenade. Le rapport entre la poudre broyée de la coque de la grenade et le solvant est de 1/15. Cet extrait est ensuite chauffé à 90°C pendant 3 heures puis est filtré à 0,2 µM pour obtenir une filtration stérilisante. Enfin, l'éthanol est évaporé (81).

Une fois l'extraction achevée, la méthode de Folin-Ciocalteu, employant un réactif spécifique aux polyphénols, est utilisée pour déterminer la concentration totale en polyphénols et en polyphénols non-tannique. Ce dernier dosage colorimétrique utilise la molécule de polyvinylpyrrolidone (PVPP) pour se lier aux tanins présents dans l'extrait à doser. Le complexe tanin-PVPP est ensuite éliminé par centrifugation. Ainsi, la concentration en tanins totaux est calculée en soustrayant les concentrations en polyphénols totaux et en polyphénols non-taniques (40).

5.4.3. Identification des tanins hydrolysables extraits

Diverses techniques peuvent être employées pour identifier les molécules d'intérêt, garantissant ainsi que la méthode choisie permet d'isoler les composés bioactifs, notamment les tanins hydrolysables et plus spécifiquement la punicalagine.

Parmi ces méthodes, la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou la spectroscopie infrarouge peuvent être utilisées (78).

Dans la première méthode, l'extrait obtenu pourrait être comparé à des molécules témoins comme la punicalagine. Dans l'étude d'Akroum, le mélange de solvants utilisé pour permettre la migration des composés sur la plaque de silice est le suivant : butanol/acide acétique/eau : 4/1/5 (V/V/V) (78).

Pour la CLHP, le chromatogramme obtenu corrélé à celui des molécules de référence permettrait également de confirmer que les molécules d'intérêt ont été bien extraites.

5.5. Mise en formules des tanins hydrolysables

L'utilisation des tanins hydrolysables dans les produits cosmétiques permet donc de garantir la sécurité du produit grâce à ces propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Par ailleurs, ces molécules sont solubles dans l'eau et sont stables pour une gamme de pH comprise entre 3 et 7, ce qui est couvré une large utilisation dans le domaine des cosmétiques. En fonction des composés, il peut être nécessaire d'ajouter de la soude pour favoriser leur solubilité dans l'eau (84).

D'autre part, les tanins sont relativement stables et ne se dégradent pas en formule ce qui permettra de conserver leur efficacité dans le temps. En effet, deux gels ont été formulés avec

une fraction enrichie en tanins issue de *Psidium guajava* aux concentrations de 5% et 10%. Les paramètres physico-chimiques ont été évalués puis un suivi de stabilité a été effectué à 40°C pendant 3 mois [Tableau 23].

Tableau 23 : Propriétés physico-chimiques des gels formulés avec 5% et 10% d'une fraction enrichie en tanins

Analyses	Gel à 5%	Gel à 10%
Aspect	Gel transparent, homogène, brun	Gel transparent, homogène, brun
pH	7,01	7,10
Viscosité	3004 cP	3250 cP
Stabilité à 3 mois 40 °C	Stable	Stable

Il n'y a pas de différence notable entre les gels contenant 5% et 10% de tanins avec l'obtention d'un gel homogène et brun et les formules restent conformes après 3 mois à 40°C. Ainsi, les tanins sont des composés stables qui ne se dégradent pas dans le temps (85).

En revanche, les tanins issus de la grenade sont colorés avec une couleur qui varie du jaune au marron. Cette coloration peut avoir un impact sur la couleur du produit fini et représenterait donc un frein potentiel pour une partie du marché qui souhaite avoir uniquement des formules blanches. Nous l'avons vu, les critères pour développer un antimicrobien sont nombreux et un des inconvénients principaux avec les substances naturelles est la coloration. Ainsi, si le consommateur souhaite utiliser des substances exclusivement naturelles dans ces produits, il faut être prêt à faire des concessions et à accepter des formules qui ne soient pas parfaitement blanches ou bien favoriser l'utilisation de ces composés dans des produits pigmentés. L'autre solution serait de diminuer la concentration en tanins et l'associer à un autre composé ayant une activité antimicrobienne pour palier à une diminution d'efficacité.

5.6. Synergie des polyphénols

Une étude s'est intéressée à différents composés polyphénoliques : des flavonoïdes et des ellagitanins présents dans un extrait de *Cistus salviifolis*. Ces composés ont été associés par paire et à différents ratios pour évaluer une synergie éventuelle *in vitro* contre *S. aureus*. Il a été conclu qu'en associant la punicalagine, composé majoritaire de la grenade avec l'acide ellagique, la CMI₅₀ est largement inférieure en comparaison avec les composés testés individuellement et un effet synergique a été observé à tous les ratios testés [Tableau 24].

Tableau 24 : Evaluation de la synergie entre l'acide ellagique et la punicalagine contre *S. aureus*

Proportion acide ellagique/punicalagine (w/w)	CMI ₅₀ (en µg/mL)
1:0	12,35
7:1	3,06
3:1	1,20
1:3	1,16
1:7	0,52
0:1	42,11

En effet, l'acide ellagique et la punicalagine seuls ont des valeurs de CMI₅₀ de 12,35 µg/mL et 42,11 µg/mL respectivement alors que l'association avec un ratio de 1:7 (acide ellagique/punicalagine) obtient une CMI₅₀ de 0,52 µg/mL.

Cette association a également montré des concentrations de CMI₅₀ proches de celle d'un médicament ayant des valeurs comprises entre 0,5 et 1 µg/mL. En effet, l'association de composés semble être une solution intéressante pour agir sur un large spectre avec des bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais également sur des moisissures et des levures. Ces résultats justifient également les propriétés antimicrobiennes des extraits de grenade puisqu'on y retrouve ces deux composés en quantités majoritaires. La synergie entre ces deux molécules pourrait s'expliquer par leur différence de taille. L'acide ellagique qui est un monomère de petite taille pourrait avoir des cibles moléculaires plus profondes alors que la punicalagine, molécule ayant une structure de plus grande taille s'arrêterait et ciblerait la membrane bactérienne. Ainsi les extraits végétaux sont intéressants en tant qu'alternative antimicrobienne naturelle puisqu'ils sont composés de différentes molécules bioactives pouvant agir sur différents sites d'action et avoir un effet synergique (39).

5.7. Valorisation des sous-produits de la *Punica granatum*

La grenade est de plus en plus consommée dans le monde grâce à toutes ses propriétés bénéfiques pour la santé. La fabrication des jus dans l'industrie alimentaire génère beaucoup de déchets car seul le fruit est utilisé et non l'écorce car elle n'est pas comestible (2). L'écorce de la grenade représente donc un sous-produit conséquent de l'industrie alimentaire (14). Il est donc intéressant de valoriser ces déchets riches en composés bioactifs d'intérêt. Cette approche participe au concept de l'économie circulaire de la gestion des déchets alimentaires et répond ainsi aux attentes du développement durable (76).

D'autre part, la récupération des produits destinés à être éliminés offre un accès à la matière à un coût potentiellement raisonnable. Etant donné que l'efficacité antimicrobienne nécessite une concentration plus élevée dans les produits finis que les conservateurs de synthèse, cela pourrait contribuer à contenir les coûts de la formule.

VI. Matériels et méthodes

6.1. Moteurs de recherche

Pubmed et google scholar sont les moteurs de recherches qui ont permis de réaliser la revue de la littérature.

6.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Deux méthodes sont utilisées couramment pour évaluer l'activité antimicrobienne : la diffusion sur disque ou dilution sur gélose et la micro-dilution en bouillon. La seconde méthode permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale fongicide (CMF) et la concentration minimale bactéricide (CMB) (5).

Test de diffusion sur disque ou dilution sur gélose :

Cette méthode *in vitro* est très utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne. La méthode de dilution sur gélose consiste à effectuer des puits dans la gélose Mueller-Hinton qui sont ensuite remplis avec les extraits à tester, les molécules de référence (antibiotique ou antifongique) et le solvant à des concentrations connues. Le principe de la méthode de diffusion sur disque est identique, simplement les extraits et molécules à tester sont déposés sur des petits disques de papier. Les microorganismes testés sont ensuite ensemencés sur la gélose qui est contenue dans une boîte de pétri. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après un temps d'incubation préalablement défini et généralement à 37°C [Figure 44] (66).

Cette méthode est adéquate pour évaluer l'efficacité des extraits contre les microorganismes qui infectent la surface de la peau (69).

Les variables à prendre en compte avec cette méthode sont la taille des puits ou des disques de diffusion, la précision lors de la mesure du diamètre d'inhibition ainsi que la période d'incubation (55).

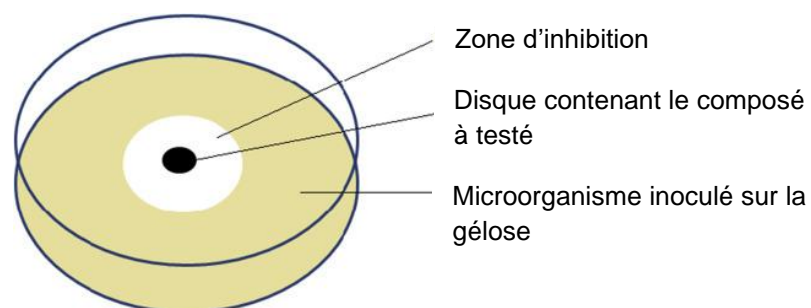


Figure 44 : Méthode de diffusion sur disque

Méthode de micro-dilution en bouillon :

Cette technique *in vitro* a été décrite par Eloff en 1998 et permet de déterminer la CMI (86). Cette valeur correspond à la concentration minimale de la substance testée permettant d'empêcher visuellement la croissance microbienne (66).

Cette méthode permet également de déterminer la CMB qui correspond à la concentration minimale qui tue 99% des bactéries (74). Elle consiste à inoculer des concentrations connues en extraits ou en molécules à tester dans une microplaque de 96 puits et de laisser incuber à 37°C pendant généralement 24 heures avec les microorganismes testés. Chaque puit est analysé et la CMI est déterminée comme étant la concentration la plus faible n'ayant entraîné aucune croissance microbienne [Figure 45] (51).

Les variables à prendre en compte avec cette méthode sont la taille de l'inoculum et la période d'incubation (55).

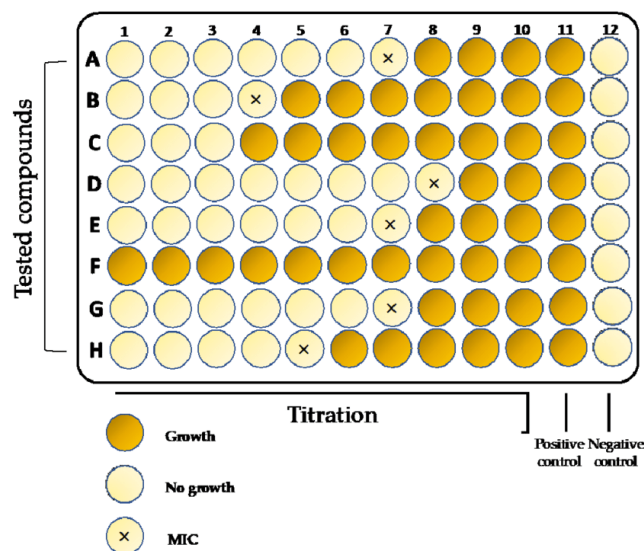


Figure 45 : Méthode de la micro-dilution en bouillon pour déterminer la CMI

Formation de biofilm :

Les composés d'intérêt peuvent également être évalués pour leurs activités sur la formation du biofilm. Le biofilm est composé de microorganismes entourés d'une matrice extracellulaire autoproduite qui va favoriser l'adhésion des microorganismes à toutes les surfaces et entre elles. Il permet également de protéger les bactéries qui deviendront ainsi plus résistantes aux antibiotiques et aux conditions environnementales hostiles. La matrice extracellulaire est composée d'eau principalement (jusqu'à 97%), de polysaccharides mais également de composés tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides (87).

Des plaques de 96 puits sont utilisées et les puits sont remplis avec des concentrations différentes en composés bioactifs allant de 0 à la CMI. Des contrôles positifs et négatifs sont également analysés. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la croissance cellulaire est

mesurée par la Densité Optique (DO) à une longueur d'onde de 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Les cellules planctoniques sont ensuite retirées en réalisant trois lavages et les cellules du biofilm sont fixées avec du méthanol et colorées avec du cristal violet. Après une nouvelle période d'incubation, les plaques sont ensuite lavées avec de l'eau distillée puis de l'acide acétique est ajouté à chaque puit pour dissoudre le cristal violet résiduel. L'absorbance est ensuite mesurée : le biofilm étant révélé par la méthode de coloration au cristal violet, plus la coloration est forte et plus le puit contient de biofilms (14).

6.3. Identification

Microscopie électronique:

La microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission sont utilisées pour observer la morphologie des cellules des microorganismes avant et après traitement à différentes concentrations des composés d'intérêt. Les cellules sont obtenues par centrifugation puis lavées et remises en suspension pour fixation sur un support avant d'être observées sous microscopie électronique à balayage.

Pour l'observation en microscopie électronique à transmission, les cellules des microorganismes sont traitées avec les composés d'intérêt puis immobilisées et fixées dans de l'agar. Après lavage, les échantillons sont mis sur une résine. Les coupes sont colorées avec du citrate de plomb saturé et de l'acétate d'uranyle puis observées avec un microscopie électronique à transmission (14).

Détermination du contenu phénolique total (CPT) :

La méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée pour déterminer les composés phénoliques totaux.

De l'eau et du réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés à l'extrait à analyser. Ensuite, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm. L'acide gallique est généralement utilisé comme composé phénolique standard pour tracer la courbe d'étalonnage. Ainsi, les résultats sont exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par gramme d'extrait (79, 82).

Chromatographie sur Couche Mince :

C'est une méthode physique de séparation des différents constituants présents dans une solution à examiner et qui sera comparée à une solution témoin. Elle est basée sur la différence d'affinité des substances à l'égard des deux phases, l'une stationnaire (plaque de silice) et l'autre mobile (éluant). Le choix de l'éluant se fait en fonction des extraits.

Chaque tache correspond à un constituant qui est identifié par comparaison du rapport frontal (Rf) avec un témoin. Deux taches à la même hauteur correspondent au même composé.

Chromatographie Liquide Haute Performance :

Il s'agit d'une méthode séparative utilisée en analyse quantitative et qualitative. Dans cette technique, le temps de rétention de l'échantillon varie selon l'interaction entre la phase stationnaire, les molécules analysées et le ou les solvants utilisés. Au fur et à mesure que l'échantillon passe à travers la colonne, il interagit entre les deux phases stationnaire et mobile à des vitesses différentes, principalement à cause des polarités différentes des analytes. Les composés qui ont le moins d'interactions avec la phase stationnaire (ou le plus d'interaction avec la phase mobile) sortiront de la colonne c'est-à-dire seront élués le plus rapidement.

Le choix du solvant va dépendre de la colonne, des composés à éluer et de leur polarité. Différents gradients peuvent être utilisés en fonction des extraits.

Conclusion

Au travers de ce travail il a été mis en évidence l'utilisation prometteuse des tanins hydrolysables pour répondre à la tendance actuelle autour de la naturalité dans l'industrie cosmétique. Par ailleurs, ces tanins avec notamment la punicalagine, sont les composés bioactifs majoritaires présents dans l'écorce qui entoure la grenade. Cette coque étant un sous-produit de l'industrie alimentaire, il serait intéressant de la valoriser pour développer un extrait naturel antimicrobien. En effet, les différents mécanismes d'action des tanins sur les microorganismes ont été étudiés et ont permis de démontrer la capacité de ces composés à inhiber la croissance des bactéries et des champignons. En revanche, l'analyse de l'activité antimicrobienne s'est portée principalement sur les cinq microorganismes présents dans la méthode du challenge test puisque ce sont les exigences auxquelles doivent répondre les fabricants de produits cosmétiques. Cependant, une étude complémentaire sur le genre *Bacillus*, qui est une bactérie à Gram positif, serait importante à réaliser car ces germes présents sous forme de spores sont des contaminants qui peuvent être retrouvés dans les produits cosmétiques.

Par ailleurs, il a été montré que les tanins hydrolysables avaient une activité antimicrobienne mais avec des valeurs de CMI élevées comparées aux antibiotiques et aux antifongiques. Cela nécessiterait donc de les utiliser à une concentration plus importante pour s'assurer de l'efficacité dans le temps et sur un large spectre de microorganismes. Une étude toxicologique serait nécessaire pour s'assurer de l'innocuité de ces molécules naturelles utilisées à forte concentration en déterminant le seuil d'utilisation maximal. D'autre part, l'impact sur la couleur de la formule pourrait être un facteur limitant. Ainsi l'alternative qui serait intéressante à privilégier serait d'utiliser les tanins en combinaison avec un autre antimicrobien pour palier à d'éventuelles lacunes sur le spectre antimicrobien. Nous avons vu que les terpénoïdes avaient également des propriétés antimicrobiennes intéressantes. Il pourrait donc être pertinent de coupler ces deux familles de molécules d'autant plus que les huiles essentielles composées principalement de terpénoïdes sont déjà largement utilisées dans l'industrie cosmétique. Des études évaluant la synergie éventuelle de cette association seraient judicieuses à étudier. Une autre possibilité serait d'extraire des molécules pures des végétaux, en combinant par exemple la punicalagine à l'acide ellagique. Cette approche vise à se rapprocher de l'efficacité des molécules de référence, qui sont des composés purs. Cependant, le facteur limitant de cette stratégie serait son incidence sur le coût de la formulation.

Enfin, il est également important de relever qu'il existe d'autres perspectives pour substituer les conservateurs synthétiques actuels comme travailler sur les procédés de fabrication, le type de conditionnement choisi ou encore la galénique du produit en diminuant l'activité en eau par exemple. En effet, la diminution de la quantité disponible en eau permet d'avoir un environnement défavorable à la croissance des microorganismes puisqu'ils ont besoin d'eau pour se développer. L'activité en eau est comprise entre 0,00 qui correspond à une absence totale d'eau et 1,00 qui correspond à l'eau pure. En fonction du type de microorganismes, cette activité en eau varie. Les levures et les moisissures peuvent se développer avec une activité en eau plus faible que les bactéries. Pour diminuer cette activité en eau, des glycols tels que la glycérine ou le sorbitol peuvent être envisagés (8).

Références bibliographiques

1. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.
2. Khan JA, Hane S. Antibacterial properties of Punica granatum peels. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2011;2(3):23-7.
3. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. Int J Food Microbiol. sept 2009;134(3):244-8.
4. Vasudha Pai,. Evaluation of the antimicrobial activity of Punica granatum peel against the enteric pathogens: An invitro study. Asian J Plant Sci Res. 2011;1((2)):57-62.
5. Manso T, Lores M, de Miguel T. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. Antibiotics. 30 déc 2021;11(1):46.
6. Règlement produits cosmétiques(CE) no 1223/2009. 2009.
7. Margot Lefrançois. Le développement d'un produit dermo-cosmétique destiné au jeune enfant enjeux industriels et officinaux [Thèse de Pharmacie]. Université de Rouen; 2015.
8. Kerdudo A. Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation [Docteur de l'Université de Nice]. Université de Nice; 2014.
9. Debacker. Conservation des produits cosmétiques : Evolutions, risques associés et stratégies d'optimisation [Thèse de Pharmacie]. Université de Lille 2; 2018.
10. Cohen Yaëlle, Gleitz Chloé. Les conservateurs dans les produits cosmétiques : cas des parabens et du phénoxyéthanol. Et que penser des produits cosmétiques” biologiques” ? [Thèse de Pharmacie]. Université de Grenoble; 2016.
13. Zeng J, Chen D, Lv C, Qin K, Zhou Q, Pu N, et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of Polygonum chinense L.aqueous extract against Staphylococcus aureus. Sci Rep. 2022;12(1):21988.
14. Xu Y, Shi C, Wu Q, Zheng Z, Liu P, Li G, et al. Antimicrobial Activity of Punicalagin Against *Staphylococcus aureus* and Its Effect on Biofilm Formation. Foodborne Pathog Dis. 2017;14(5):282-7.
15. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence. 2021;12(1):547-69.
16. Giudice P. Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus. Acta Derm Venereol. 2020;100(9):adv00110-215.
17. Dosunmu E, Chaudhari A, Shree S, Dennis V, Pillai S. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. Int J Nanomedicine. 2015;5025.

18. Olchowik-Grabarek E, Swiecicka I, Andreeva-Kovaleskaya Z, Solonin A, Bonarska-Kujawa D, Kleszczyńska H, et al. Role of Structural Changes Induced in Biological Membranes by Hydrolysable Tannins from Sumac Leaves (*Rhus typhina* L.) in their Antihemolytic and Antibacterial Effects. *J Membr Biol.* 2014;247(6):533-40.
19. Wu DC, Chan WW, Metelitsa AI, Fiorillo L, Lin AN. Pseudomonas Skin Infection: Clinical Features, Epidemiology, and Management. *Am J Clin Dermatol.* juin 2011;12(3):157-69.
20. Keerthana, K. Comparative study on durability properties of bacterial concrete. *International Research Journal of Engineering and Technology.* Vol. 3:29-132.
21. Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli* Infection. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.*
22. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* févr 2004;2(2):123-40.
23. Makvana S, Krilov LR. *Escherichia coli* Infections. *Pediatr Rev.* 2015;36(4):167-71.
24. Gómez-Casanova N, Lozano-Cruz T, Soliveri J, Gomez R, Ortega P, Copa-Patiño JL, et al. Eradication of *Candida albicans* Biofilm Viability: In Vitro Combination Therapy of Cationic Carbosilane Dendrons Derived from 4-Phenylbutyric Acid with AgNO₃ and EDTA. *J Fungi.* 2021;7(7):574.
25. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-28.
26. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi.* 2021;7(2):79.
27. Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF. 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. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):839-48.
28. Simões MF, Santos C, Lima N. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. *Microsc Microanal.* 2013;19(5):1151-8.
29. Hussain MA, Ahmed D, Anwar A, Perveen S, Ahmed S, Anis I, et al. Combination Therapy of Clinically Approved Antifungal Drugs Is Enhanced by Conjugation with Silver Nanoparticles. *Int Microbiol.* 2019;22(2):239-46.
30. Okazaki K, Sumitani H, Takahashi K, Isegawa Y. Mode of Antifungal Action of Daito-Gettou (*Alpinia zerumbet* var. *exelsa*) Essential Oil against *Aspergillus brasiliensis*. *Foods.* 2023;12(6):1298.
31. Mehta M, Sharma J, Bhardwaj SB. Proximal subungual onychomycosis of digitus minimus due to *Aspergillus brasiliensis*. *Pan Afr Med J.* 2020;35.

32. Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Revathi R, Anita R, Dóczy I, et al. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *J Med Case Reports*. déc 2010;4(1):68.
33. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004;24(1):5-13.
34. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Parabens. 2008.
35. Bodin L, Rogiers V, Bernauer U, Chaudhry Q, Coenraads PJ, Dusinska M, et al. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final Opinion on propylparaben (CAS No 94-13-3, EC No 202-307-7). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;125:105005.
36. Dréno B, Zuberbier T, Gelmetti C, Gontijo G, Marinovich M. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. nov 2019;33(S7):15-24.
37. Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on Phenoxyethanol. 2016.
38. Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Evaluation du risque lié à l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques. 2019.
39. Tomás-Menor L, Barrajón-Catalán E, Segura-Carretero A, Martí N, Saura D, Menéndez JA, et al. The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics: antimicrobial synergic activity of Cistaceae polyphenols. *Phyther Res*. 2015;29(3):466-73.
40. Séverine BRUNET. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants [Docteur de l'Université de Toulouse]. Université Paul Sabatier; 2008.
41. Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front Microbiol*. 2019;10:911.
42. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30.
43. Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, Chye ML. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnol Adv*. 2016;34(5):697-713.
44. Alexis VARIN. Caractérisation de nouvelles cibles de LXR et impact sur le métabolisme lipidique et l'athérosclérose [Docteur de l'Université de Bourgogne]. Université de Bourgogne; 2014.
45. Maeda H, Dudareva N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2012;63(1):73-105.
46. Wu S, Chen W, Lu S, Zhang H, Yin L. Metabolic Engineering of Shikimic Acid Biosynthesis Pathway for the Production of Shikimic Acid and Its Branched Products in Microorganisms: Advances and Prospects. *Molecules*. 2022;27(15):4779.

47. Hanik N, Best M, Schueller MJ, Tappero R, Ferrieri RA. Defense Priming in *Nicotiana tabacum* Accelerates and Amplifies 'New' C/N Fluxes in Key Amino Acid Biosynthetic Pathways. *Plants*. 2020;9(7):851.
48. Pierre Le Pogam-Alluard. Analyses de lichens par spectrométrie de masse : déréplication et histolocalisation [Docteur de l'Université de Rennes 1]. Université de Rennes 1; 2016.
49. Othmani NI, Mohamed SA, Abdul Hamid NH, Ramlee N, Yeo LB, Mohd Yunus MY. Reviewing biomimicry design case studies as a solution to sustainable design. *Environ Sci Pollut Res*. 2022;29(46):69327-40.
50. Himel MH, Sikder B, Ahmed T, Choudhury SM. Biomimicry in nanotechnology: a comprehensive review. *Nanoscale Adv*. 2023;5(3):596-614.
51. Li N, Luo M, Fu Y jie, Zu Y gang, Wang W, Zhang L, et al. Effect of Corilagin on Membrane Permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CORILAGIN. *Phytother Res*. 2013;27(10):1517-23.
52. Al Hafi M, El Beyrouthy M, Ouaini N, Stien D, Rutledge D, Chaillou S. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Satureja*, *Thymus*, and *Thymbra* Species Grown in Lebanon. *Chem Biodivers*. 2017;14(5):e1600236.
53. Fahed L, Khoury M, Stien D, Ouaini N, Eparvier V, El Beyrouthy M. Essential Oils Composition and Antimicrobial Activity of Six Conifers Harvested in Lebanon. *Chem Biodivers*. 2017;14(2):e1600235.
54. Breitenbach Barroso Coelho LC, Marcelino Dos Santos Silva P, Felix De Oliveira W, De Moura MC, Viana Pontual E, Soares Gomes F, et al. Lectins as antimicrobial agents. *J Appl Microbiol*. 2018;125(5):1238-52.
55. Coppo E, Marchese A. Antibacterial Activity of Polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;15(4):380-90.
56. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J AOAC Int*. 2019;102(5):1397-400.
57. Rudrapal M, Khan J, Dukhyil AAB, Alarousy RMII, Attah EI, Sharma T, et al. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. *Molecules*. 2021;26(23):7177.
58. Koleckar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L, et al. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Rev Med Chem*. 2008;8(5):436-47.
59. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3875-83.
60. Ekambaram SP, Perumal SS, Balakrishnan A. Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent: Scope of Hydrolysable Tannins as Antimicrobial Agents. *Phytother Res*. 2016;30(7):1035-45.

61. Duman A, Ozgen M, Dayisoğlu K, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *Molecules*. 2009;14(5):1808-17.
62. Yaici K, Dahamna S, Moualek I, Belhadj H, Houali K. Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea* L. (*Ericaceae*) dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien. *Phytothérapie*. 2021;19(4):226-34.
63. Mandal SM, Dias RO, Franco OL. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *J Med Food*. 2017;20(10):1031-8.
64. Abdel Moneim E. Sulieman, Fatima M. Issa, Elamin A. Elkhalifa. Quantitative Determination of Tannin Content in Some Sorghum Cultivars and Evaluation of its Antimicrobial Activity. 2007;2:284-8.
65. Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, et al. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 2004;48(4):251-61.
66. Agyare C, Koffuor GA, Boakye YD, Mensah KB. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Funtumia elastica*. *Pharm Biol*. 2013;51(4):418-25.
67. Reddy M, Gupta S, Jacob M, Khan S, Ferreira D. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*. 2007;73(5):461-7.
68. Puljula E, Walton G, Woodward MJ, Karonen M. Antimicrobial Activities of Ellagitannins against *Clostridiales perfringens*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2020;25(16):3714.
69. Latté KP, Kolodziej H. Antifungal Effects of Hydrolysable Tannins and Related Compounds on Dermatophytes, Mould Fungi and Yeasts. *Z Für Naturforschung C*. 2000;55(5-6):467-72.
70. Álvarez-Martínez FJ, Rodríguez JC, Borrás-Rocher F, Barrajon-Catalán E, Micol V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Sci Rep*. 2021;11(1):588.
71. Garnaud C, Cornet M. Membrane et paroi fongiques : des rôles clés dans la résistance aux antifongiques. *Rev Francoph Lab*. 2020;2020(519):50-8.
72. Elodie Wald. Le grenadier (*punica granatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes [Thèse de Pharmacie]. Université Henri Poincaré - Nancy 1; 2009.
73. Khan NH, Tze Ying AL, Zhi Tian CG, Yi OW, Vijayabalan S. Screening of *Punica granatum* Seeds for Antibacterial and Antioxidant Activity with Various Extracts: A Brief Analytical Study. In: Hassanien DrMFR, éditeur. *Current Advances in Chemistry and Biochemistry Vol 8*. Book Publisher International (a part of sciencedomain International); 2021. p. 146-59.

74. Pagliarulo C, De Vito V, Picariello G, Colicchio R, Pastore G, Salvatore P, et al. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chem.* 2016;190:824-31.
75. Machado TDB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRND, Silva MGD, Kuster RM. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *J Braz Chem Soc.* 2002;13(5):606-10.
76. Gosset-Erard C, Zhao M, Lordel-Madeleine S, Ennahar S. Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Food Chem.* 2021;352:129396.
77. Saad Sabbar Dahham, Mir Naiman Ali, Hajera Tabassum, Mazharuddin Khan. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian J Agric & Environ Sci.* 2010;9 (3):273-81.
78. Akroum S. Antifungal activity of acetone extracts from *Punica granatum* L. , *Quercus suber* L. and *Vicia faba* L. *J Mycol Médicale.* 2017;27(1):83-9.
79. Rongai D, Pulcini P, Di Lernia G, Nota P, Preka P, Milano F. Punicalagin Content and Antifungal Activity of Different Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes. *Horticulturae.* 2019;5(3):52.
80. Lantzouraki DZ, Sinanoglou VJ, Zoumpoulakis PG, Glamočlija J, Ćirić A, Soković M, et al. Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *RSC Adv.* 2015;5(4):2602-14.
81. Spilmont M, Léotoing L, Davicco MJ, Lebecque P, Miot-Noirault E, Pilet P, et al. Pomegranate Peel Extract Prevents Bone Loss in a Preclinical Model of Osteoporosis and Stimulates Osteoblastic Differentiation in Vitro. *Nutrients.* 2015;7(11):9265-84.
82. Barathikannan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA, Agastian P, Arasu MV, et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(1):264.
83. Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2001;72(2):171-3.
84. Coralie Motillon. Formulation et caractérisation de résines thermodurcissables bio-sourcées pour l'industrie du bois [Docteur de l'Université de Pau et des pays de l'Adour]. Université de Pau et des pays de l'Adour;
85. S. Jaya Kumari, M. Sangeetha, Sajjad Ali. Formulation and Evaluation of Herbal Gel from tannin enriched fraction of *Psidium guajava* Linn Leaves for Diabetic Wound Healing. *Int J Green Pharm.* 2018;
86. Eloff J. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Med.* 1998;64(08):711-3.

87. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire*. 2014;78(2):110-6.

Annexes

Annexe 1. Liste des agents conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques selon l'annexe V du Règlement Européen	100
Annexe 2. Composés testés dans l'étude de Funatogawa et al. et les sources des plantes.....	105

Annexe 1. Liste des agents conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques selon l'annexe V du Règlement Européen

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCl	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
1	Acide benzoïque et son sel de sodium	Benzoic acid Sodium Benzoate	65-85-0 532-32-1	200-618-2 208-534-8	Produits à rincer, sauf les produits bucco-dentaires Produits bucco-dentaires Produits sans rinçage	2,5 % (acide) 1,7 % (acide) 0,5 % (acide)		
1a	Les sels d'acide benzoïque autres que ceux listés sous le numéro d'ordre 1 et les esters d'acide benzoïque	Ammonium benzoate, calcium benzoate, potassium benzoate, magnesium benzoate, MEA-benzoate, methyl benzoate, ethyl benzoate, propyl benzoate, butyl benzoate, isobutyl benzoate, isopropyl benzoate, phenyl benzoate	1863-63-4, 2090-05-3, 582-25-2, 553-70-8, 4337-66-0, 93-58-3, 93-89-0, 2315-68-6, 136-60-7, 120-50-3, 939-48-0, 93-99-2	217-468-9, 218-235-4, 209-481-3, 209-045-2, 224-387-2, 202-259-7, 202-284-3, 219-020-8, 205-252-7, 204-401-3, 213-361-6, 202-293-2		0,5 % (acide)		
2	Acide propionique et ses sels	Propionic acid, ammonium propionate, calcium propionate, magnesium propionate, potassium propionate, sodium propionate	79-09-4, 17496-08-1, 4075-81-4, 557-27-7, 327-62-8, 137-40-6	201-176-3, 241-503-7, 223-795-8, 209-166-0, 206-323-5, 205-290-4		2 % (acide)		
3	Acide salicylique (*) et ses sels	Salicylic acid, calcium salicylate, magnesium salicylate, MEA-salicylate, sodium salicylate, potassium salicylate, TEA-salicylate	69-72-7, 824-35-1, 18917-89-0, 59866-70-5, 54-21-7, 578-36-9, 2174-16-5	200-712-3, 212-525-4, 242-669-3, 261-963-2, 200-198-0, 209-421-6, 218-531-3		0,5 % (acide)	Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, à l'exception des shampoings	Ne pas employer chez les enfants de moins de 3 ans (*)
4	Acide sorbique et ses sels	Sorbic acid, calcium sorbate, sodium sorbate, potassium sorbate	110-44-1, 7492-55-9, 7757-81-5, 24634-61-5	203-768-7, 231-321-6, 231-819-3, 246-376-1		0,6 % (acide)		
5	Formaldéhyde et paraformaldéhyde (*)	Formaldehyde Paraformaldehyde	50-00-0, 30525-89-4	200-001-8	Produits bucco-dentaires Autres produits	0,1 % (en formaldéhyde libre) 0,2 % (en formaldéhyde libre)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	
6	Déplacé ou supprimé							
7	Biphényle-2-ol et ses sels	o-Phenylphenol, sodium o-phenylphenate, potassium o-phenylphenate, MEA o-phenylphenate	90-43-7, 132-27-4, 13707-65-8, 84145-04-0	201-993-5, 205-055-6, 237-243-9, 282-227-7		0,2 % (en phénol)		
8	Pyrithione de zinc (*)	Zinc pyrithione	13463-41-7	236-671-3	Produits pour les cheveux et la pilosité du visage Autres produits	1,0 % 0,5 %	Uniquement pour les produits à rincer Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires	

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
9	Sulfites et bisulfites inorganiques (*)	Sodium sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfite, potassium sulfite, potassium hydrogen sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite	7757-83-7, 10192-30-0, 10196-04-0, 10117-38-1, 7773-03-7, 7631-90-5, 7681-57-4, 16731-55-8	231-821-4, 233-469-7, 233-484-9, 233-321-1, 231-870-1, 231-548-0, 231-673-0, 240-795-3		0,2 % (en SO ₂ libre)		
10	Déplacé ou supprimé							
11	1,1,1-Trichloro-2-méthylpropanol-2 (Chlorobutanol)	Chlorobutanol	57-15-8	200-317-6		0,5 %	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	Contient: Chlorobutanol
12	Acide p-hydroxybenzoïque, ses sels et esters	4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, butylparaben, potassium ethylparaben, potassium paraben, propylparaben, isobutylparaben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, sodium propylparaben, sodium butylparaben, sodium isobutylparaben, ethylparaben, sodium paraben, isopropylparaben, potassium methylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben, sodium propylparaben, calcium paraben, phenylparaben	99-96-7, 99-76-3, 94-26-8, 36457-19-9, 16782-08-4, 94-13-3, 4247-02-3, 5026-62-0, 35285-68-8, 35285-69-9, 36457-20-2, 84930-15-4, 120-47-8, 114-63-6, 4191-73-5, 2611-07-2, 38566-94-8, 84930-17-4, 35285-69-9, 69959-44-0, 17696-62-7	202-804-9, 202-785-7, 202-318-7, 253-048-1, 240-830-2, 202-307-7, 224-208-8, 225-714-1, 252-487-6, 252-488-1, 253-049-7, 284-595-4, 204-399-4, 204-051-1, 224-069-3, 247-464-2, 254-009-1, 284-597-5, 252-488-1, 274-235-4, 241-698-9		0,4 % (en acide) pour un ester 0,8 % (en acide) pour les mélanges d'esters		
13	Acide déshydroacétique et ses sels	Dehydroacetic acid, sodium dehydroacetate	520-45-6, 4418-26-2, 16807-48-0	208-293-9, 224-580-1		0,6 % (en acide)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	
14	Acide formique et son sel de sodium	Formic acid, sodium formate	64-18-6, 141-53-7	200-579-1, 205-488-0		0,5 % (en acide)		
15	1,6-Di (4-amidino-2-bromophénoxy)-n-hexane (Dibromohexamidine) et ses sels (y compris l'isethionate)	Dibromohexamidine Isethionate	93856-83-8	299-116-4		0,1 %		
16	Thiosalicylate d'éthylmercure sodique (Thiomersal)	Thimerosal	54-64-8	200-210-4	Produits les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 %		Contient: Thiosalicylate d'éthylmercure sodique
17	Phénylmercure et ses sels (y compris le borate)	Phenyl Mercuric Acetate, Phenyl Mercuric Benzoate	62-38-4, 94-43-9	200-532-5, 202-331-8	Produits pour les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercuriels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 %		Contient des composés phénylmercuriels

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
18	Acide undécylénique et ses sels	Undecylenic acid, potassium undecylenate, sodium undecylenate, calcium undecylenate, TEA-undecylenate, MEA-undecylenate	112-38-9, 6159-41-7, 3398-33-2, 1322-14-1, 84471-25-0, 56532-40-2	203-965-8, 222-264-8, 215-331-8, 282-908-9, 260-247-7		0,2 % (en acide)		
19	1,3-bis(2-Éthylhexyl)hexahydro-5-méthyl-5-pyrimidinamine	Hexetidine	141-94-6	205-513-5		0,1 %		
20	Bromo-5-nitro-5 dioxane 1,3	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane	30007-47-7	250-001-7	Produits à rincer	0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines	
21	Bromo-2 nitro-2 propanediol 1,3 (Bronopol)	2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	52-51-7	200-143-0		0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines	
22	Alcool dichloro-2,4-benzilyque	Dichlorobenzyl Alcohol	1777-82-8	217-210-5		0,15 %		
23	1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl)urée (*)	Triclocarban	101-20-2	202-924-1		0,2 %	Critères de pureté: 3-3'-4-4'-Tétrachloroazobenzène < 1 ppm 3-3'-4-4'-Tétrachloroazoxybenzène < 1 ppm	
24	Chlorocrésol	p-Chloro-m-Cresol	59-50-7	200-431-6	Ne pas utiliser dans les produits destinés aux muqueuses	0,2 %		
25	5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol	Triclosan	3380-34-5	222-182-2		0,3 %		
26	Chloroxylnol	Chloroxylenol	88-04-0	201-793-8		0,5 %		
27	N,N'-Méthylènebis[N'-(3-(hydroxyméthyl)-2,5-dioximidazolidine-4-yl)]urée]	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	254-372-6		0,6 %		
28	α, ω-bis [[[Aminoiminométhyl]amino]iminométhyl] amino]poly(méthylène), dichlorhydrate	Polyaminopropyl biguanide	70170-61-5, 28757-47-3, 133029-32-0			0,3 %		
29	Phénoxy-2-éthanol	Phenoxyethanol	122-99-6	204-589-7		1,0 %		
30	Méthénamine	Methenamine	100-97-0	202-905-8		0,15 %		
31	Chlorure de 1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia adamantane	Quaternium-15	4080-31-3	223-805-0		0,2 %		
32	1-Imidazolyl-1-(4-chlorophénoxy) 3,3-diméthylbutane-2-one	Climbazole	38083-17-9	253-775-4		0,5 %		
33	Diméthylol, diméthylhydantoïne	DMDM Hydantoin	6440-58-0	229-222-8		0,6 %		
34	Alcool benzylique (*)	Benzyl alcohol	100-51-6	202-859-9		1,0 %		
35	1-Hydroxy-4-méthyl-6 (2,4,4-triméthyl-pentyl) 2-pyridon et son sel de monoéthanol amine	1-Hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthylpentyl) 2-pyridon, Piroctone Olamine	50650-76-5, 68890-66-4	272-574-2	Produits à rincer Autres produits	1,0 % 0,5 %		

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
36	Déplacé ou supprimé							
37	2,2-Méthylènebis(6-bromo-4-chlorophénol)	Bromochlorophene	15435-29-7	239-446-8		0,1 %		
38	Isopropyl-métacrésol	o-Cymen-5-ol	3228-02-2	221-761-7		0,1 %		
39	Chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + du chlorure de magnésium et du nitrate de magnésium	Methylchloroisothiazolinone et Methylisothiazolinone	26172-55-4, 2682-20-4, 55965-84-9	247-500-7, 220-239-6		0,0015 % (d'un mélange dans un rapport 3:1 de chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 et méthyl-2-isothiazoline-4-one-3)		
40	Benzyl-2-chloro-4-phénol	Chlorophene	120-32-1	204-385-8		0,2 %		
41	Chloracétamide	Chloroacetamide	79-07-2	201-174-2		0,3 %		Contient: Chloroacetamide
42	N,N'-bis(4-Chlorophényl)-3,1,2-diimino-2,4,1,1,1,3-tétraazatétradécane diamidine: acétate, gluconate et chlorhydrate	Chlorhexidine, Chlorhexidine Diacetate, Chlorhexidine Digluconate, Chlorhexidine Dihydrochloride	55-56-1, 56-95-1, 18472-51-0, 3697-42-5	200-238-7, 200-302-4, 242-354-0, 223-026-6		0,3 % (en chlorhexidine)		
43	Phénoxypropanol (°)	Phenoxyisopropanol	770-35-4	212-222-7	Uniquement pour les produits à rincer	1,0 %		
44	Alkyl (C ₁₂₋₂₂) triméthyl ammonium, bromure de, chlorure de	Behentrimonium chloride, cetrimonium bromide, cetrimonium chloride, laurtrimonium bromide, laurtrimonium chloride, steartrimonium bromide, steartrimonium chloride	17301-53-0, 57-09-0, 112-02-7, 1119-94-4, 112-00-5, 1120-02-1, 112-03-8	241-327-0, 200-311-3, 203-928-6, 214-290-3, 203-927-0, 214-294-5, 203-929-1		0,1 %		
45	4,4-Diméthyl-1,3-oxazolidine	Dimethyl Oxazolidine	51200-87-4	257-048-2		0,1 %	pH > 6	
46	N-(Hydroxyméthyl)-N-(dihydroxyméthyl-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinyl-4)-N-(hydroxyméthyl) urée	Diazolidinyl Urea	78491-02-8	278-928-2		0,5 %		
47	4,4'-(1,6-Hexanediyloxy) bis-benzène carboximidamide et ses sels (incluant l'iséthionate et le p-hydroxybenzoate)	Hexamidine, Hexamidine diiséthionate, Hexamidine paraben	3811-75-4, 659-40-5, 93841-83-9	211-533-5, 299-055-3		0,1 %		
48	Glutaraldéhyde (1,5-pentanedial)	Glutaral	111-30-8	203-856-5		0,1 %	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	Contient: Glutaral (°)
49	5-Éthyl-3,7-dioxa-1-azabicyclo [3.3.0] octane	7-Ethylbicyclooxazolidine	7747-35-5	231-810-4		0,3 %	Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires et dans les produits destinés aux muqueuses	
50	3-(p-Chlorophénoxy)-propane-1,2 diol	Chlorphenesin	104-29-0	203-192-6		0,3 %		
51	Hydroxyméthylaminoacétate de sodium	Sodium Hydroxymethylglycinate	70161-44-3	274-357-8		0,5 %		

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
52	Chlorure d'argent déposé sur dioxyde de titane	Silver chloride	7783-90-6	232-033-3		0,004 % (en AgCl)	20 % AgCl (m/m) sur TiO ₂ . Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, dans les produits bucco-dentaires et dans les produits pour les yeux ou les lèvres	
53	Chlorure de N,N-diméthyl-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénoxy]éthoxy]éthyl] benzène-méthaniminium	Benzethonium Chloride	121-54-0	204-479-9	a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage autres que les produits bucco-dentaires	0,1 %		
54	Chlorure, bromure et saccharinate de benzalkonium ⁽¹⁰⁾	Benzalkonium chloride, benzalkonium bromide, benzalkonium saccharinate	8001-54-5, 63449-41-2, 91080-29-4, 68989-01-5, 68424-85-1, 68391-01-5, 61789-71-7, 85409-22-9	264-151-6, 293-522-5, 273-545-7, 270-325-2, 269-919-4, 263-080-8, 287-089-1		0,1 % (en chlorure de benzalkonium)		Éviter le contact avec les yeux
55	(Phénylméthoxy) méthanol	Benzylhemiformal	14548-60-8	238-588-8	Produits à rincer	0,15 %		
56	Carbamate de 3-iodo-2-propynylbutyle	Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	259-627-5	a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage c) Déodorants/antiperspirants	a) 0,02 % b) 0,01 % c) 0,0075 %	Ne pas utiliser pour les produits bucco-dentaires et les produits pour les lèvres a) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, sauf dans des produits de bain/des gels de douche et des shampoings b) Ne pas utiliser dans les lotions et crèmes pour le corps ⁽¹³⁾ b) et c) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans	a) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans ⁽¹¹⁾ b) et c) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans ⁽¹²⁾
57	2-Méthyl-2H-isothiazole-3-one	Methylisothiazolinone	2682-20-4	220-239-6		0,01 %		

Annexe 2. Composés testés dans l'étude de Funatogawa et al. et les sources des plantes

Compound	M.W.	Plant source(s)
		Common name (Scientific name)
Hydrolyzable tannins		
Monomers		
Penta- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose	941	Chinese gall (<i>Rhus chinensis</i>), Eucalyptus (<i>Eucalyptus</i> spp.)
Strictinin	634	Autumn olive (<i>Elaeagnus umbellata</i>), Guava (<i>Psidium guajava</i>)
Pedunculagin	784	Chinese agrimony (<i>Agrimonia pilosa</i>)
Tellimagrandin I (TG-I)	787	Ramanas rose (<i>Rosa rugosa</i>), Camellia (<i>Camellia japonica</i>)
Tellimagrandin II (TG-II)	939	Shan Zhu Yu (<i>Cornus officinalis</i>), Camellia (<i>Camellia japonica</i>)
Casuarictin	937	Drooping sheoak (<i>Casuarina stricta</i>)
Corilagin	634	Thunberg's geranium (<i>Geranium thunbergii</i>)
Geraniin	953	Thunberg's geranium (<i>Geranium thunbergii</i>)
Casuarinin	937	Drooping sheoak (<i>Casuarina stricta</i>)
Elaeagnatin A	1,246	Autumn olive (<i>Elaeagnus umbellata</i>)
Hippophaenin A	953	Sea buckthorn (<i>Hippophae rhamnoides</i>)
Dimers		
Agrimoniin	1,871	Chinese agrimony (<i>Agrimonia pilosa</i>)
Nobotanin B	1,873	Nobotan (<i>Melastoma candidum</i>)
Rugosin D	1,875	Ramanas rose (<i>Rosa rugosa</i>)
Heterophylliin B	1,873	Siberian filbert (<i>Corylus heterophylla</i>)
Oenothetin B	1,569	Evening primrose (<i>Oenothera stricta</i>)
Euphorbin C	1,887	Asthma weed (<i>Euphorbia hirta</i>)
Alienanin B	1,855	Oriental white oak (<i>Quercus aliena</i>), Cliffrose (<i>Cowania mexicana</i>)
Trimers		
Heterophylliin G	2,656	Siberian filbert (<i>Corylus heterophylla</i>)
Oenothetin A	2,354	Evening primrose (<i>Oenothera stricta</i>)
Catechins		
(-)-Epicatechin (EC)	290	} Green tea (<i>Camellia sinensis</i>)
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	442	
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	458	
Proanthocyanidins		
Procyanidin B-1	578	} Grape seed (<i>Vitis vinifera</i>), Cacao bean (<i>Theobroma cacao</i>), Loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>), Apple (<i>Malus sylvestris</i>)
Procyanidin B-3	578	
Procyanidin B-4	578	
Procyanidin B-5	578	
Procyanidin C-1	866	
Procyanidin polymer	3,170	Loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>)
Other polyphenols		
Chlorogenic acid	354	Cacao bean (<i>Theobroma cacao</i>), Loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>)
Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside	624	Blackbrush (<i>Coleogyne ramosissima</i>)
8-C-Rha-Glc-naringenin	580	Loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>)
Eryodictyol 7- <i>O</i> -glucoside	450	Blackbrush (<i>Coleogyne ramosissima</i>)
Iridin	328	German iris (<i>Iris germanica</i>)
Tri- <i>N</i> -coumaroylspermidine	583	Blackbrush (<i>Coleogyne ramosissima</i>)
Piceatannol-4'- <i>O</i> -(6"-galloyl)-Glc	558	Cajeput (<i>Melaleuca leucadendron</i>)
Terpenoids		
Roseoside	386	Loquat (<i>Eriobotrya japonica</i>)
3- <i>O</i> -Caffeoyl-betulinic acid	618	Cajeput (<i>Melaleuca leucadendron</i>)
Betulinic acid	457	Birch (<i>Betula</i> spp.)
Glycyrrhizin	822	Licorice (<i>Glycyrrhiza</i> spp.)

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Etude des tanins hydrolysables comme antimicrobiens naturels pour les produits cosmétiques

L'industrie cosmétique est en constante évolution poussée par les exigences changeantes des consommateurs qui sont orientés actuellement sur la naturalité des produits. Pour répondre à ces attentes, l'utilisation de matières premières naturelles, sans danger pour la santé et l'environnement, avec une liste restreinte d'ingrédients, est devenue essentielle. Des labels tels qu'Ecocert ou encore la norme internationale ISO 16128 témoignent de cette quête de naturalité. Les plantes riches en polyphénols, comme les tanins émergent comme des alternatives potentielles. Cette étude se focalisera sur les tanins hydrolysables, en mettant en lumière la punicalagine de la grenade. Bien que prometteurs, ces tanins nécessitent une concentration élevée pour une efficacité optimale, soulevant des défis liés aux coûts, à l'impact de la couleur sur les formules et à la toxicité. Une combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, par exemple des terpènes, pourrait être envisagée. En conclusion, les tanins hydrolysables issus de la coque entourant la grenade se révèlent prometteurs comme alternatives naturelles pour l'industrie cosmétique mais des ajustements sont nécessaires pour obtenir une efficacité comparable à celle des conservateurs synthétiques.

Mots-clés : Antimicrobiens, Tanins hydrolysables, Grenade, Naturalité

Study of hydrolysable tannins as natural antimicrobials for cosmetic products

The cosmetic industry is in constant evolution, it is driven by the demands changing of consumers who are currently focusing on the naturalness of products. In order to meet these expectations, the use of natural raw materials which are safe for both the health and the environment encompassing a restricted list of ingredients has become crucial. Labels such as Ecocert and the international standard ISO 16128 testify this quest for naturalness. Plants rich in polyphenols for instance tannins emerge as potential alternatives. This study will focus on hydrolysable tannins, highlighting punicalagin from pomegranate. Although promising these tannins require a high concentration for optimal effectiveness, they pose challenges that relate to costs, color impact on formulations and toxicity. Thus, a combination with other antimicrobial agents for example terpenes could be considered. In conclusion, hydrolysable tannins from pomegranate peel show promise as natural alternatives for the cosmetic industry, however adjustments are required to achieve effectiveness comparing to synthetic preservatives.

Keywords : Antimicrobials, Hydrolysable tannins, Pomegranate, Naturalness

