

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
People's Democratic Republic of Algeria  
The Minister of Higher Education and Scientific Research  
ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵏⵔⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵏⵔⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ

ABOU BEKR BELKAID UNIVERSITY  
TLEMCCEN  
FACULTY OF MEDICINE- Dr. B. BENZERDJEB  
PHARMACY DEPARTMENT



جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان  
كلية الطب - د. ب. بن زرجب  
قسم الصيدلة

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR  
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

THÈME :  
**Etudes des activités antioxydante et antifongique de *Psidium guajava* et  
*Jugulans regia***

Présenté par :  
**KHIAT Romaila  
MADJIDI Jouairia**

Soutenu le  
**23 juin 2022**

**Jury**

**Président :**

Dr. ABBAD Sarra

Maître de Conférences en Génie Pharmaceutique

**Membres :**

Dr. MEDJDOUB Houria

Maître de Conférences en biochimie.

Dr. GUENDOZ Souheyla

Maître assistante en Pharmacie galénique.

Dr. YUCEF Amina

Maître assistante en Pharmacie clinique.

**Encadrant :**

Dr. KADDOUR Faiza

Maître assistante en Pharmacie technologique.

**Co-Encadrant**

Dr. AISSAOUI Nadia

Maître assistante en Microbiologie.

(Université de Naama)

**Année universitaire : 2021-2022**

## REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nos remerciements les plus sincères*

*S'adressent à **ALLAH**, le tout-puissant, qui a fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui et nous a donné le courage, la volonté et la santé pour achever ce mémoire.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements nos gratitude et nos vives connaissance à **Mme KADDOUR FAIZA** Maître assistante en Pharmacie technologique a la faculté de médecine de Tlemcen pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils tout en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de sa sagesse, de ses encouragements et surtout de son temps et la confiance qu'elle nous accordé et qui nous ont permis de réaliser ce travail*

*Nos vifs remerciements vont à **Dr. AISSAOUI Nadia** pour l'intérêt qu'elle a manifesté pour la réalisation de ce travail. Nous avons l'honneur de nous appuyer sur ses connaissances et son expérience.*

*Nos vifs remerciements vont à **Dr. ABBAD Sarra** Maître de Conférences en Génie Pharmaceutique pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury De notre soutenance.*

*On adresse également nos vifs remerciements à : **Dr. GUENDOUZ Souheyla** , **Dr. YUCEF Amina** et **Dr. MEDJDOUB Houria** pour avoir accepté de faire partie du jury de Notre mémoire de fin d'étude..*

*Nos remerciements vont également au professeur **Mr GHALEM Said**, Professeur à l'université de Tlemcen faculté des sciences et Directeur du laboratoire de recherche "LASNABIO" Substances naturelles et bioactives"*

*Nous remercions très sincèrement **Mme MEHIAOUI kheira** pour les efforts qu'elle a déployés pour nous lors de nos manipulations au sein du laboratoire, sa patience et sa disponibilité.*

*Nos remerciements vont également au **Dr. METAI Mhammed** qui nous a rassuré l'identification botanique des espèces au laboratoire d'Ecologie et de la biodiversité végétale à l'Université SAAD DAHLEB DE BLIDA.*

*D'autre part, on adresse aussi nos remerciements les plus sincères à **Mme ARIBI IBTISSEM** ingénieur au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimique à BOUISMAIL de nous avoir effectuées l'identification chimique de huile essentielle.*

*Un très précieux remerciement va à **YASMINE ET RIADH** pour leurs aides Constant afin de finaliser ce travail.*

*Nos vifs remerciements vont à toute personne ayant contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

## **JE DEDIE CE TRAVAIL**

### **A ma chère maman Amina**

*L'exemple de la force et mon grand secours qui n'a jamais cessé de m'encourager et  
De me soutenir en permanence durant toutes les années de mes études.  
Sans toi, je n'ai pas pu être ce que je suis et je ne saurais pu progresser et achever ce  
Travail.*

*Puisse Dieux, le tout puissant te préserve et t'accorde une longue heureuse vie.*

### **A mon cher père Salim**

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai  
Toujours eu pour vous.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, ma  
Formation et mon bien être.*

### **A mon frère Riad**

*A tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour  
l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens  
fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

### **A toute ma famille KHIAT ET ALEM**

*Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et  
votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et  
bonheur.*

### **A mes chère sœurs Sirine et Lydia**

### **A ma chère binôme Jouairia**

*Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*A mes chères amies Farah, Lydia, Siham, Latifa, Farah, Narjes, Nesrine, Djihane et*

*A tous les autres que je n'ai pas cités mais qui comptent énormément pour moi*

*En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite,  
bonheur, santé et de prospérité.*

Beaucoup d'amour, ROMAILA

## DEDICACES

*A mes chers parents **MOHAMMED ET FATIHA***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous mes chers parents.*

*Ma source inépuisable de tendresse et de patience.*

*Vous m'avez donné la meilleure éducation, vous m'avez toujours encouragé et motivé dans mes études.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices consentis durant mon enfance jusqu'à présent*

*Je ferais de mon mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir*

*Que dieu vous protège et vous garde en bonne santé.*

*A mes adorables sœurs **Noussaiba , Khaoula et Hafsa***

*Et mes chers frères **Aboubakre et Abderrahmen***

*Je vous dédie ce travail avec toute profondeur des sentiments fraternelles et d'amour, d'attachement que j'éprouve à votre égard et souvenirs de notre indéfectible*

*Merci d'être présent toujours pour moi Et d'être toujours mon refuge dans les circonstances les plus difficiles*

*Puisse dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.*

*A mon âme sœur **Fatima***

*une amie comme on ne peut trouver nulle part ailleurs*

*En témoignage de l'amitié qui nous unit depuis l'enfance et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble,*

*Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A mon binôme **Romaila** pour son soutien morale, sa patience et sa compréhension toute au long de ce projet*

*Nous en avons traversé des beaux moments ensemble des instants de joie*

*Ton amitié est une véritable chance.*

*Mes sincères remerciements et ma reconnaissance à tous les membres de ma **famille** et tous mes **amis** qui m'ont aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études.*

***Beaucoup d'amour, JOUAIRIA***

## Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICACES.....</b>	<b>IV</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>V</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>X</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>XII</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>IX</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>XI</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : Synthèse bibliographique .....</b>	<b>5</b>

### Chapitre 1.

<b>1 Plantes médicinales .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Substances naturelles issues du métabolisme secondaire .....</b>	<b>11</b>
<b>3 Classifications et activités biologique .....</b>	<b>14</b>
3.1 Les composés phénoliques .....	14
3.2 Classification des polyphénols .....	14
<b>3.2.1 Les acides phénoliques.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2 Les flavonoïdes.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.3 Les tannins .....</b>	<b>18</b>
3.3 Les terpènes et les terpénoides .....	20
3.4 Les alcaloïdes .....	21
3.5 Les huiles essentielles .....	21
<b>3.5.1 Composition chimiques des huiles essentielles.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.2 Activités biologiques des huiles essentielles.....</b>	<b>23</b>

3.5.3	<b>Méthodes d'analyse des huiles essentielles</b> .....	24
<b>4</b>	<b>Méthodes d'extraction des métabolites secondaires</b> .....	25
4.1	Techniques d'extraction conventionnelles : .....	26
4.1.1	<b>L'extraction par solvant</b> : .....	26
4.1.2	<b>L'extraction liquide liquide (LLE)</b> .....	27
4.1.3	<b>L'hydrodistillation</b> .....	27
4.1.4	<b>L'extraction au Soxhlet</b> .....	27
4.2	Techniques d'extraction nouvelles .....	28
4.2.1	<b>L'extraction assistée par ultrasons (UAE)</b> .....	28
4.2.2	<b>L'extraction assistée par micro-ondes</b> .....	29
4.2.3	<b>Extraction par fluide supercritique (EFS)</b> .....	29
4.2.4	<b>L'extraction par solvant accélérée (ESA)</b> .....	30
4.2.5	<b>Extraction assistée par enzymes (EAE)</b> .....	30

## Chapitre 2. Stress oxydant et antioxydants

<b>Introduction</b> .....	32
<b>1 Stress oxydant</b> .....	32
<b>2 Radicaux libres</b> .....	34
2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	35
2.2 Les espèces réactives azotées (ERN) .....	36
2.3 Activités biologiques des espèces réactives .....	36
<b>3 Rôle des radicaux libres chez l'homme</b> .....	37
<b>4 Systèmes anti-oxydants</b> .....	39
4.1 Systèmes antioxydants enzymatiques .....	41
4.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques : .....	42
4.2.1 <b>Propriétés antioxydantes des composés phénoliques (Ph)</b> .....	42

4.2.2	Propriétés antioxydantes des huiles essentielles.....	43
5	Méthodes d'évaluation d'activité antioxydante .....	44

### Chapitre 3. Activité antifongique

<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
<b>1 Les candidoses .....</b>	<b>50</b>
<b>2 Candida albicans.....</b>	<b>50</b>
2.1 Caractère généraux.....	50
2.2 Distribution et habitats naturelle.....	52
2.3 Pathogénicité et facteurs de virulence.....	52
2.4 Facteurs favorisant les candidoses.....	53
2.5 Aspect clinique .....	53
2.6 Les infections superficielles .....	53
2.7 Les infections profondes .....	54
2.8 Les candidoses orales.....	55
<b>2.8.1 Types des candidoses orales.....</b>	<b>56</b>
<b>2.8.2 Diagnostic des candidoses orales .....</b>	<b>58</b>
2.9 Traitements des candidoses .....	59
<b>3 Traitements de candidoses orales.....</b>	<b>60</b>
3.1 Place des produits naturels dans le traitement des candidoses .....	61

### 2<sup>ème</sup> partie: Matériel et méthodes

<b>1 Matériel Végétal.....</b>	<b>64</b>
1.1 Préparation du matériel végétal .....	66
1.2 Préparation des extraits .....	67

1.2.1	Extraction par macération.....	67
1.2.2	Extraction par soxhlet.....	69
1.2.3	L'hydrodistillation .....	70
2	Analyse de la composition chimique d'huile essentielle par CPG et CPG/SM .....	72
3	Dosage des polyphénols totaux .....	73
4	Activité antioxydante .....	74
4.1	Piégeage du radical 2,2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH•).....	74
4.2	Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	75
5	Evaluation in vitro des activités Biologique .....	76
5.1	Activité antifongique :.....	76
5.2	Technique de diffusion sur gélose .....	76
5.3	Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	76

### 3ème partie : Résultats et discussion

1	Extraits bruts .....	79
2	Huile essentielle de <i>Psidium guajava</i> .....	81
3	Analyse de la composition chimique d'huile essentielle de <i>Psidium guajava</i> par CPG/SM.....	83
4	Dosage des polyphénols totaux .....	86
5	Activité antioxydante .....	90
5.1	Piégeage des radicaux libres DPPH.....	91
5.2	Pouvoir réducteur FRAP .....	96
6	L'activité antifongique.....	98
6.1	Evaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion des disques .....	99
6.2	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits par la méthode des plaques de microtitration .....	102

## Annexe

<b>Monographie de Psidium guajava .....</b>	<b>108</b>
<b>MONOGRAPHIE DE Juglans regia .....</b>	<b>115</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>121</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Voies du métabolisme secondaire des plantes et la Relations biogénétiques Entre eux (31) .....	13
<b>Figure 2</b> : Structure du noyau phénol.....	14
<b>Figure 3</b> : les principales classes des composés (34). .....	15
<b>Figure 4</b> : structure de l'acide phénolique. ....	16
<b>Figure 5</b> : structure de deux acides phénoliques (acide vanilique et acide gallique).....	16
<b>Figure 6</b> : Structures chimiques de quelque dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	16
<b>Figure 7</b> : squelette de base des flavonoïdes.....	17
<b>Figure 8</b> : Structure chimique de quelques flavonoïdes. ....	18
<b>Figure 9</b> : structure des différents tanins. ....	19
<b>Figure 10</b> : La balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants (49). .....	33
<b>Figure 11</b> : Mécanisme à l'origine du stress oxydant (97) .....	34
<b>Figure 12</b> : Les molécules cibles de l'attaque radicalaire (107). .....	38
<b>Figure 13</b> : neutralisation d'un radicale libre par un antioxydant (103). ....	40
<b>Figure 14</b> : Schéma montrant l'action du système de défense des antioxydants endogènes lors de la production des E.R.O par des réactions enzymatiques. (NOS: oxyde nitrique synthase / NOX: NADPH oxydase / XO: xanthine oxydase / SOD: superoxyde dismutase / Cat: catalase / GPx: glutathion peroxydase _GR: glutathion réductase) (116). .....	41
<b>Figure 15</b> : Aspect macrosopique des colonies de <i>Candida sp</i> (143). .....	51
<b>Figure 16</b> : les trois aspects morphologiques de <i>C.albicans</i> (143). ....	52
<b>Figure 17</b> : des exemples sur l'infection superficielle (intertrigo et onyxis)(151). ....	54
<b>Figure 18</b> : les différentes étapes mennant à l'infetion par candida albicans (151).....	55
<b>Figure 19</b> : Candidose pseudomembraneuse aiguë (153).....	58
<b>Figure 20</b> : Mécanisme d'action des antifongiques (163). ....	60
<b>Figure 21</b> : Situation géographique des stations de collecte.....	66
<b>Figure 22</b> : Appareil d'extraction par macération.....	68
<b>Figure 23</b> : Evaporateur rotatif .....	68
<b>Figure 24</b> : Extraction par l'appareil soxhlet.....	70
<b>Figure 25</b> : Appareil de hydro distillation .....	71
<b>Figure 26</b> : Chromatographe CPG/SM.....	73

<b>Figure 27</b> : Forme libre et réduite du DPPH (177). .....	74
<b>Figure 28</b> : histogramme des Rendements des extraits bruts des échantillons <i>Juglans regia</i> et <i>Psidium guajava</i> . .....	80
<b>Figure 29</b> : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de <i>Psidium guajava</i> . .....	84
<b>Figure 30</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. ....	87
<b>Figure 31</b> : Concentration croissante en polyphénols. ....	88
<b>Figure 32</b> : Concentration des composés phénoliques totaux de <i>Psidium guajava</i> et <i>Juglans regia</i> . ....	88
<b>figure 33</b> : structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (206). .....	91
<b>Figure 34</b> : histogramme des IC50 des extraits et HE étudiés ainsi que le BHT et vit C. ....	94
<b>Figure 35</b> : Pouvoir réducteur des extraits et HE des feuilles de PG et d'écorces de JR. ....	97
<b>Figure 36</b> : Résultats de l'activité antifongique des extraits testée sur la souche <i>C.albicans</i> 26790 par la technique de diffusion des disques. ....	100
<b>Figure 37</b> : feuille de goyavier.....	109
<b>Figure 38</b> : fleure de goyavier.....	110
<b>Figure 39</b> : Fruit de goyavier .....	110
<b>Figure 40</b> : Distribution de la goyave dans le monde (Google, 2021).....	111
<b>Figure 41</b> : l'écorce <i>J.regia</i> " <i>M'iswak</i> ". .....	115
<b>Figure 42</b> : Arbre de <i>Juglans regia</i> L.....	117
<b>Figure 43</b> : fruits et feuilles de <i>J.regia</i> . ....	117
<b>Figure 44</b> : structure de juglone (5hydroxy-1,4-naphtagulone) .....	119

## Liste des tableaux

Tableau II : Divers essais in vitro couramment employés pour évaluer l'activité antioxydante (131). .....	45
Tableau III : les formes de <i>C. albicans</i> les plus distinctes (156). .....	57
Tableau IV : les espèces récoltées lors de screening primaire.....	65
Tableau V : les données recueillis sur les espèces choisies.....	65
Tableau VI : L'aspect, la couleur et le rendement des extraits éthanolique des feuilles de <i>Psidium guajava</i> et des écorce de tronc de <i>Jugulans regia</i> .....	79
Tableau VII : Caractères organoleptiques de l'HE de PSIDIUM GUAJAVA.....	82
Tableau VIII : Résultats du dosage des polyphénols .....	87
Tableau IX : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et du BHT à différentes concentrations. ....	92
Tableau X : Résultats de l'activité antifongique des extraits testée par la technique de diffusion des disques. ....	100
Tableau XI : les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits.....	102

## Liste des abréviations

- (ABTS)** : Test de l'acide 2,20-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique.
- (AC)** : absorbance du contrôle négatif.
- (AE)** : absorbance de l'échantillon.
- (ATCC)** : American Type Culture Collection
- (ATF)** : Les antifongiques.
- (BHT)** : L'hydroxytoluène butylé
- (Cat)** : catalase.
- (CAT)** : catalase.
- (CC)** : Chromatographie liquide sur Colonne ouverte.
- (CCM)** : Chromatographie sur Couche Mince.
- (CGP)** : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative.
- (CI50)** : concentration qui correspond à 50% d'inhibition
- (CLHP)** : Chromatographie Liquide Haute Performance.
- (CMC)** : candidoses mucocutanées chroniques.
- (CMI)** : concentration minimale inhibitrice.
- (CPG)** : chromatographie en phase gazeuse.
- (CPG/SM)** : La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- (CUPRAC)** : Test de la capacité antioxydante réductrice du cuivre
- (DMPD)** : Test au N,N-Diméthyl-p-phénylènediamine .
- (DPPH)** : piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- (DPPH•)** : radical 2,2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazyl
- (EAE)** : Extraction assistée par enzymes.
- (EAG)** : équivalent d'acide gallique.
- (EFS)** : Extraction par fluide supercritique.
- (ERN)** : espèces réactives azotées.
- (ERO)** : espèces réactifs d'oxygènes.
- (LBDD)** : la conception de médicaments basée sur le ligand.
- (LLE)** : extraction liquide-liquide.
- (LPO)** : peroxydation lipidique.
- (M HE)** : Masse de l'huile essentielle extraite
- (M MV)** : Masse de matière végétale séchée.
- (Me)** : masse d'extrait après évaporée.
- (MEP)** : 2-méthylerythritol 4-phosphate.
- (Ms)** : masse de la matière séchée.
- (MVA)** : voie du mévalonate.
- (NEC)** : petites entités chimiques.
- (NO)** : monoxyde d'azote.
- (NOS)** : oxyde nitrique synthase.
- (NOS)** : nitrique oxyde synthases
- (NOS)** : nitrique oxyde synthases.
- (NOX)** : NADPH oxydase.
- (O2)** : oxygène.
- (O2•)** : radical superoxyde
- (OMS)** : Organisation mondiale de la santé.
- (ONOO)** : peroxydinitrite.
- (ORAC)** : Test de capacité d'absorption des radicaux oxygénés.
- (PBP2A)** : penicillin-binding proteine A2.
- (PFRAP)** : Essai du pouvoir réducteur du ferricyanure de potassium.
- (PI)** : pourcentage d'inhibition.
- (PN)** : produits naturels.
- (R HE)** : Rendement en huile essentielle
- (RMN-1H)** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
- (ROO•)** : radical peroxy

**(EROA)** : espèces le radical hydroxyl.

**(ESA)** : L'extraction par solvant accélérée.

**(ESL)** : extraction solide liquide.

**(FRAP)** : Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique.

**(GGT)** : et dosage de l'activité gamma-glutamyl transpeptidase.

**(GPx)** : glutathion peroxydase.

**(GR)** : glutathion réductase.

**(GSHPx)** : glutathion peroxydase.

**(GST)** : glutathion-S-transférase.

**(GSt)** : glutathion-S-transférase.

**(GST)** : la glutathion-S-transférase

**(H2O2)** : peroxyde d'hydrogène

**(H2O2)** : peroxyde d'hydrogène.

**(HAT)** : le transfert d'atomes d'hydrogène.

**(HE)** : huile essentielle.

**(HO2)** : Radical peroxy.

**(HORAC)** : Test de capacité à éviter les radicaux hydroxyles.

**(IFI)** : infections fongiques invasives.

**(IOU)** : Test d'absorption inhibée de l'oxygène.

**(Ir)** : indices de rétention.

**(IRTF)** : Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier.

**(KOH)** : hydroxyde de potassium.

**(RPM)** : rotation par minute.

**(S/L)** : rapport solide/liquide

**(SBDD)** : la conception de médicaments basée sur la structure.

**(SET)** : transfert d'électrons.

**(SH)** : groupement sulfhydryle.

**(SM)** : spectrométrie de masse.

**(SOD)** : superoxyde dismutase.

**(SOD)** : radical superoxyde.

**(SOD)** : superoxyde dismutase.

**(SOD)** : superoxydismutase.

**(TAC)** : Capacité antioxydante totale.

**(TBA)** : Test de l'acide thiobarbiturique.

**(TEAC)** : Capacité antioxydante équivalente au Trolox.

**(TMM)** : Test au tétraméthylmurexide.

**(TPC)** : teneur en composé phénoliques

**(TRAP)** : Test du paramètre antioxydant de piégeage des radicaux totaux.

**(UAE)** : L'extraction assistée par ultrasons.

**(UICN)** : Union internationale pour la conservation de la nature.

**(UV)** : Ultra-violet.

**(XO)** : xanthine oxydase.

---

## Introduction générale

---

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des milliers d'années comme remèdes traditionnels pour de nombreuses maladies humaines dans le monde entier. Dans les régions rurales des pays en développement, elles constituent encore la principale source de médicaments. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population des pays en développement dépend de la médecine traditionnelle pour ses besoins médicaux primaires et qu'environ 85% de la médecine traditionnelle est basée sur des extraits de plantes. Cela implique qu'environ 3,5 à 4 milliards de personnes dans le monde dépendent des plantes comme ressources en médicaments (1). L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est considérée comme l'utilisation la plus importante de la biodiversité mondiale. Plus d'espèces végétales sont utilisées comme médicaments que comme aliments. Ce fait indique que les produits naturels jouent un rôle important dans le développement de nouveaux médicaments.

Les plantes contiennent de nombreux composés actifs tels que des alcaloïdes, des stéroïdes, des tanins, des glycosides, des huiles volatiles, des huiles fixes, des résines, des phénols et des flavonoïdes, que l'on retrouve dans leurs parties spécifiques telles que les feuilles, les fleurs, l'écorce, les graines, les fruits, les racines, etc. Les effets thérapeutiques des matières végétales sont généralement le résultat de la combinaison de ces métabolites

secondaire(2). Les produits chimiques naturels dérivés des plantes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, anti-inflammatoires, antiarthritiques et radio-protectrice. En raison de ces propriétés plusieurs secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations(3, 4).

De nombreux antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxytoluène et le butylhydroxyanisole sont utilisés comme additifs alimentaires pour prévenir la détérioration des aliments. Bien que ces antioxydants synthétiques présentent une activité antioxydante plus forte que celle des antioxydants naturels tels l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique, il y a une préoccupation concernant leurs effets indésirables sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse. Par conséquent, la mise au point d'antioxydants naturels comme alternative aux antioxydants synthétiques suscite un grand intérêt chez les chercheurs (5, 6).

Les maladies infectieuses et les pathologies microbiennes sont à l'origine de millions de décès chaque année. Elles continuent d'être les principales causes de décès dans les pays à faible revenu, ainsi que la troisième cause de décès dans le monde. Les infections fongiques invasives représentent une menace permanente et grave pour la santé humaine et sont associées à au moins 1,5 million de décès dans le monde chaque année. Ces infections sont très fréquentes chez les patients immunodéprimés à la suite de thérapies agressives (par exemple, chimiothérapie anticancéreuse, traitement à long terme par corticostéroïdes ou transplantation d'organes) et d'infections immunosuppressives telles que le VIH/SIDA. Environ 90% de ces décès sont causés par des espèces appartenant aux genres de levures *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* et *Rhizopus* (7).

Malheureusement, le traitement de ces infections a été entravé par l'émergence de la résistance aux antimicrobiens, qui est considérée comme l'une des menaces les plus graves pour le système de santé mondial au cours de ce siècle. Suite à cette situation, il semble donc important de trouver une alternative. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces phénomènes de résistance fongiques et d'oxydation des aliments.

L'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations

populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Ce sont des savoir-faire ancestraux transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurales. C'est un héritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées. Dans un pays comme l'Algérie, où la flore est abondante, la valorisation de la filière des plantes médicinales est devenue critique. Plusieurs laboratoires de recherche scientifique ont été créés afin de développer cette filière en vue de l'utiliser dans divers domaines, notamment la fabrication de produits pharmaceutiques, agricoles et cosmétiques (8).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel et la contribution à la connaissance de deux plantes de la médecine traditionnelle dont le but principal est l'exploitation de nouvelles molécules bioactives à partir de la partie aérienne de *Psidium guajava* et les écorces de *Juglans regia* et leur utilisation comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques.

Le manuscrit est organisé en trois grandes parties :

La première partie est une synthèse bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de notre travail qui inclut trois chapitres.

- Le premier présente les principales classes des métabolites secondaire (définition, classification et propriétés) ainsi que leurs propriétés biologiques, Cette partie est complétée par une description des méthodes d'analyses chromatographiques utilisées dans la caractérisation et l'identification.
- Dans Le deuxième chapitre, nous développons une mise au point exhaustive sur l'activité antioxydante des phytomolécules.
- dans le dernier chapitre on donne un aperçu l'activité antifongiques des métabolites secondaires.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés, nous avons donné une explication détaillée de la démarche méthodologique, en partant de la collecte des échantillons, leur séchage, broyage, extraction et séparation. Nous avons aussi, mis le point sur tous les protocoles adoptés pour le dosage des polyphénols, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits préparés. Nous avons abordé aussi les différentes techniques permettant d'évaluer l'activité antifongique in vitro des extraits.

La troisième partie a été consacré à la mise en exergue et la discussion de tous les résultats obtenus, en comparaison avec les études antécédentes pour les mettre en valeur.

Enfin nous achèverons ce travail par une conclusion générale dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées, en se basant sur les résultats obtenus.

# ***ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

# 1<sup>ère</sup> partie : Synthèse bibliographique

## Chapitre 1.

---

### Les plantes dans la thérapeutique

---

#### Sommaire

---

- 1 Plantes médicinales** ..... Error! Bookmark not defined.
- 2 Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire**.....Error! Bookmark not defined.
- 3 Classifications et activités biologique** ..... Error! Bookmark not defined.
  - 3.1 Les composés phénoliques ..... **Error! Bookmark not defined.**
  - 3.2 Classification des polyphénols ..... **Error! Bookmark not defined.**
    - 3.2.1 Les acides phénoliques**..... Error! Bookmark not defined.
    - 3.2.2 Les flavonoïdes** ..... Error! Bookmark not defined.
    - 3.2.3 Les tannins** ..... Error! Bookmark not defined.
  - 3.3 Les terpènes et les terpénoides ..... **Error! Bookmark not defined.**
  - 3.4 Les alcaloïdes ..... **Error! Bookmark not defined.**
  - 3.5 Les huiles essentielles ..... **Error! Bookmark not defined.**
    - 3.5.1 Composition chimiques des huiles essentielles..** Error! Bookmark not defined.
    - 3.5.2 Activités biologiques des huiles essentielles**..... Error! Bookmark not defined.
    - 3.5.3 Méthodes d'analyse des huiles essentielles** ..... Error! Bookmark not defined.
- 4 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires** ..... Error! Bookmark not defined.
  - 4.1 Techniques d'extraction conventionnelles :..... **Error! Bookmark not defined.**
    - 4.1.1 L'extraction par solvant** : ..... Error! Bookmark not defined.
    - 4.1.2 L'extraction liquide liquide (LLE)** ..... Error! Bookmark not defined.
    - 4.1.3 L'hydrodistillation** ..... Error! Bookmark not defined.
    - 4.1.4 L'extraction au Soxhlet**..... Error! Bookmark not defined.

4.2	Techniques d'extraction nouvelles .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.1	L'extraction assistée par ultrasons (UAE) .....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2	L'extraction assistée par micro-ondes .....	Error! Bookmark not defined.
4.2.3	Extraction par fluide supercritique (EFS) .....	Error! Bookmark not defined.
4.2.4	L'extraction par solvant accélérée (ESA).....	Error! Bookmark not defined.
4.2.5	Extraction assistée par enzymes (EAE).....	Error! Bookmark not defined.

## Introduction

Depuis l'antiquité, La relation de l'homme avec la nature était longue et compliquée. L'Homme primitif s'est appuyé sur la nature pour subvenir à ses nécessités de base à savoir la nourriture, l'habillement, l'abri et également pour ses besoins médicamenteux. La médecine et les produits naturels (PN) ont été étroitement liés. Les ressources naturelles constituent la source principale de remède pour soigner différentes maladies et infections et demeure jusqu'au présent, la source principale pour l'obtention des nouvelles molécules actives dans le domaine pharmaceutique(9).

Les produits naturels sont des composés organiques dérivés de sources naturelles (des plantes, des animaux et des micro-organismes). Ils sont généralement des molécules relativement petites dont le poids moléculaire est inférieur à 3 000 Daltons et qui présentent une diversité structurale considérable et possèdent des activités biologiques intéressantes. Ils peuvent provenir de quatre sources principales :

- (i) Un organisme entier (par exemple, une plante, un animal ou un micro-organisme),
- (ii) Une partie d'un organisme (par exemple, les feuilles ou les fleurs d'une plante, ou un organe animal isolé),
- (iii) Un extrait d'un organisme ou une partie d'un organisme, et
- (iv) Des composés purs isolés des plantes, d'animaux ou de micro-organismes (par exemple, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des glycosides, des stéroïdes, des sucres, des terpénoïdes, etc.)(10).

Actuellement, il est incontestable que les produits naturels ont été, et seront, des sources essentielles d'agents thérapeutiques pharmaceutiques innovants. Les études cliniques, pharmacologiques et chimiques des remèdes traditionnels, principalement dérivés de plantes, ont été à l'origine de la découverte de la plupart des premiers médicaments tels que l'aspirine, la digoxine, la morphine, la quinine et la pilocarpine(11, 12).

Selon des études antérieures, 67 % des 974 nouvelles molécules commercialisées en tant que médicaments pendant les vingt-cinq dernières années sont dérivées ou inspirées de produits naturels, et ce chiffre s'élève jusqu'à 76 % pour les composés anticancéreux. Sur les 877 petites entités chimiques (NEC) introduites entre 1981 et 2002, près de la moitié (49 %) étaient des produits naturels, des analogues semi-synthétiques de produits naturels ou des composés synthétiques basés sur des pharmacophores de produits naturels (13).

Plus de 20 nouveaux médicaments lancés sur le marché entre 2000 et 2005, provenant de plantes terrestres, de micro-organismes terrestres, d'organismes marins et de vertébrés et invertébrés terrestres sont décrits (14).

Les statistiques décrites ci-dessus ont conduit les chercheurs à renouveler leur intérêt pour l'étude des produits naturels. On assiste dernièrement, au retour en force de ce domaine, et ceci pour des raisons multiples (13). Tout d'abord, l'engouement pour la chimie combinatoire, qui promettait il y a quelques années d'abreuver la chimie médicinale avec une multitude de nouvelles petites molécules de synthèse, a nettement diminué et son utilisation est aujourd'hui plus raisonnée. D'autre part, les difficultés techniques liées au développement de nouveaux produits naturels en tant qu'agents thérapeutiques sont à l'heure actuelle résolues, tout du moins en partie, par les avancées récentes en matière de techniques de séparation et d'analyse (14).

En fin, Cette nouvelle tendance, probablement destinée à se développer et à conduire une quantité substantielle de produits naturels à atteindre le marché dans un avenir proche, est également soutenue par la vérité objective que le règne végétal comprend un très grand nombre d'espèces, chacune d'entre elles étant capable de produire une large gamme de composés bioactifs basés sur des structures chimiques différentes.

En conclusion, une approche multidisciplinaire de la découverte de médicaments, impliquant la génération d'une diversité moléculaire réellement nouvelle à partir de sources de produits naturels, combinée à des méthodologies de synthèse totale et de chimie combinatoire et incluant la manipulation des voies de biosynthèse, continuera à fournir la meilleure solution à la crise de productivité actuelle à laquelle est confrontée la communauté scientifique engagée dans la découverte et le développement de médicaments.

## **1 Plantes médicinales**

La phytothérapie, du grec *Phyto* et *Therapeia*, est l'art de se soigner par les plantes ; pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogue (15).

L'efficacité de la phytothérapie est prouvée et elle est toujours vue comme un remède profond, doux et respectueux du corps, utilisé par la population rurale à travers le monde par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. L'action des plantes médicinales est :

- Pharmacologique et rationnelle, car c'est par la présence de molécules très complexes (les principes actifs que la plante agit.
- Systémique et holistique, car une plante n'agit pas sur un seul organe ou une seule cellule mais sur un organisme entier.
- Globale parce que la plante entière a toujours une action plus douce, plus large et plus profonde que la substance dite active(16).

L'utilisation des plantes par l'être humain pour leurs propriétés médicinales remonte aux plus hautes antiquités. Elle trouve ses origines dans les plus anciennes civilisations de l'Orient et de l'Occident. Pendant tout ce temps, les plantes médicinales n'étaient utilisées que sur une base empirique, sans connaissance de leurs activités pharmacologiques ou de leurs constituants actifs. La découverte rationnelle de médicaments à partir de plantes a commencé au début du 19e siècle, lorsque l'allemand Friedrich Sertürner a réussi à isoler l'agent analgésique et somnifère de l'opium qu'il a nommé morphium (morphine), ce qui a déclenché la recherche dans d'autres plantes médicinales. Au cours des décennies suivantes du 19e siècle, de nombreux produits naturels bioactifs, principalement des alcaloïdes (par ex, quinine, caféine, nicotine, codéine, atropine, colchicine, cocaïne, capsaïcine) ont pu être isolés de leur source naturelle (17).

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population globale dépend notamment de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie pour les soins sanitaires, ce qui semble être une solution acceptable. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Il a été rapporté aussi que 60% des préparations médicamenteuses, dans les pays industrialisés, dérivent des plantes ; ces dernières agissent comme sources d'agents thérapeutiques modèles pour de nouveaux

composés synthétiques ou comme matière de base pour la production semi synthétique de molécules de haute complexité (18).

Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation,), permettre l'isolation du principe actif (19).

En 2015, l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN) a annoncé qu'environ 310 000 espèces végétales avaient été décrites à ce jour. Sur l'ensemble des espèces végétales connues à ce jour, seules 60 000 espèces, soit environ 20 %, ont déjà été criblées et ont fourni 135 médicaments connus. Par conséquent, en faisant une projection rapide, ces chiffres suggèrent que le criblage des espèces végétales restantes pourrait permettre de détecter environ 700 nouveaux candidats médicaments. En outre, la plupart des 60 000 plantes déjà criblées ont été étudiées pour leurs effets sur un nombre limité de cibles thérapeutiques et il est encore possible de trouver d'autres effets ou de nouveaux effets sur d'autres cibles (20).

L'importance capitale des produits botaniques pour l'humanité est due principalement à leurs phyto-composés, des principes actifs aux propriétés thérapeutiques. Les plantes produisent des composés phytochimiques afin de se prémunir contre les dangers naturels tels que les insectes prédateurs, la pollution et les maladies. Les composés produits par les plantes sont classés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont nécessaires à la croissance et au métabolisme de base de toutes les plantes, tandis que la plupart des métabolites secondaires ne sont pas essentiels, mais peuvent jouer des rôles cruciaux dans d'autres fonctions et sont essentiellement les molécules bioactives des plantes ayant une activité thérapeutique, préventive, toxicologique et immunostimulante (21).

Différentes approches sont utilisées pour sélectionner le matériel de départ pour la découverte de nouveaux composés végétaux pharmacologiquement actifs.

Dans l'approche de criblage aléatoire, les extraits de plantes, les fractions enrichies ou les composés isolés sont choisis au hasard en fonction de leur disponibilité. Dans le contexte de la découverte de médicaments à base de plantes, cette approche peut être très avantageuse lorsqu'elle est appliquée à des échantillons provenant de régions à forte biodiversité et

endémisme, car la diversité chimique des produits naturels peut refléter la biodiversité de leurs organismes d'origine (17).

Dans l'approche ethnopharmacologique ou l'approche classique, l'usage médicinal traditionnel des plantes constitue la base de la sélection du matériel d'essai. L'ethnopharmacologie implique l'observation, la description et l'étude expérimentale des médicaments utilisés traditionnellement et de leurs bioactivités. Il s'agit d'un concept transdisciplinaire basé sur la botanique, la chimie, la biochimie et la pharmacologie, qui implique de nombreuses disciplines au-delà des sciences naturelles, comme l'anthropologie, l'archéologie et l'histoire(22).

En plus de l'approche ethnopharmacologique, une autre possibilité de sélection du matériel végétal pour les tests pharmacologiques est l'approche chimiosystématique ou phylogénétique, qui utilise les connaissances chimiotaxonomiques et les données phylogénétiques moléculaires afin de sélectionner les espèces végétales des genres ou des familles connus pour produire des composés ou des classes de composés associés à une certaine bioactivité ou à un certain potentiel thérapeutique d'une manière plus ciblée(23).

Les méthodes computationnelles ou informatiques sont une autre approche très puissante qui permet de sélectionner des plantes ou des produits naturels présentant une forte probabilité d'activité biologique. Les approches computationnelles couramment utilisées pour la découverte de médicaments peuvent être classées en trois catégories : la conception de médicaments basée sur la structure (SBDD), la conception de médicaments basée sur le ligand (LBDD) et les approches basées sur la séquence (24).

## **2 Substances naturelles issues du métabolisme secondaire**

Le règne végétal produit des centaines de milliers de composés organiques de faible poids moléculaire. Sur la base des fonctions supposées de ces composés, la communauté des chercheurs les a classés en trois grands groupes : les métabolites primaires, qui sont directement nécessaires à la croissance des plantes, les métabolites secondaires, qui servent de médiateurs entre les plantes et l'environnement, les hormones, qui régulent les processus et le métabolisme de l'organisme (25).

Les métabolites primaires sont des molécules constitutives ou permanentes qui sont directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ces composés ont généralement une fonction physiologique intrinsèque typiquement présente dans de nombreux organismes. Ils sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule, de l'organisme. On distingue : les acides aminés, source primaire de construction des protéines, les glucides (glucose, saccharose, amidon...), source d'énergie et les lipides (26).

Les métabolites secondaires sont un groupe de composés bioactifs, principalement produits à partir de métabolites primaires. Ils n'ont pas de rôle direct dans la croissance et le développement des plantes, mais sont bien connus pour leur rôle dans la défense des plantes et leurs propriétés aromatiques et médicinales. Ils constituent également une source importante de produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques (27).

En tant que composés organiques, les métabolites secondaires sont considérés comme une ressource en carbone des plantes et beaucoup d'entre eux agissent dans la défense chimique des plantes. En plus de la défense chimique contre les herbivores, les pathogènes et d'autres plantes, les métabolites secondaires peuvent participer à des réponses allélopathiques dans la compétition entre les plantes pour la germination et croissance. Ainsi, les métabolites secondaires des plantes sont importants pour les interactions des plantes avec leur environnement et sont, à leur tour, importants pour leur survie et leur propagation. Certains métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux (monoterpènes parfumées, anthocyanes de couleur ou de caroténoïdes dans les fleurs), nécessaires à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs. Divers facteurs, tels que l'âge de la plante, la saison, le microbillage, le pâturage, le rayonnement, la concurrence, l'état nutritionnel et de nombreux facteurs environnementaux ont un impact sur le taux du métabolisme secondaire (25).

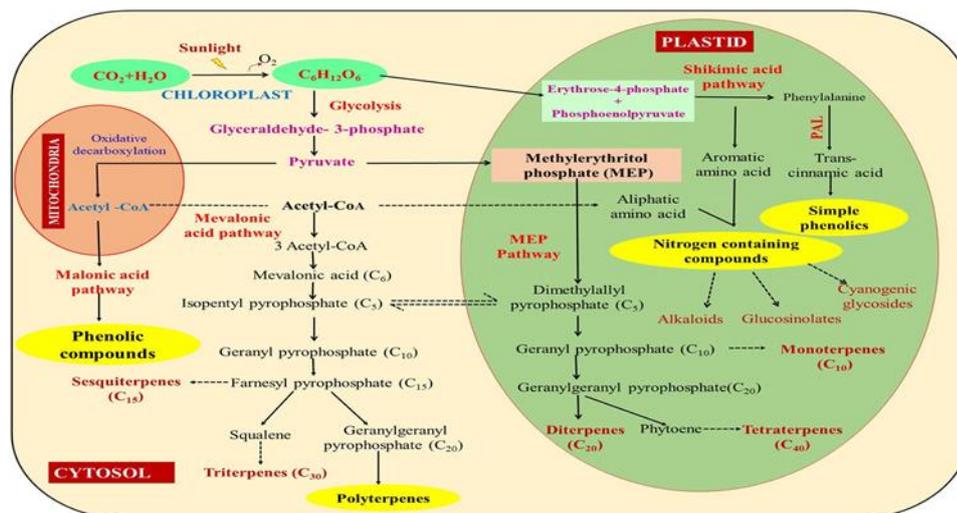
Les plantes produisent différents types de métabolites secondaires. Classés en trois grands groupes en fonction de leur origine : les terpénoïdes, les composés phénoliques et les composés azotés (28).

Les propriétés aromatiques de la plante sont dues à la présence de composés qualitatifs connus sous le nom de "terpénoïdes" dérivés de l'isoprène (C5) combinés en tête et en queue, synthétisés par deux voies dans les plantes : la voie du mévalonate (MVA) et la voie du 2-méthylerythritol 4-phosphate (MEP) (16).

Les substances phénoliques constituent une autre catégorie importante de métabolites secondaires produits en réponse aux stress abiotique, Ces composés aromatiques sont constitués de plus d'un groupe hydroxyle qui sont méthylés ou glycosylés (29).

Les phénols peuvent être divisés en cinq sous-groupes : les acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, lignines et tannins. Les voies de l'acide shikimique et de l'acide malonique sont responsables de la biosynthèse des précurseurs de tous les composés phénoliques(28).

Les métabolites secondaires contenant de l'azote sont principalement classés en deux catégories, à savoir les alcaloïdes et les glycosides. Les alcaloïdes constituent le troisième groupe le plus important de métabolites secondaires, qui contiennent des atomes d'azote hétérocycliques, classés en trois catégories : les alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes et pseudoalcaloïdes (30).



**Figure 1 :** Voies du métabolisme secondaire des plantes et la Relations biogénétiques Entre eux (31) .

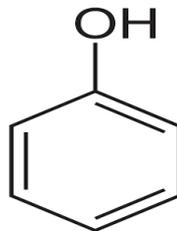
### 3 Classifications et activités biologique

#### 3.1 Les composés phénoliques

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques ; constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal en regroupant un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques(32).

Classiquement considérés comme des métabolites secondaires, présents chez tous les végétaux supérieurs (33). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (Fig. 2), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (34).

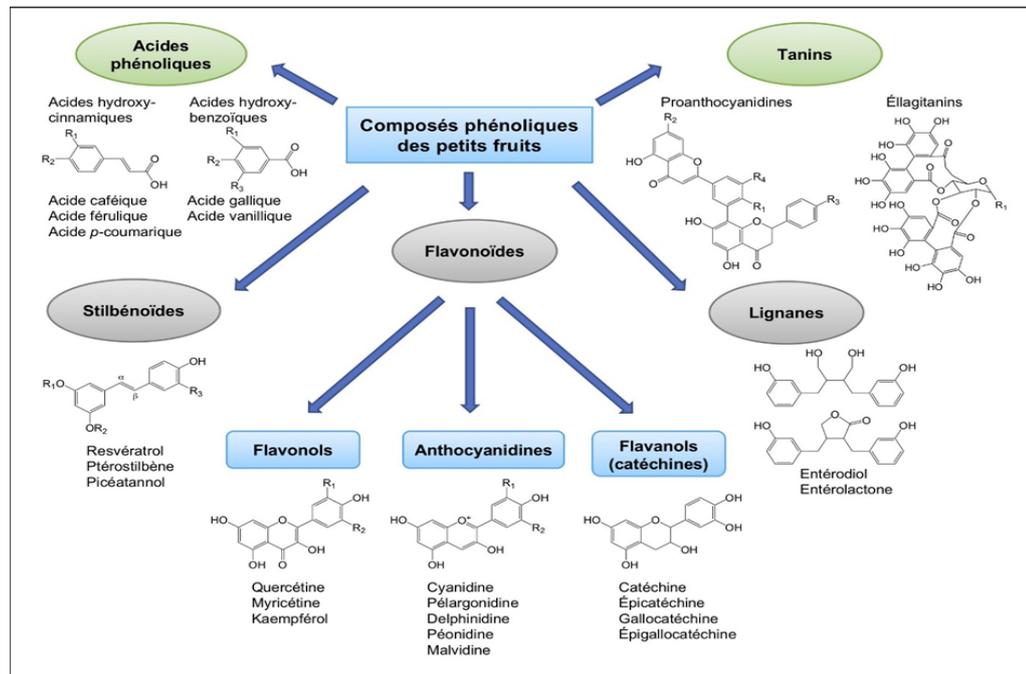


**Figure 2 :** Structure du noyau phénol

#### 3.2 Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Ces composés peuvent être regroupés en plusieurs catégories qui se différencient par la complexité du squelette de base, puis par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec

d'autres molécules (glucides généralement) (35). On distingue : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les stilbènes et les quinones (figure3) (36, 37)

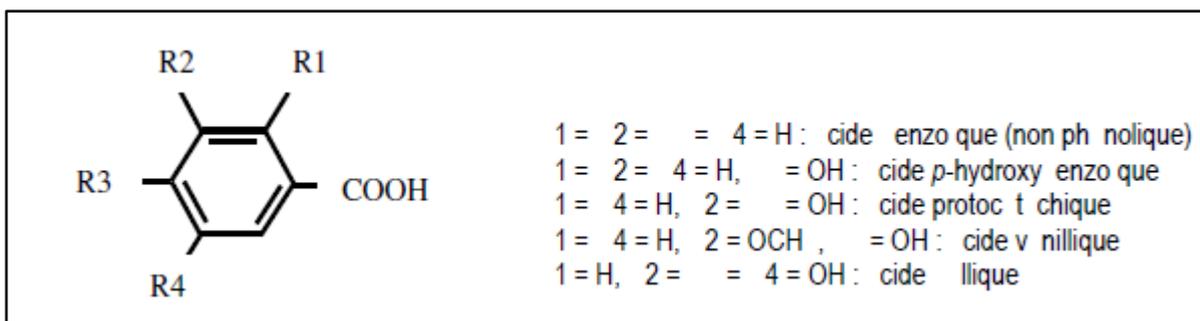


**Figure 3:** les principales classes des composés (34).

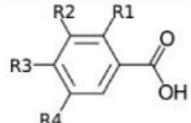
### 3.2.1 Les acides phénoliques

Un acide phénolique est un composé organique qui possède au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) et de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3).

Les dérivés de l'acide sont abondants dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres. Les composés de cette catégorie les plus répandus sont illustrés dans la figure 4 (38).

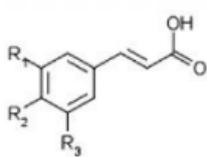


**Figure 4 :** structure de l'acide phénolique.

Squelette	Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
	Acide vanillique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH

**Figure 5 :** structure de deux acides phénoliques (acide vanillique et acide gallique).

Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique sont plus abondants que les dérivés d'acide hydroxybenzoïque et ils ont une distribution plus large. Les principaux représentants de cette catégorie sont l'acide caféique présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits, l'acide *p*-coumarique, acide férulique et l'acide sinapique(39).

Squelette de base	Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
	Acide <i>p</i> -coumarique	H	OH	H
	Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	Acide caféique	OH	OH	H

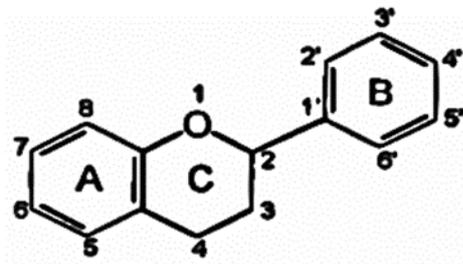
**Figure 6 :** Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Les acides phénoliques et leurs analogues possèdent de larges bioactivités, dont certaines peuvent jouer un rôle dans la prévention du cancer. La plupart des acides phénoliques ont une capacité antioxydante, et la capacité de piégeage des radicaux des acides phénoliques dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle et des substituants

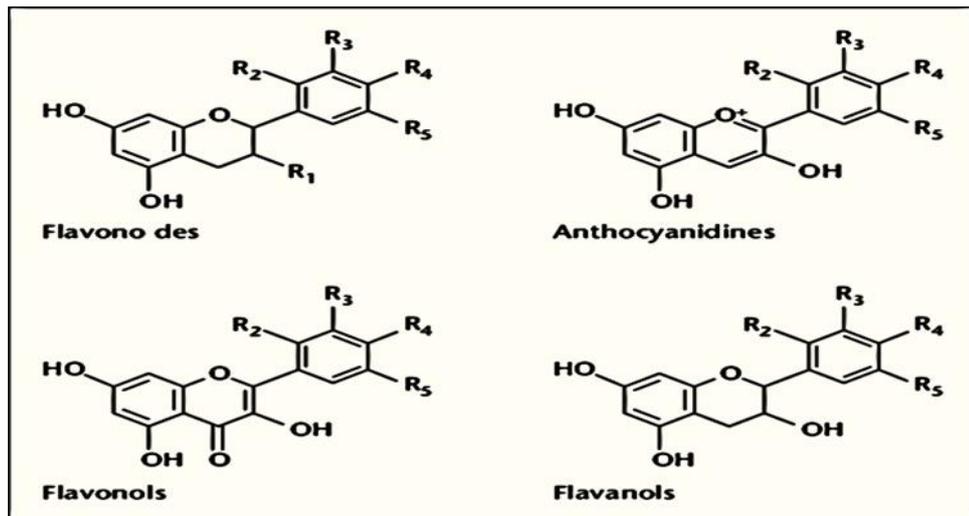
méthoxy dans les molécules. Certains acides et analogues phénoliques présentent également des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, antimutagènes et anti-inflammatoire(40).

### 3.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques végétaux, représentant plus de la moitié des huit mille composés phénoliques naturels. Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire, composés de quinze atomes de carbone, disposés en configuration C6-C3-C6. La structure consiste essentiellement en deux cycles aromatiques A et B, reliés par un pont à trois atomes de carbone, généralement sous la forme d'un cycle hétérocyclique, C. Les variations des schémas de substitution du cycle C donnent lieu aux principales classes de flavonoïdes, à savoir les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (ou catéchines), les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines, dont les flavones et les flavonols sont les plus répandus et les plus diversifiés sur le plan structure(41).



**Figure 7** : squelette de base des flavonoïdes.



**Figure 8 :** Structure chimique de quelques flavonoïdes.

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (42). Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé). Les flavonoïdes ont des activités biologiques importantes et plusieurs avantages médicaux sont attribués à la présence de ces composés dans les régimes alimentaires, notamment la prévention des dommages cellulaires oxydatifs (antioxydants et piègeurs de radicaux libres), les propriétés anti-inflammatoires, anticancérigènes, antimicrobiens et antivirales. Les flavonoïdes sont reconnus aussi pour leur effets neuroprotecteurs et cardioprotecteurs (43).

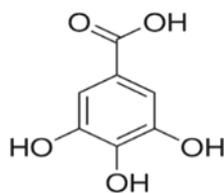
### 3.2.3 Les tannins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux, autrement dit, transformer une peau en cuir (44). La propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. Les tanins sont une classe très importante de polyphénols hydrosolubles de poids moléculaire intermédiaire à élevé (entre 500 et 3000 Da) présents dans plusieurs aliments végétaux (45). Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles avec les glucides et les protéines. Cette fonction des tanins végétaux est responsable de l'astringence des aliments riches en tannins, en raison de la précipitation des protéines salivaires (46). Sur le plan structural, on distingue les tanins

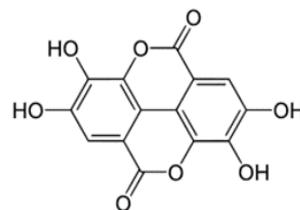
hydrolysables, esters d'acide phénolique, des tanins condensés plutôt des polymères de polyhydroxyflavan-3-ols.

Les tanins hydrolysables: sont des esters de glucides ou d'acide phénol, ou de dérivés d'acides phénols (20, 47). La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (47). L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins gallique, soit l'acide hexahydroxydiphénique dans le cas des tanins éllagique (48).

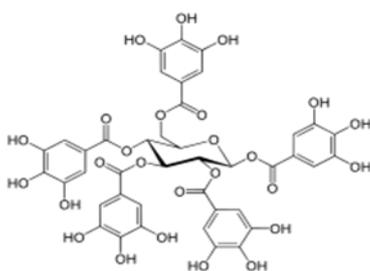
Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères de poids moléculaire élevé. Chimiquement sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols (l'unité de base) qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (12).



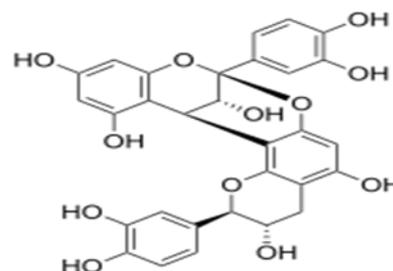
Acide gallique



Tanins éllagique



Tanin hydrolysable



tanin condensé

**Figure 9** : structure des différents tanins.

Récemment, un grand intérêt a été porté au rôle protecteur des tanins contre les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène produites à l'intérieur des cellules, qui provoquent des dégénérescences et des maladies telles que le cancer, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (49).

### 3.3 Les terpènes et les terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels lipophiles qui constituent la famille de produits naturels la plus vaste des métabolites secondaires avec différentes propriétés physiques et chimiques, de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique) (50). Leur formule brute est  $(C_5H_x)_n$  dont le  $x$  est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et  $n$  peut prendre des valeurs de (1-8) sauf dans les polyterpènes où il peut atteindre plus de 100 (caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule  $C_5H_8$ . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même par les animaux. La classification des terpénoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène, ce qui donne des : hémiterpènes ( $C_5$  : 1 unité), monoterpènes ( $C_{10}$  : 2 unités), sesquiterpènes ( $C_{15}$  : 3 unités), diterpènes ( $C_{20}$  : 4 unités), sesterpènes ( $C_{25}$  : 5 unités), triterpènes ( $C_{30}$  : 6 unités), tetraterpènes ( $C_{40}$  : 8 unités) et polyterpènes (41) (16, 29).

La famille des terpènes comprend des hormones (gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle), des stérols (ex. ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (ex. des hétérosides digitaliques), le latex, des résines et des cires de nombreuses plantes ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (51). En tant que classe la plus importante de produits naturels, avec environ 25 000 structures chimiques à ce jour, les terpénoïdes trouvent leur applications pratiques potentielles dans les industries de la parfumerie et des arômes, et dans les industries pharmaceutiques et chimiques en particulier (52).

Un large spectre de propriétés biologiques des terpénoïdes sont décrites, notamment des propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires (53).

### 3.4 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures. Ils constituent un groupe structurellement diversifié que l'on trouve dans plus de 20 % des espèces végétales. Ils peuvent avoir aussi des origines microbiennes ou animales. Ce sont des composés organiques naturels hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. Leurs noms se terminent toujours par «-ine». Ils présentent des réactions communes de précipitation par lesquelles ils sont détectés (capacité de se combiner avec des métaux) (54).

Les alcaloïdes constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures. Les études chimio-taxonomique ont montré que les alcaloïdes sont largement distribués dans les plantes supérieures appartenant aux Apocynacées, Papavéracées, Fabacées, Renonculacée, Rubiacées, Rutacées et Solanacées. Chez les plantes, les alcaloïdes peuvent être présents systématiquement dans la plante entière, ou ils peuvent être accumulés en grandes quantités dans des organes spécifiques comme les racines (aconit, belladone), l'écorce de la tige (quinquina, grenade) et les graines (55).

Les alcaloïdes peuvent être classés selon leur biogenèse et aussi selon leurs caractéristiques structurelles et biologiques. Les alcaloïdes qui sont dérivés d'acides aminés et qui contiennent un hétérocycle azoté sont dits alcaloïdes vrais. Les alcaloïdes qui sont dérivés d'acides aminés, mais dont l'azote ne fait pas partie d'un hétérocycle sont dits proto-alcaloïdes. Les alcaloïdes qui ne sont pas dérivés d'acides aminés sont dits pseudo-alcaloïdes (54). Les alcaloïdes sont connus dans la médecine traditionnelle et moderne pour avoir plusieurs activités pharmacologiques. Les propriétés médicinales et pharmacologiques des alcaloïdes comprennent des propriétés analgésiques (la codéine), des stimulants du système nerveux central ( la brucine), des dépresseurs du système nerveux central (la morphine), des antihypertenseurs (l'éphédrine), des anticholinergiques ( l'atropine), des antiémétiques (la scopolamine), des ocytociques et des vasoconstricteurs (l'ergométrine), des antitumoraux (la vinblastine et la vincristine) et antipaludique (la quinine) (56, 57).

### 3.5 Les huiles essentielles

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations et ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la

composition des parfums et dans les préparations culinaires. Au cours des deux derniers siècles, l'utilisation d'huiles essentielles en médecine progresse et depuis, l'aromathérapie en tant que médecine naturelle complémentaire, n'a cessé de gagner du terrain face au produit chimique et devient actuellement une pratique secondaire. Le terme huile essentielle (HE) dérive de 'quinta essentia' est un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes, signifiant la fragrance et la quintessence de la plante (58).

Les norme française **AFNOR** NF T75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (59).

Ces composés appelés aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal, 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15% (60).

Les HE sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». Leur densité est en grande majorité inférieure à celle de l'eau. Pour autant quelques HE font exception cette règle. C'est le cas du sassafras, du girofle et de la cannelle (43).

Elles sont huileuses, mais non grasses et s'évaporent facilement. Chaque HE est unique et se caractérise par une odeur, une couleur, une viscosité et des propriétés spécifiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (44).

Elles sont solubles dans l'alcool et dans tout type de corps gras (liposolubles). Les HE sont entraînaibles à la vapeur d'eau, mais très peu solubles dans l'eau. Pour autant une fraction des composants des HE se solubilisent dans l'eau ce qui permet d'obtenir « les eaux florales » ou « eaux distillées végétales » (42).

Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les labiateae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les asteraceae

(camomille, absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les lauraceae (cannelle, laurier)(61).

### 3.5.1 Composition chimiques des huiles essentielles

Sur le plan chimique, les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. En effet, le nombre de composés isolés est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir (62). Elles sont constituées principalement des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes, (myrcène,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène) (63). Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs que nous pouvons regrouper en deux catégories.

Les facteurs de l'environnement comme les variations de températures, l'humidité, le régime des vents, la durée totale d'insolation ont un impact direct sur la composition des HE. En outre le mode de récolte (sauvage ou cultivé, manuelle ou mécanisée) et la nature de culture jouent un rôle important dans l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HE obtenue (64).

Le procédé d'extraction et l'origine géographique influent aussi la composition des huiles essentielles ainsi une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes (65).

Des facteurs intrinsèques liés à l'espèce, au stade de développement botanique, à l'organe producteur, au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ont aussi un impact direct sur la composition des HE(49).

### 3.5.2 Activités biologiques des huiles essentielles

La tendance récente à utiliser des composés naturels dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaire notamment pour la conservation des aliments a suscité un intérêt croissant pour l'utilisation et l'exploitation des HE.

Les huiles essentielles et leurs composants possèdent diverses activités biologiques et effets thérapeutiques, telles qu'analgésique (menthe poivrée, citronnelle, girofle, romarin) ; antibiotique (arbre à thé, lavande) ; antifongique (arbre à thé, citronnelle) ; anti-inflammatoire (achillée, camomille allemande, lavande, clou de girofle) ; antiseptique (arbre à thé, lavande) ; antispasmodique (marjolaine, romarin, menthe poivrée, bois de cèdre) ; antivirale (mélisse, arbre à thé, lavande, citron) ; diurétique (genévrier, pamplemousse, citron) expectorantes (eucalyptus, thym, fenouil, romarin, cyprès, bois de santal, bois de cèdre, pin, sauge sclarée) et des activités anticancéreuses (sauge). Elles possèdent également des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, insecticides et antioxydantes. Ces activités peuvent être dues au composé majoritaire ou à l'effet synergique de plusieurs composés (66).

Les huiles essentielles ont aussi des fonctions biologiques dans les plantes dont elles proviennent, telles que la protection contre les prédateurs tel que les insectes prédateurs et les pathogènes microbiens, ainsi que l'implication dans les mécanismes de défense contre le stress abiotique (67).

### 3.5.3 Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont devenues une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers telle que la parfumerie, la cosmétologie, les industries pharmaceutiques et agroalimentaires. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse et connaissance optimale de la composition chimique des huiles essentielles demeure une étape importante qui puis est malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, reste une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (68, 69)

L'étude de la composition chimique d'une HE est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) : cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention ( $I_r$ ), puis à les analyser par le couplage « en ligne d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). L'identification est ensuite faite par comparaison des indices de rétention  $I_r$  et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des

constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques des spectres. Cette étape est généralement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles (70).

Lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-1H) et du carbone-13 (RMN-13C), SM, IRTF, etc... (71).

#### **4 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires**

Au cours de la dernière décennie, environ 70 % des médicaments nouvellement approuvés pour le cancer et les maladies infectieuses provenaient de sources naturelles. Les substances naturelles sont donc devenues un facteur crucial dans le développement de nouveaux médicaments (72). En ce sens, le domaine de l'extraction de composés bioactifs et leur identification représente une énorme richesse d'opportunités pour les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Avant l'isolement, la purification et l'identification des métabolites secondaires, il est important de choisir une technique d'extraction optimale afin de déceler les propriétés médicinales des plantes et mieux préserver l'ensemble des molécules actives. Le procédé d'extraction représente l'étape la plus importante dans l'analyse des composés bioactifs à partir de matrices naturelles (22). L'extraction appelée parfois " techniques de préparation d'échantillons " est une opération qui consiste à séparer certains composés bioactifs d'un organisme végétal à partir de diverses parties de la plante (les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits) et d'éliminer les matières indésirables par traitement avec un solvant sélectif (73).

En raison de la complexité diversifiée des matrices végétales et des diverses propriétés physicochimiques, l'extraction de composés bioactifs de sources naturelles

pourrait être une tâche difficile. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction des métabolites secondaire : les propriétés de du matériel végétale (nature du matériel végétal, son origine, le degré de traitement, la teneur en humidité, la taille des particules), le solvant (nature du solvant, sa concentration et sa polarité), la température, la pression et le temps d'extraction. Il est certain que le choix de la méthode d'extraction joue un rôle déterminant. Des techniques classiques ou conventionnelles et des techniques nouvelles ou innovantes sont notamment utilisées pour extraire les composés bioactifs des sources naturelles (71).

#### 4.1 Techniques d'extraction conventionnelles :

Les composés bioactifs des matières végétales peuvent être extraits par diverses techniques d'extraction classiques. La plupart de ces techniques sont basées sur le pouvoir d'extraction des différents solvants utilisés et sur l'application de la chaleur et/ou d'agitation. Les techniques classiques existantes sont : l'extraction par solvant, l'extraction au Soxhlet et hydrodistillation (71).

##### 4.1.1 L'extraction par solvant :

L'extraction par solvant peut être une extraction solide liquide (ESL) ou une extraction liquide-liquide (LLE). Les procédés d'extraction solide liquide comme la macération reposent sur la migration de particules solides dans le liquide par diffusion et par transfert de matière après le traitement avec le solvant liquide. Le rendement d'extraction est fonction des conditions du procédé et dépend de la température, du rapport solide/liquide (S/L), de la nature du solvant, de la taille des particules et de la concentration du composé bioactif que l'on souhaite extraire (74) . La nature chimique du solvant d'extraction est d'une importance primordiale pour favoriser la solubilité du composé actif et améliorer la sélectivité de l'extraction. La connaissance de ces propriétés chimiques, qui sont à la base des interactions développées entre le solvant et les substances actives, guide le choix d'un solvant adéquat. Les Solvants utilisés pour l'extraction des biomolécules des plantes sont choisis en fonction de la polarité du soluté d'intérêt [122]. La polarité, du moins polaire au plus polaire, de quelques solvants couramment utilisés est la suivante : Hexane < Chloroforme < Ethylacétate < Acétone < Méthanol < Éthanol < Eau (75). Le méthanol acidifié et l'éthanol sont les plus utilisés mais en raison de la toxicité du méthanol, on évite de l'utiliser dans l'industrie alimentaire et l'éthanol est donc plus recommandé (76).

#### 4.1.2 L'extraction liquide/liquide (LLE)

L'extraction liquide/liquide (ou LLE) est l'une des techniques de séparation d'échantillons les plus anciennes. Elle repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles. Cette technique permet, par un procédé physique, de purifier ou d'extraire des classes de composés (ou solutés) de la matrice (ou éluant) dans lequel ils sont solubilisés. Le solvant d'extraction ne doit pas être miscible avec l'éluant tout en solubilisant le maximum de solutés. Après chaque extraction on obtient deux phases distinctes : La première phase appelée extrait contient le solvant extractif enrichi de soluté actif et la seconde phase appelée raffiné contient le solvant initial appauvri en matière active (77).

#### 4.1.3 L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une technique largement utilisée pour l'extraction du composé aromatique volatil dont les constituants chimiques sont thermorésistants à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. L'avantage de cette technique réside en la diminution de la température de distillation. Les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition (75).

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau distillée placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (78) .

#### 4.1.4 L'extraction au Soxhlet

L'extraction par Soxhlet a été développée pour la première fois en 1879 par Franz Ritter Von Soxhlet afin d'extraire les lipides des matériaux végétaux. Cette méthode d'extraction a été employée pendant longtemps et considérée comme la technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. Elle offre une extraction continue des espèces chimiques contenues dans une matrice solide. En général, une petite quantité d'échantillon sec est placé dans une cartouche poreuse

à l'intérieur d'un siphon qui surmonte un ballon. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent sur la cartouche faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Ce cycle est répété jusqu'à l'épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt (79).

L'extraction a Soxhlet présente certains inconvénients qui peuvent être énumérés comme suit : Le temps d'extraction est long, Une grande quantité de solvant est nécessaire, Il est impossible d'accélérer le processus par agitation, La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation / concentration, La possibilité de dégradation thermique des composés cible ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long (74).

## 4.2 Techniques d'extraction nouvelles

Pour surmonter les limitations des méthodes d'extraction conventionnelles des techniques d'extraction nouvelles et prometteuses sont introduites. Certaines de ces techniques sont considérées comme des « techniques vertes » car elles sont plus respectueuses de l'environnement en raison d'une utilisation réduite de produits chimiques. Ces techniques sont également connues sous le nom de techniques d'extraction à froid, car la température pendant le processus d'extraction est relativement basse (80) . Les objectifs du développement de ces méthodes d'extraction sont de réduire de temps d'extraction, utiliser des solvants écoresponsables, réduire ou éliminer l'utilisation de solvants chimiques toxiques, tout en améliorant l'efficacité du processus et les rendements d'extraction ainsi que la qualité de l'extrait. Ces techniques non conventionnelles regroupent l'extraction par assistée par ultrasons, l'extraction assistée par enzyme, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par liquide sous pression (81) .

### 4.2.1 L'extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) consiste à une extraction solide-liquide dans un bain à ultrasons ou dans un récipient dans lequel une sonde à ultrasons est immergée. Les ondes utilisées pour l'UAE ont une fréquence qui varie de 20 KHz à 100 MHz (82) . Les ultrasons permettent de diminuer significativement le temps d'extraction en permettant une meilleure diffusion du solvant dans la matière végétale tout en augmentant le rendement par rapport aux méthodes conventionnelle (83). La réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles et la Possibilité

d'utilisation de n'importe quel solvant permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels (84).

#### 4.2.2 L'extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle méthode d'extraction implique l'utilisation des microondes dont la fréquence est comprise entre 300 MHz à 300 GHz (83).

Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau. En absorbant l'énergie des micro-ondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (85) . Cette méthode est considérée en tant qu'alternative à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites pour plusieurs raisons : La réduction du temps d'extraction, La réduction de la quantité de solvant utilisée, L'amélioration du rendement d'extraction (86).

#### 4.2.3 Extraction par fluide supercritique (EFS)

L'application du fluide supercritique à des fins d'extraction a commencé avec sa découverte par Hannay et Hogarth (1879). Dans l'état supercritique, les propriétés spécifiques du gaz et/ou du liquide disparaissent, ce qui signifie que le fluide supercritique ne peut pas être liquéfié en modifiant la température et la pression. Ces propriétés le permettent d'extraire des composés en peu de temps avec des rendements plus élevés (61) .

Le choix des fluides supercritiques est très important pour le développement de cette méthode. Le dioxyde de carbone supercritique est le plus communément utilisé en raison de son domaine de température et pression critiques (31°C - 304 K et 7.3 MPa), de ses propriétés inertes et ininflammable, de sa faible toxicité et réactivité, de sa haute pureté à faible coût et enfin des restrictions dans l'utilisation d'autres solvants organiques (87, 88).

#### 4.2.4 L'extraction par solvant accélérée (ESA)

L'extraction par solvant accélérée (ESA) est un processus d'extraction solide-liquide par solvant pressurisé qui est tout à fait semblable à l'EFS effectué à température élevée, habituellement entre 50 et 200°C et aux pressions entre 10 et 15 MPa. La température accélère la cinétique d'extraction et la pression élevée maintient le solvant à l'état liquide, réalisant ainsi une extraction efficace et rapide. Le solvant est toujours au-dessous de son état critique pendant l'ESA. En outre, la pression permet à la cellule d'extraction d'être remplie plus rapidement et aide à forcer le liquide dans la matrice solide. L'extraction par solvants accélérée est considérée comme une technique alternative et potentielle à l'EFS pour l'extraction des composés polaires. Comparée à l'extraction traditionnelle par Soxhlet, l'ESA implique une grande diminution de la quantité de solvant et du temps d'extraction (89).

#### 4.2.5 Extraction assistée par enzymes (EAE)

Extraction assistée par enzymes (EAE) est considérée comme une technologie d'extraction douce, efficace et respectueuse de l'environnement, ainsi qu'une alternative potentielle aux méthodes d'extraction conventionnelles, a été utilisée récemment pour l'extraction de divers types de composés dans l'industrie alimentaire. Certains composés phytochimiques des matrices végétales sont dispersés dans le cytoplasme cellulaire et d'autres sont retenus dans le réseau polysaccharide-lignine par une liaison hydrogène ou hydrophobe, qui ne sont pas accessibles avec un solvant dans un processus d'extraction de routine. Le prétraitement enzymatique a été considéré comme un moyen nouveau et efficace de libérer les composés liés et d'augmenter le rendement. L'ajout d'enzymes spécifiques comme la cellulase, l' $\alpha$ -amylase et la pectinase pendant l'extraction améliore la récupération en brisant la paroi cellulaire et en hydrolysant les polysaccharides structuraux et les corps lipidiques (81).

## Chapitre 2.

---

### Stress oxydant et antioxydants

---

#### *Sommaire*

---

<b>Introduction.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1 Stress oxydant .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2 Radicaux libres.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1 Les espèces réactives de l'oxygène(ERO) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 Les espèces réactives azotées (ERN).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 Activités biologiques des espèces réactives .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3 Rôle des radicaux libres chez l'homme .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4 Systèmes anti-oxydants .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Systèmes antioxydants enzymatiques .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques : .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.2.1 Propriétés antioxydantes des composés phénoliques (Ph)....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.2.2 Propriétés antioxydantes des huiles essentielles</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>5 Méthodes d'évaluation d'activité antioxydante</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Introduction

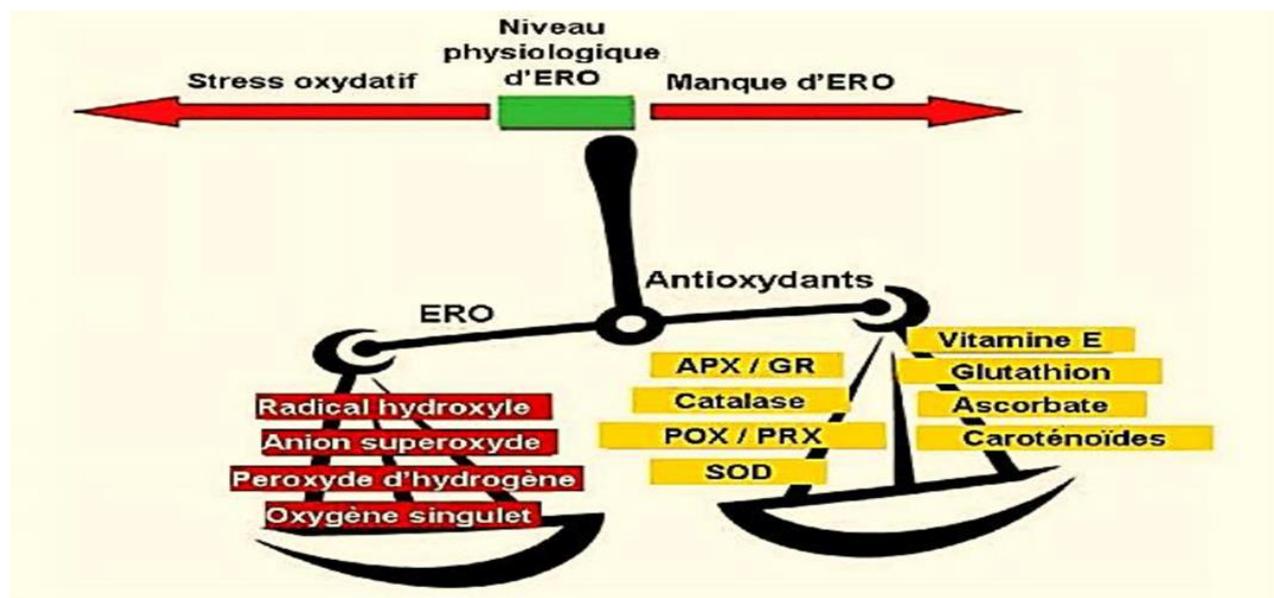
L'oxydation est essentielle au processus métabolique des organismes vivants qui produit l'énergie nécessaire aux processus biologiques et assure l'oxydation des composés endogènes et la détoxification des xénobiotiques. L'interaction de l'oxygène avec les systèmes biologiques est variée et étroitement contrôlée. Dans les formes de vie aérobies, la réduction de l'oxygène est d'un intérêt particulier. Cette réduction comprend la liaison de la plupart de l'oxygène à l'hydrogène pour donner de l'eau, un processus impliqué dans la phosphorylation oxydative. Cependant, une petite partie de l'oxygène (environ 1-3%) n'est que partiellement réduite au cours de cette réaction d'oxydoréduction. À la suite de cette réduction partielle, des intermédiaires chimiques réactifs connus sous le nom de radicaux libres sont produits (90).

Les cellules et les tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermie), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune qui a envahi le monde des sciences biologiques et médicales depuis quelques années ; appelée « stress oxydant » (91).

### 1 Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (90).

Cette perturbation peut avoir diverses origines, en temps normale la balance entre oxydants et antioxydants est équilibrée par des systèmes de défense extrêmement fins. En d'autres termes, "stress oxydant" ne signifie pas la présence mais l'excès de ces agents oxydants. Il apparaîtra, soit si la production d'espèces réactifs d'oxygènes (ERO) est trop importante pour être régulée, soit si le système antioxydant est défaillant (92).



**Figure 10 :** La balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants (49).

Le premier cas est observé par exemple au sein de cellules qui ont subi une irradiation ou une intoxication aux métaux lourds, et dans tous les processus inflammatoires. Les défaillances du système de régulation peuvent avoir une origine génétique (mauvais codage d'une enzyme antioxydante, par exemple), ou résulter d'une carence nutritionnelle en antioxydants comme les vitamines et les oligoéléments (93).

Les agents responsables du stress oxydant font partie de la famille des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (EROA). La catégorie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupe des radicaux libres (radical anion superoxyde  $O_2^\bullet$ , radical hydroxyle  $OH^\bullet$ ...) et des espèces oxygénées tel que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le dioxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxynitrite  $ONOOH$  et les oxydes d'azote  $NO^\bullet$ . Les ERO sont générés en permanence par l'organisme, en quantités limitées, soit en tant que coproduits de la respiration mitochondriale ("déchets"), soit pour remplir une fonction bien précise. Un exemple connu depuis assez longtemps est la fabrication massive de radicaux libres lors de la phagocytose (94). afin de détruire les tissus des bactéries nuisibles. Des ERO moins réactifs (superoxyde et monoxyde d'azote) servent de médiateurs régulant notamment la vasodilatation capillaire, et sont impliqués dans les communications inter et intracellulaires.

Citons enfin l'apoptose (mort programmée des cellules, tumorales en particulier), la fécondation de l'ovule, le fonctionnement de certains neurones... comme autant de processus naturels capitaux qui nécessitent la présence de radicaux libres (95).

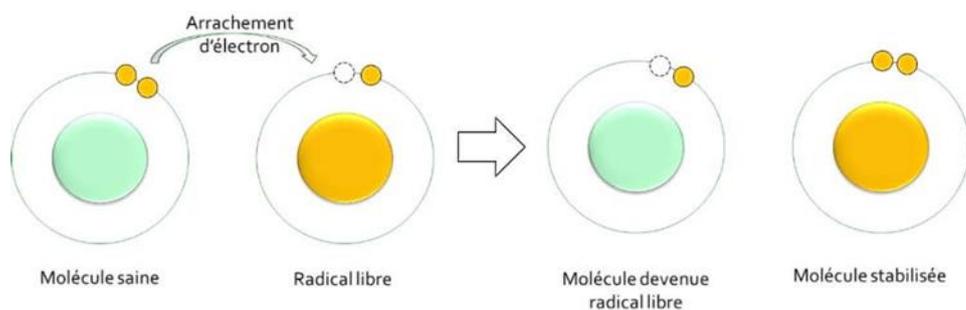
## 2 Radicaux libres

L'oxydation est un phénomène résultant de la perte d'un ou plusieurs électrons d'un élément dit réducteur alors qu'une réduction est une réaction au cours de laquelle un élément, oxydant, va gagner un ou plusieurs électrons. Une réaction d'oxydo-réduction (ou rédox) est donc une réaction qui consiste en un transfert d'électrons entre un oxydant d'un couple d'oxydo-réduction et un réducteur d'un autre couple (90).

En aérobie, l'oxygène est utilisé par les cellules afin de produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Lors de ce processus, différents sous-produits, connus sous l'appellation de radicaux libres, sont générés (96).

Un radical libre est une espèce chimique pro-oxydante qui possède un ou plusieurs électrons non appariés (s) célibataires sur sa couche périphérique sur un atome d'oxygène ou d'azote (Figure). Ce radical se retrouvant sous une forme instable va chercher à se stabiliser en captant un électron à partir d'une autre espèce chimique voisine telle qu'un lipide, une protéine ou un élément de l'ADN. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent (97).

Leur durée de vie est très courte variable selon les radicaux et les réactions induites se font généralement en chaînes. Ils sont généralement instables et très réactifs. Ils sont formés dans le corps humain soit comme un médiateur essentiel dans les processus vitaux, y compris la neurotransmission et les réactions inflammatoires, soit comme un coproduit(98).



**Figure 11** : Mécanisme à l'origine du stress oxydant (97)

Les radicaux libres sont généralement présents dans l'organisme à dose raisonnable régulée par le maintien de l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination (96). Lorsque l'organisme fonctionne correctement, la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Cependant, l'altération de l'homéostasie rédox par une production excessive de radicaux libres ou par une diminution des capacités antioxydantes peut entraîner un déséquilibre aboutissant à un stress oxydant (ou oxydatif). Ils sont également générés sous l'effet d'oxydants environnementaux, tels que, le tabac, la pollution, le soleil, les rayons ultra-violet, les radiations ionisantes, un effort physique intense, le stress, une mauvaise alimentation, la consommation d'alcool, les fibres d'amiante, les pesticides, etc (97).

On distingue deux grandes catégories de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces réactives oxygénées (ERO) et les espèces réactives azotées (ERA) incluant des espèces radicalaires des espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent (99) .

### 2.1 Les espèces réactives de l'oxygène(ERO)

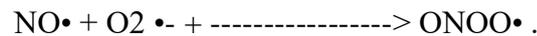
Les espèces réactives oxygénées ERO, classe spécifique de radicaux, incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl ( $\text{OH}\cdot$ ), le radical superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et sa forme protonée ( $\text{HO}_2\cdot$ ), le radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ) ainsi que les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) (100).

La production de radicaux libres peut être d'origine exogène et endogène issu du métabolisme. La production de radicaux libres endogènes résulte principalement de l'enzyme membranaire NAD(P)H oxydase (NOX) et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire. D'autres sources sont également connues pour intervenir dans la production de radicaux comme les cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles, la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde ou encore les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène (90).

## 2.2 Les espèces réactives azotées (ERN)

Tout comme pour les espèces réactives de l'oxygène, on distingue : les espèces radicalaires azotées dont le chef de file est le monoxyde d'azote (NO•) Apparu au cours de la dernière décennie est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les nitrique oxyde synthases (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Il est caractérisé par une réactivité limitée et une demi vie de quelques secondes (101).

Le monoxyde d'azote se combine aisément avec l'O<sub>2</sub> – pour former le peroxyde nitrite.



le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>)(2 •NO + O<sub>2</sub> → 2 NO<sub>2</sub>), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)(•NO + NO<sub>2</sub> → N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O → 2 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup>).

De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxyde nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (•NO + O<sub>2</sub><sup>•-</sup> → ONOO<sup>-</sup>), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (102).

## 2.3 Activités biologiques des espèces réactives

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (103).

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire,
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule, en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves: c'est le stress oxydatif (104).

### 3 Rôle des radicaux libres chez l'homme

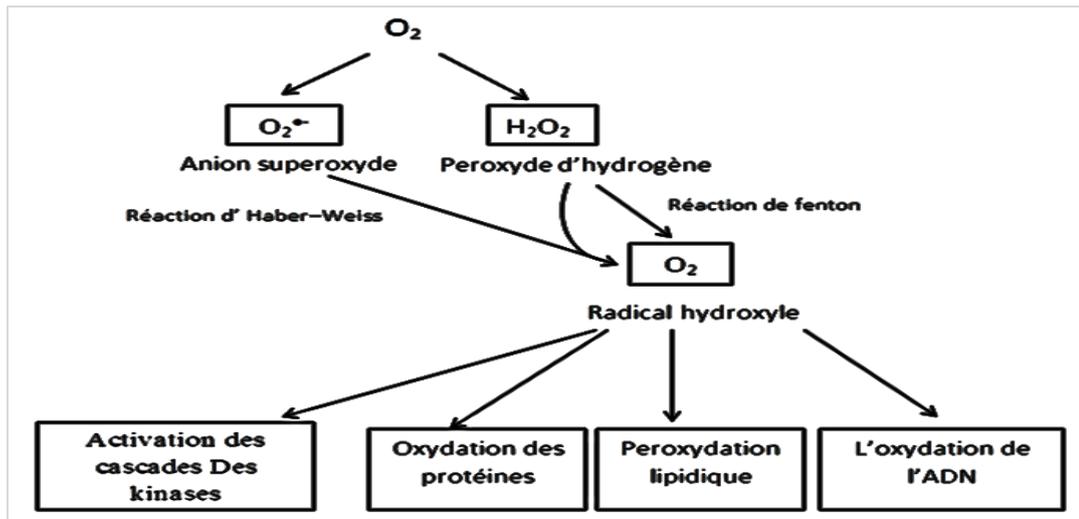
#### ➤ Rôle physiologique

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal intracellulaire (par modification de l'équilibre rédox intracellulaire et par modification oxydative des protéines). Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NAD(P)H oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines. Aussi, les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes (90).

#### ➤ Rôle pathologique

Les espèces activées de l'oxygène de par leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires. Les molécules biologiques : protéines, les lipides, glucides et l'ADN sont sujettes à l'attaque radicalaire, provoquant ainsi un Dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies (105).

Le principal mécanisme d'action des radicaux libres est la perturbation de l'équilibre des systèmes biologiques en endommageant leurs principales molécules constitutives, ce qui entraîne la mort cellulaire. Les radicaux libres produisent leur effet toxique en peroxydant les lipides de la membrane cellulaire, en provoquant une altération de l'intégrité structurale de la membrane ou des modifications du microenvironnement de la membrane. Ils entraînent la rupture des chaînes simples ou doubles de l'ADN nucléaire et mitochondrial et peuvent également provoquer des liaisons transversales entre les protéines de l'ADN, ce qui entraîne des lésions cellulaires et la transformation maligne des cellules (106) . De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). Ces réactions d'oxydation, conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (107).



**Figure 12** : Les molécules cibles de l'attaque radicalaire (107).

Par conséquent, il est souvent suggéré que les dommages induits par les espèces réactives jouent un rôle dans la pathophysiologie de diverses maladies, notamment l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (108). Néanmoins, Le seul facteur commun favorisant le stress oxydant est l'âge, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses antioxydantes et perturbe la respiration mitochondriale (109).

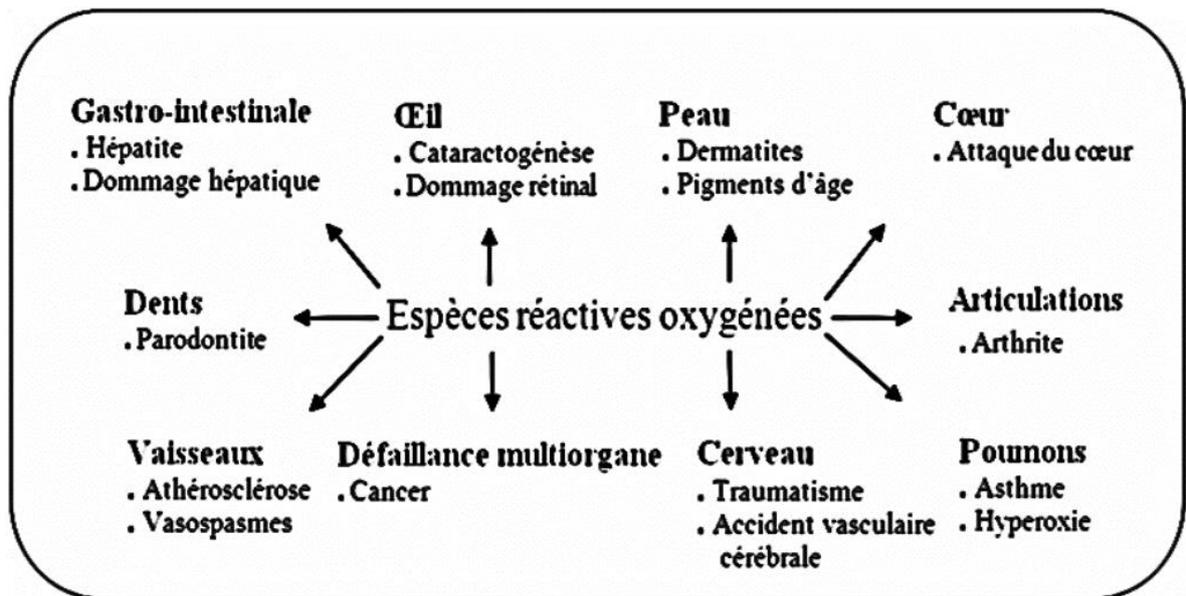
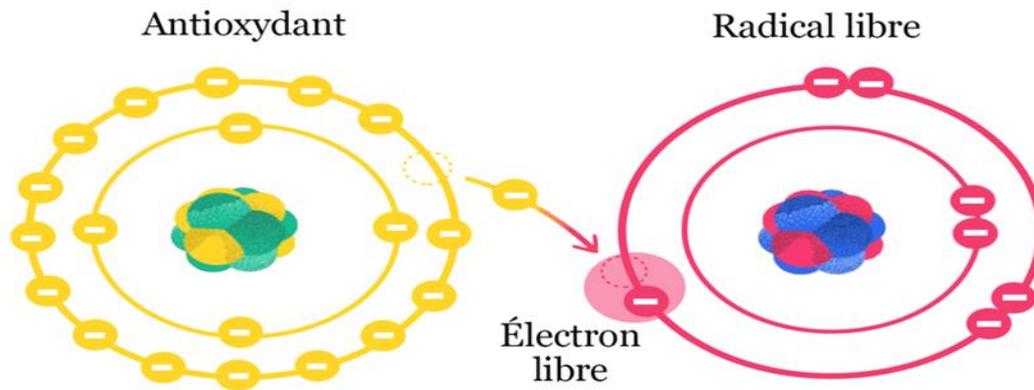


Figure 13 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (109).

#### 4 Systèmes anti-oxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré. De nombreuses stratégies de défense ont été développées par les cellules pour la dégradation des radicaux libres. Elles reposent sur l'action de composés appelés antioxydants (103), assurée par des systèmes de défense mis en place par l'organisme, qui s'adaptent au taux de radicaux présents (96). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les anti-oxydants se définissent par leur capacité, même à faible concentration, à retarder de façon significative, ou à empêcher l'oxydation d'un substrat oxydable (110).



**Figure 13** : neutralisation d'un radical libre par un antioxydant (103).

Selon (111) un antioxydant est défini comme toute substance chimique qui a la capacité de ralentir ou inhiber de manière significative l'oxydation un substrat oxydable (au niveau des macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques et les protéines) et le transformer en un composé plus stable ou d'éliminer les dommages oxydatifs à une molécule cible.

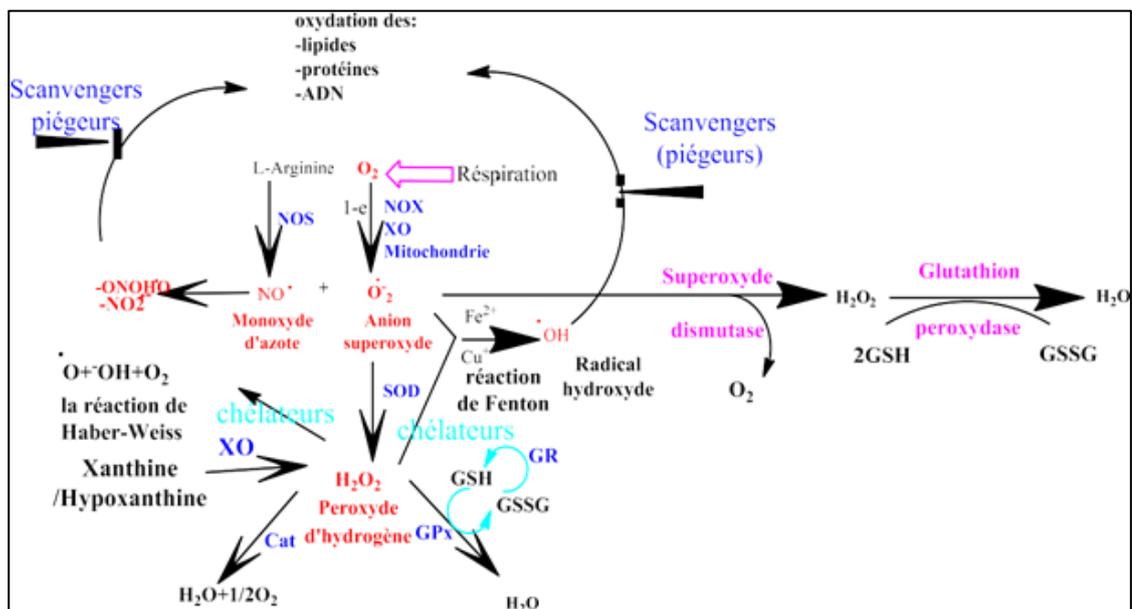
Un bon antioxydant doit avoir quelques critères (103):

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres
- Chélater des ions de métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer
- Avoir un effet positif sur l'expression génique
- Être rapidement absorbé
- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire

l'organisme adapte diverses stratégies antioxydants, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques endogènes et non enzymatiques chimique par des moyens diététiques ou pharmacologiques (112) .

#### 4.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO. Ils sont des enzymes dont les séquences sont très conservées au cours de l'évolution et qui agissent de manière coordonnée. Ils interviennent dans les différentes étapes de la réduction de l'oxygène pour l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente (113, 114). Les enzymes antioxydantes primaires, telles que la superoxydismutase (SOD), les catalases et la glutathion peroxydase (GPX), sont impliquées dans l'élimination directe des espèces réactives de l'oxygène, tandis que les enzymes antioxydantes secondaires, telles que la glutathion-S-transférase (GST), le glutathion-S-transférase (GST) et la glutathion-peroxydase (GPX), contribuent à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène en abaissant les taux de peroxyde ou en maintenant un approvisionnement régulier en intermédiaires métaboliques pour les enzymes antioxydantes primaires (115).



**Figure 14** : Schéma montrant l'action du système de défense des antioxydants endogènes lors de la production des E.R.O par des réactions enzymatiques. (NOS: oxyde nitrique synthase / NOX: NADPH oxydase / XO: xanthine oxydase / SOD: superoxyde dismutase / Cat: catalase / GPx: glutathion peroxydase \_GR: glutathion réductase) (116).

## 4.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants non enzymatiques agissent en piégeant directement les radicaux libres. Ils donnent un électron ou un proton à un radical, formant ainsi un produit relativement stable à partir du radical piégé. Ils peuvent être divisés en antioxydants endogènes et exogènes (103). Les principaux antioxydants non enzymatiques endogènes sont le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, les œstrogènes, la mélatonine et l'acide lipoïque. Les antioxydants non-enzymatiques exogènes ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation et peuvent être d'origine animale ou végétale. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons que les vitamines (A, E et C), les  $\beta$ -carotène, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, certains polyphénols (les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones), et certaines huiles essentielles. (117, 118). Ce type d'antioxydants constitue la seconde source de défense de l'organisme contre les radicaux libres et possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Ils peuvent pénétrer facilement au sein des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques en raison de leur petite taille (119).

### 4.2.1 Propriétés antioxydantes des composés phénoliques (Ph)

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans les plantes et ont une excellente capacité à capturer les radicaux libres. De nombreuses études antérieures ont montré qu'il existait une relation directe entre l'activité antioxydante et le taux total des polyphénols dans les plantes médicinales, les légumes et les fruits, et que les composés phénoliques avaient une contribution majeure à l'activité antioxydante obtenue (120).

Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule. Ils réduisent le risque de diverses maladies en raison de leur capacité à éliminer les radicaux libres en agissant comme des agents réducteurs, donateurs d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et chélateur des ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (103).

Les polyphénols sont capables d'inhiber l'activité de certaines enzymes, en formant des complexes avec les protéines grâce à leurs groupes fonctionnels. Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, Il a été démontré que

certaines flavonoïdes comme l'apigénine, la quercétine et la myricétine inhibent fortement la xanthine oxydase qui catalyse la réaction de transformation de l'hypoxanthine en acide urique (121). Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est aussi attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres (122).

Les flavonoïdes, réagissent selon le mécanisme impliquant le transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical stabilisé. Les tannins sont de très bons capteurs de radicaux libres. Ils agissent comme donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique(123).

Plusieurs études ont montré qu'il existe une relation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques. La relation structure-activité de certains composés phénoliques (par exemple, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins) a été étudiée. Il a été démontré que le piégeage des radicaux libres et l'activité antioxydante dépend principalement du nombre et de la position des groupes hydroxyle donneurs d'hydrogène sur le cycle aromatique des molécules phénoliques et augmente avec le degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyles (124).

#### 4.2.2 Propriétés antioxydantes des huiles essentielles

Depuis des millénaires, les plantes aromatiques et les huiles essentielles sont utilisées en aromathérapie. Elles renferment de nombreux bienfaits pour la santé, le bien-être et la beauté. Des recherches scientifiques récentes confirment les propriétés antiseptiques, antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles (123).

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles jouent un rôle crucial dans leurs activités biologiques, qui sont justifiées par l'implication du stress oxydatif dans différentes pathologies. Les huiles essentielles ont plusieurs modes d'action en tant qu'antioxydants naturels. Ils agissent à différents niveaux dans les réactions radicalaires par la prévention de l'initiation de la chaîne, la neutralisation de radicaux libres et peroxydes, comme agents réducteurs, la chélation des métaux, l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres et l'induction de la synthèse des enzymes antioxydants (125).

L'activité antioxydante des huiles essentielles dépend principalement de leur composition chimique, mais en raison de la grande variété des composés, cette activité biologique ne peut être attribuée à un seul mécanisme d'action. Cependant, les chercheurs dans ce domaine ont lié les effets antioxydants des huiles essentielles à leur principaux composés, comme l'eugénol dans le clou de girofle, le carvacrol dans l'origan, le m-thymol dans le thym et le  $\beta$ -citronellol ou le  $\beta$ -citronellal dans la citronnelle (126).

En outre, les différences dans l'activité antioxydante entre les différentes huiles essentielles sont principalement dues aux différences dans les types et les quantités des principaux composants antioxydants présents dans les huiles essentielles, la méthode d'extraction utilisée et la période de récolte de la plante qui détermine la concentration des principaux composants de l'huile (127).

## **5 Méthodes d'évaluation d'activité antioxydante**

Aujourd'hui, les études sur les antioxydants présents dans les plantes et les aliments sont devenues l'un des sujets de recherche les plus populaires dans le secteur de l'alimentation et de l'agriculture. Les différents antioxydants naturels ont des mécanismes d'action variés, en conséquence, de nombreux tests pour l'étude de l'activité antioxydante ont été développés et appliqués. Actuellement, plus de 35 types de tests antioxydants sont utilisés pour évaluer le potentiel antioxydant de divers extraits de plantes, d'huiles essentielles et de différents aliments. Ces tests antioxydants peuvent être classés en deux groupes : les tests *in vitro* et les tests *in vivo* (128, 129).

En général, les méthodes antioxydantes *in vitro* sont simples et relativement faciles à réaliser par rapport aux méthodes *in vivo*. Ces méthodes *in vitro* peuvent être classées en différents groupes en fonction de leur mode d'action, comme les méthodes basées sur le transfert d'électrons (SET), les méthodes basées sur le transfert d'atomes d'hydrogène (HAT), les méthodes mixtes (avec les deux mécanismes HAT et SET), les méthodes de chélation, les méthodes d'oxydation des lipides et diverses autres méthodes. Le tableau présente la classification des différents tests antioxydants *in vitro* en différents types selon le mécanisme d'action (130, 131).

**Tableau I :** Divers essais in vitro couramment employés pour évaluer l'activité antioxydante (131).

	<b>Mécanisme fondamental</b>	<b>Test antioxydant</b>
<b>1.</b>	Méthodes de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT)	<b>Test du paramètre antioxydant de piégeage des radicaux totaux (TRAP)</b>
		<b>Test de capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC)</b>
		<b>Test de blanchiment au bêta-carotène/crocine</b>
		<b>Test d'absorption inhibée de l'oxygène (IOU)</b>
		<b>Test d'inhibition de la peroxydation induite des lipoprotéines de basse densité</b>
<b>2.</b>	Méthodes de transfert d'électrons simples (SET)	<b>Test au N,N-Diméthyl-p-phénylènediamine (DMPD)</b>
		<b>Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)</b>
		<b>Test de la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC)</b>
		<b>Essai du pouvoir réducteur du ferricyanure de potassium (PFRAP)</b>
		<b>Dosage du contenu phénolique total par le test de Folin-Ciocalteu.</b>
		<b>Capacité antioxydante totale (TAC)/ dosage du</b>

		<b>phosphomolybdène</b>
<b>3.</b>	Méthodes mixtes (ont à la fois un mécanisme HAT et SET)	<b>Essai de piégeage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)</b>
		<b>Test de l'acide 2,20-azinobis-(3-éthyl-benzothiazoline)-6-sulfonique (ABTS)</b> <b>Capacité antioxydante équivalente au Trolox (TEAC)</b>
<b>4.</b>	Méthodes de chelation	<b>Test au tétraméthylmurexide (TMM)</b>
		<b>Test de chélation ferrozine/métal</b>
<b>5.</b>	Méthodes d'oxydation des lipides	<b>Test de l'acide thiobarbiturique (TBA)</b>
		<b>Test à l'anisidine</b>
		<b>Dosage de l'indice de peroxyde</b>
<b>6.</b>	Méthodes diverses	<b>Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>
		<b>Test de piégeage du radical peroxydinitrite (ONOO)</b>
		<b>Test de piégeage du monoxyde d'azote (NO)</b>
		<b>Test de piégeage du radical hydroxyle</b>

Actuellement, une dizaine de types de méthodes in vivo sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante : détermination de la capacité de réduction ferrique du plasma, estimation de la glutathion peroxydase (GSHPx), dosage de la glutathion réductase (GR), dosage de glutathion-S-transférase (GSt), dosage des lipoprotéines de basse densité (LDL), méthode de la catalase (CAT), méthode de la superoxyde dismutase (SOD), dosage de la peroxydation lipidique (LPO) et dosage de l'activité gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). Les méthodes in vivo sont généralement réalisées par l'administration d'échantillons

contenant des antioxydants naturels à des animaux de laboratoire tels que les rats et les lapins, à une dose définie et après un certain temps, les animaux sont généralement sacrifiés et les tissus, le sang et le sérum sanguin sont utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante selon le protocole de la méthode utilisée (129).

## Chapitre 3.

---

### Activité antifongique

---

#### *Sommaire*

---

<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
<b>1 Les candidoses .....</b>	<b>50</b>
<b>2 Candida albicans.....</b>	<b>50</b>
2.1 Caractère généraux.....	50
2.2 Distribution et habitats naturelle.....	52
2.3 Pathogénicité et facteurs de virulence.....	52
2.4 Facteurs favorisant les candidoses .....	53
2.5 Aspect clinique .....	53
2.6 Les infections superficielles .....	53
2.7 Les infections profondes .....	54
2.8 Les candidoses orales.....	55
<b>2.8.1 Types des candidoses orales.....</b>	<b>56</b>
<b>2.8.2 Diagnostic des candidoses orales .....</b>	<b>58</b>
2.9 Traitements des candidoses .....	59
<b>3 Traitements de candidoses orales .....</b>	<b>60</b>
3.1 Place des produits naturels dans le traitement des candidoses .....	61

## Introduction

Les infections fongiques sont un problème de santé mondial qui touche des millions de patients par an. Parmi ceux-ci, environ 1,5 million sont des infections fongiques disséminées ou invasives, nécessitant un traitement avancé et une hospitalisation. Malheureusement, ce nombre élevé d'infections est associé à des taux de mortalité élevés, certaines infections fongiques présentant des taux de mortalité proches de 90 à 95 %. Environ 90% de ces décès sont causés par des espèces appartenant aux genres de champignons *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Mucor* et *Rhizopus*. On estime que la candidose invasive a un taux de mortalité de 30-40%, la cryptococcose disséminée a un taux de mortalité de 20-30% et l'aspergillose invasive a un pourcentage comparable (132, 133).

Les maladies fongiques diffèrent de la plupart des maladies bactériennes en ce qu'elles ont tendance à être chroniques et à tuer l'hôte lentement. Les maladies fongiques sont également plus résistantes au traitement, de sorte que la plupart des mycoses invasives nécessitent des traitements qui durent des mois ou plus. Contrairement aux maladies bactériennes et virales, les infections fongiques humaines invasives sont rarement transmissibles (134).

En général, les infections fongiques invasives (IFI) sont des infections d'hôtes immunodéprimés. La définition standard de l'hôte immunodéprimé s'élargit à partir de l'ensemble traditionnel des patients atteints du SIDA, des patients atteints de cancer qui subissent une chimiothérapie immunosuppressive ou les patients transplantés dont le système immunitaire est inhibé pour éviter le rejet de l'organe (135). Les IFI peuvent également être observées pendant le traitement avec de nouveaux agents biologiquement actifs, tels que les inhibiteurs du TNF- $\alpha$ , utilisés pour traiter les maladies auto-immunes ou inflammatoires. Ces inhibiteurs atténuent l'inflammation et aident à traiter les symptômes de la maladie, mais ils peuvent également entraîner des infections opportunistes. En outre, les IFI sont également observées chez des patients apparemment en bonne santé immunocompétents, mais qui présentent des pathologies sous-jacentes asymptomatiques susceptibles d'altérer la fonction immunitaire et de prédisposer à des infections opportunistes (136).

## 1 Les candidoses

Les candidoses représentent les infections fongiques les plus fréquentes en pathologie humaine. Ces infections se diversifient selon leur localisation et l'organe atteint (137). Parmi les agents pathogènes fongiques les plus incriminés figurant les levures appartenant au genre *Candida* (138). ces levures dont la majorité des caractères sont retrouvés chez les Ascomycètes et la classification s'appuie sur des caractères phénotypiques : **Règne** : des champignons (*fungi*) **Phylum** : des Ascomycètes **Classe** : des Saccharomycètes **Ordre** : des saccharomycétales. Le genre *Candida* regroupe près de 150 espèces. Cependant, l'espèce *Candida albicans* (*C. albicans*) reste la plus fréquemment identifiée (139).

## 2 *Candida albicans*

### 2.1 Caractère généraux

*Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont Le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (140), se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (141), formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15  $\mu\text{m}$ , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (142).



**Figure 15 :** Aspect macroscopique des colonies de *Candida sp* (143).

Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés :

- la forme blastospore, avec parfois un bourgeon de formation.
- la forme pseudomycélium, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (144, 145).

- la forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (146). Sous certaines conditions environnementales extrêmes en terme de milieu et de température, *Candida albicans* peut aussi former des chlamydozoïdes par épaissement du thalle. Cette structure terminale ou latérale arrondie présente la forme de résistance de *Candida albicans* et participe à l'identification du champignon mais Elles est rarement mises en évidence *in vivo* (147).

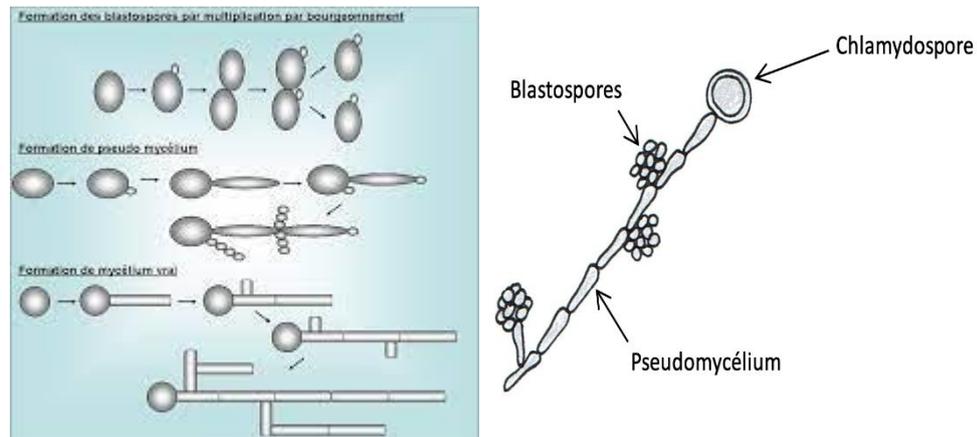


Figure 16 : les trois aspects morphologiques de *C. albicans* (143).

## 2.2 Distribution et habitats naturelle

*Candida albicans* est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne et qui se présente principalement dans : le tube digestif, la sphère oropharyngée et dans le tractus génito-urinaire chez 50 à 70 % des sujets sains. Elle est également un pathogène opportuniste, c'est-à-dire que l'équilibre dynamique entre l'organisme commensal et son hôte peut être rompu et permet la transition de commensalisme à l'état de pathogène et puis le basculement vers l'infection (148) .

Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvé simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses. La contamination est essentiellement inter humaine, soit par transmission fécale, soit par contact direct (salive, sécrétions, mains) (148).

## 2.3 Pathogénicité et facteurs de virulence

Afin de passer d'un comportement commensal à un comportement pathogène, *C. albicans* a l'inverse des pathogènes hyperspécialisés qui expriment un facteur majeur et unique de virulence, elle exprime de nombreux facteurs qui contribue à sa virulence, dont les principaux sont: l'adhérence aux surfaces inertes et aux surfaces biologiques de l'hôte grâce au adhésines de surface , le Dimorphisme , Variabilité phénotypique ou « switching »,

l'immunomodulation des défenses de l'hôte et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques : Protéases aspartiques (ou Saps), Phospholipase et lipase. Ces facteurs ne semblent pas pouvoir supplanter les défenses de l'hôte normal, mais permettent plutôt au champignon de coloniser les muqueuses. Par contre chez les patients immunosupprimés, l'équilibre dynamique entre les mécanismes de défense de l'hôte et le champignon tourne à la faveur de ce dernier, grâce à la présence de ces mêmes facteurs (149).

#### 2.4 Facteurs favorisant les candidoses

L'initiation et l'évolution de l'infection sont favorisés par de nombreux facteurs locaux et/ ou généraux altérant l'intégrité des barrières mécaniques (les muqueuses) ou immunologiques telles que L'humidité et la macération (ex: grands plis des obèses), les microtraumatismes, micro plaies et irritations locales (ex: appareils dentaires), l'hyperacidité (vaginale, buccale), les contacts répétés avec les sucres sont les principaux déséquilibres cutanés et muqueux qui facilitent la prolifération locale des *Candida*. Les cancers et les hémopathies, la maladie de Hodgkin, la tuberculose, les polytraumatismes, les endocrinopathies (en particulier le diabète). Aussi, l'administration d'antibiotiques à large spectre, l'intensification du traitement des patients cancéreux, l'absorption d'immunosuppresseurs et utilisés lors de chimiothérapies ou de transplantation d'organes, la nutrition parentérale totale, la chirurgie digestive, etc (150).

#### 2.5 Aspect clinique

Au niveau clinique, les candidoses peuvent être classées en deux groupes :

- les candidoses superficielles
- les candidoses profondes.

#### 2.6 Les infections superficielles

Les infections superficielles causées par *C. albicans* correspondent à des lésions limitées au niveau de la surface de la peau (comme les intertrigos), des ongles (onyxis) ou de la muqueuse buccale (muguet et langues noires) et vaginale. Ces infections s'accompagnent

de réactions inflammatoires locales et parfois d'ulcération. La morbidité associée aux candidoses superficielles est très faible mise à part chez les sidéens. Ces infections deviendront dans 20% des cas tenaces et récidivantes, particulièrement dans le cas de candidoses vaginales, qui touchent 70 % de la population féminine. De même les nouveau-nés sont fréquemment atteints de muguet suite à l'acquisition de *C. albicans* durant l'accouchement(151).



**Figure 17** : des exemples sur l'infection superficielle (intertrigo et onychis)(151).

## 2.7 Les infections profondes

Les infections disséminées ou profondes correspondent à l'infection d'un organe avec une invasion tissulaire extensive. On parle généralement de ce type de candidose lorsqu'il se produit un passage des *Candida* au travers de la barrière cutané-muqueuse. Ceci se traduit par une candidémie ou une septicémie qui conduit à la dissémination, par voie hématogène, des levures à travers l'organisme jusqu'à atteindre des organes nobles. La symptomatologie clinique n'est pas spécifique : une fièvre isolée, avec frissons prolongée malgré une antibiothérapie à large spectre (152).

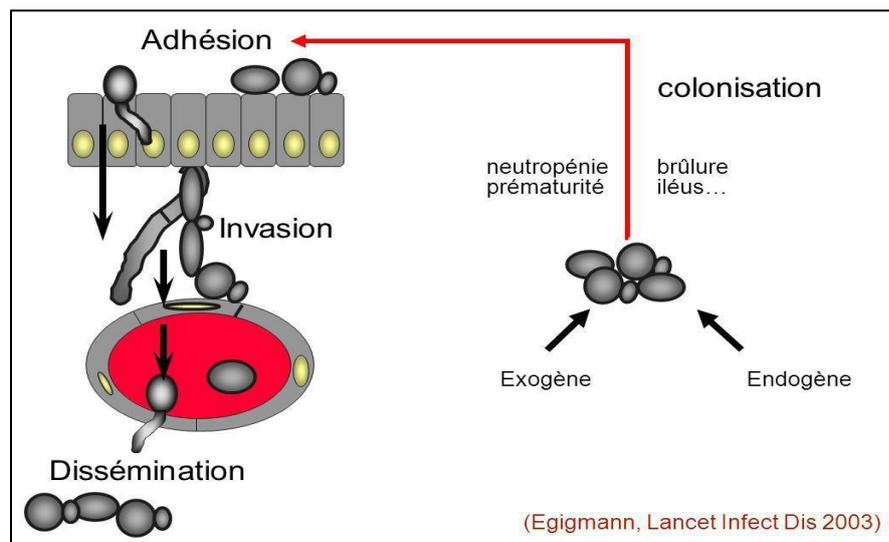
Ces infections sont plus rares que celle superficielles mais beaucoup plus graves,

provoquant la mort du patient dans 26 à 46 % des cas.

Ces infections se déclarent majoritairement en milieu hospitalier, chez des individus fragilisés atteints de lourdes pathologies (les cancéreux, les greffés et les patients en réanimation) et sont difficiles à diagnostiquer car les signes de dissémination ne surviennent habituellement que tardivement en cours d'évolution.

La colonisation par *C. albicans* peut s'établir sur tous les segments du tube digestif : cavité buccale, œsophage, estomac, intestin grêle, colon, anus.

Chez les sujets hospitalisés, la colonisation du pathogène est souvent une première étape vers l'infection. Elle est suivie de la pénétration des tissus par *C. albicans* ; une dissémination hématogène secondaire peut alors survenir à l'occasion d'une baisse, même transitoire, de l'immunité. Le pathogène envahit ensuite les organes dont les principaux viscères cibles sont les reins (pyélonéphrites), les yeux (chorio-rétinite) et le cœur (endocardite) (151).



**Figure 18** : les différentes étapes menant à l'infection par *Candida albicans* (151).

## 2.8 Les candidoses orales

La cavité buccale est un carrefour important d'échanges directs et d'interaction permanente avec de multiples éléments. Principalement, l'interaction de l'air, la nourriture et

les boissons avec la muqueuse buccale, la salive, les dents, les matériaux de restauration dentaire, font de la bouche un milieu favorable au développement des microorganismes.

La présence des microorganismes notamment les champignons dans la cavité buccale peut être bénéfiques, pour l'établissement et le maintien d'une écologie bucco-dentaire saine. Cependant, ces mêmes champignons peuvent causer des maladies lorsque des facteurs locaux ou systémiques prédisposent l'individu à une infection. L'un des champignons les plus étudiés et les plus communs dans la cavité buccale est *C. albicans* (153).

La candidose orale est une mycose de la muqueuse buccale due aux *Candida albicans*. Elle est très fréquente et apparaît notamment en cas de déficit du système immunitaire (154).

Lors de son enquête sur l'épidémiologie des candidoses buccales en 1988, Odds a constaté que leur incidence moyenne est de 42,9%. L'incidence de candidose buccale varie selon le type de population : 45% chez les nouveau nés, 45 à 65 % chez les enfants en bonne santé, 30 % à 40% chez les adultes en bonne santé, 50 à 65 % chez les porteurs de prothèses amovibles, 65 à 88% chez les résidents d'institutions de soins de courte ou de longue durée, 78% chez les personnes âgées hospitalisées, 90% chez les leucémique en cours de radiothérapie et jusqu'à 90% des personnes affectées par le VIH (155).

Les manifestations buccales de la candidose orale varient selon la sévérité, la localisation et le type d'infection (chronique ou aiguë). La présentation aiguë, plus diffuse, s'accompagne de symptômes de douleur de sensation de brûlure. L'infection chronique, habituellement moins symptomatique, peut être diffuse ou localisée.

### 2.8.1 Types des candidoses orales

Cliniquement, les candidoses orales peuvent être classées en candidoses blanches caractérisé par des lésions blanches ou en candidoses érythémateuses caractérisé par des lésions rouges qui incluent la candidose atrophique aiguë, la candidose atrophique chronique, la glossite rhomboïde médiane, la chéilite angulaire et l'érythème gingival linéaire.

D'autre part, il existe d'autres formes de candidoses buccales qui ne correspondent pas à ces catégories cliniques et qui sont moins fréquents ; nous trouvons les candidoses

mucocutanées chroniques (CMC), les chéilocandidoses et les candidoses multifocales chroniques (154).

Ces différentes présentations de candidoses orales pourraient refléter les différentes formes d'interaction entre la *C. albicans* et la surface épithéliale. Les quatre formes blanches primaires les plus distinctes sont représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau II** : les formes de *C. albicans* les plus distinctes (156).

<b>Type de candidose</b>	<b>Caractérisation et manifestation clinique</b>
<b>Pseudomembraneuse (muguet)</b>	Classiquement connue sous le nom de “muguet”, qui représente plus du tiers des cas de candidoses et qui est souvent rencontrée chez les enfants (151). Elle se manifeste typiquement sous forme de plaques blanches molles crémeuses ou de taches sur les tissus oraux. Lorsqu'elle est raclée ; s'enlèvent facilement pour faire apparaître une muqueuse enflammée et rouge mais non ulcérée (157).
<b>hyperplasique chronique</b>	Cette forme est rare, se présente sous forme maculaire ou sous forme de lésions en plaques blanchâtres bien attachées à la muqueuse buccale juste à l'intérieur de la commissure labiale (158). Elle peut aussi se présenter sur la langue, les joues, le palais et les lèvres. (159).
<b>érythémateuse aigue</b>	Dans la phase aiguë, les taches peuvent apparaître partout sur la muqueuse buccale et la partie dorsale de la langue, et peuvent provoquer une papille linguale. La cause principale est liée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre. (159).
<b>érythémateuse chronique (stomatite dentaire)</b>	Cette phase se manifeste par un érythème, surtout chez les porteurs de prothèses dentaires mal ajustées ou mal nettoyées. Les lésions sont érythémateuses et/ou oedémateuses. (158).



**Figure 19 :** Candidose pseudomembraneuse aiguë (153).

### 2.8.2 Diagnostic des candidoses orales

Le diagnostic des candidoses orales doit se faire avec un examen approfondi, basé sur l'observation des signes et des symptômes cliniques en tenant compte de l'historique médical du patient. Pour confirmer le diagnostic, il est recommandé de faire un (ou plusieurs) test de laboratoire à partir d'échantillonnage de la muqueuse buccale pour confirmer la présence de *Candida* et identifier le type de la levure en cause. Les échantillons peuvent être obtenus des sujets par un frottis, le rinçage oral concentré, collecte de la salive entière, une culture d'empreinte (utilisant de l'Agar de dextrose Sabouraud) ou une biopsie orale. Le choix entre ces techniques d'échantillonnage dépend principalement de la nature de la lésion à étudier. Le diagnostic peut être confirmé par une coloration de Gram (positive), au bleu de méthylène, 10% d'hydroxyde de potassium (KOH) (158).

Pour vérifier la présence d'une infection fongique, une culture sur un milieu spécifique est recommandée. Parmi les milieux de culture, nous trouvons le dextrose de Sabouraud, qui peut être combiné avec un second milieu différentiel comme l'Agar de Pagano-Levin ou l'Agar chromogène commerciale. Une culture dans le milieu dextrose de Sabouraud (incubée à 37°C pendant 24h ou 48h) peut montrer des colonies convexes et crémeuses caractéristiques de *Candida*, mais sans la précision de l'espèce. La différenciation spécifique nécessite des techniques immuno histochimiques. L'identification de la souche est surtout importante chez les personnes atteintes de déficit immunitaire ou dans le cas de souches résistantes pour déterminer un traitement efficace (160).

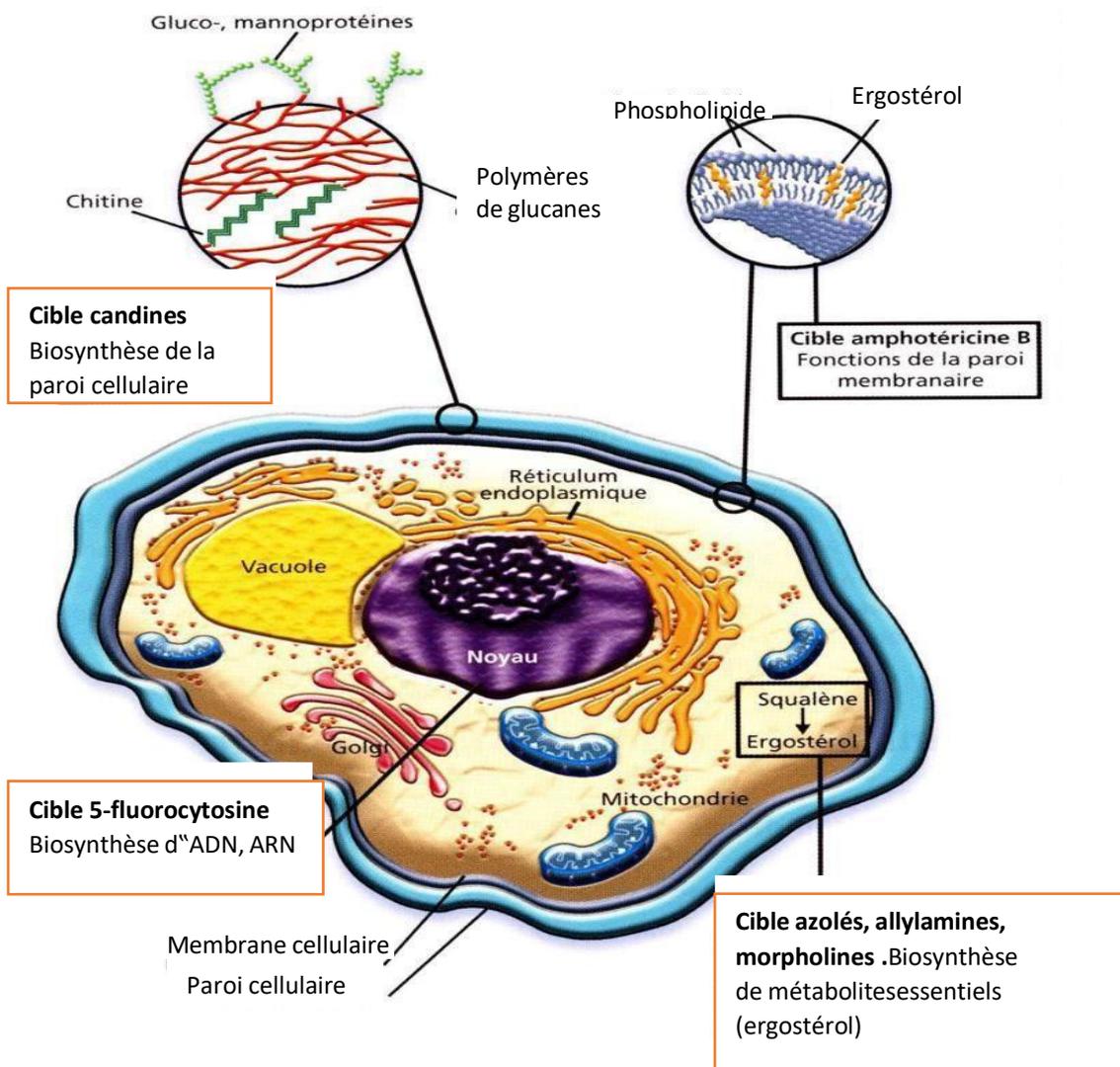
## 2.9 Traitements des candidoses

Les antifongiques (ATF) sont des substances chimiques produites par des micro-organismes (ATF naturels) ou par synthèse chimique de molécules dérivantes de composés naturels. Ces médicaments sont utilisés pour lutter contre les mycoses qui sont des infections microscopiques. En effet, leur mécanisme est basé sur la connaissance de la composition de la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des germes fongiques. Ces deux éléments cellulaires jouent un rôle important dans la perméabilité aux antifongiques. *Candida*, comme son hôte humain, est un organisme eucaryote, et de ce fait, le nombre de cibles thérapeutiques potentielles est limité. Une bonne molécule thérapeutique est caractérisée par un large spectre d'action dans le règne fongique, une action fongicide plutôt que fongistatique et peu ou pas d'effets sur les cellules de l'hôte (160).

la plupart des antifongiques actuels ont une action aux doses thérapeutiques usuelles et fongistatique; phénomène qui implique des traitements de longue durée (161). Malgré ces difficultés, il existe plusieurs classes d'antifongiques ; leurs mécanismes d'action sont variés et se résument comme suit :

- altération de la structure de la paroi fongique (Candines)
- troubles de la perméabilité membranaire (Amphotéricine B)
- inhibition des synthèses protéiques (Azolé)
- inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) (5-flouorocytosine) (162).

Ces mécanismes sont résumés à la figure 5 ci-dessous :



**Figure 20** : Mécanisme d'action des antifongiques (163).

### 3 Traitements de candidoses orales

- Le violet de gentiane

Le violet de gentiane est le plus ancien agent non absorbable. L'expérience clinique a démontré son efficacité modérée contre la candidose oropharyngée, mais ce produit peut provoquer une irritation et une ulcération en cas d'usage prolongé (164).

- La suspension de nystatine

La suspension de nystatine sert au traitement du muguet depuis les années 1950

La nystatine guérit 53 % des nouveau-nés d'une semaine et 80 % de ceux de deux semaines. La dose est très bien tolérée, et c'est pourquoi la suspension de nystatine constitue l'agent le plus prescrit pour traiter le muguet chez les nouveau-nés en santé (165)

➤ Le miconazole

Le miconazole est un imidazole de première génération plus actif *in vitro* que la nystatine. des essais contrôlés ont établi son efficacité supérieure à celle de la suspension de nystatine(166)

➤ Le clotrimazole

Le clotrimazole est un autre imidazole de première génération dont l'activité *in vitro* est semblable à celle du miconazole (165).

➤ Le fluconazole

Le fluconazole est un agent oral et absorbable. Bien que ce médicament soit hautement efficace dans le traitement de la candidose oropharyngée, il n'est pas recommandé de faire appel à un agent absorbable dont les effets secondaires risquent d'être néfastes pour traiter la candidose oropharyngée chez les nouveau-nés immunocompétents(167).

➤ La suspension d'amphotéricine B

La suspension d'amphotéricine B constitue le traitement standard de la candidose oropharyngée chez les nouveau-nés (167).

### 3.1 Place des produits naturels dans le traitement des candidoses

Les plantes médicinales constituent ainsi une source inépuisable de substances naturelles qui peuvent être utilisées dans la formulation de nouveaux agents antifongiques (168). Les plantes médicinales synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes de variabilité chimique exceptionnelle. Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antimicrobienne et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances (169)

De nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes : formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ; rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes) et inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides). Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des agents thérapeutiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes) (170).

---

## **2<sup>ème</sup> partie: Matériel et méthodes**

---

## Objectif

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturelle et de la recherche de nouvelles substances naturelles à activité antifongiques peuvent être utilisés comme principe actif dans des formulations pharmaceutiques contre les candidoses buccales. Le but est d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés des plantes étudiées, l'identification de leur principes actifs et la mise au point des méthodes de dosage et d'évaluation des activités biologiques.

Ce travail de recherche présenté dans ce mémoire a été réalisé au niveau :

- Laboratoire de substances naturelles et bioactives (LASNABIO) – Faculté des sciences de la nature et de la vie – Université de Tlemcen.
- Laboratoire de Microbiologie – Faculté de Médecine – Université de Tlemcen.
- Laboratoire de pharmacie galénique, Département de pharmacie- Faculté de médecine- Université de Tlemcen.
- Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques BOUSMAIL.

## 1 Matériel Végétal

La sélection du matériel végétal est la première étape dans une étude phytochimique. Du soin avec lequel elle sera réalisée dépend en grande partie le succès du travail entrepris par la suite. Les plantes sélectionnées pour cette étude ont été choisies suite à une enquête ethnobotanique préliminaire réalisée en collaboration avec des herboristes et de spécialistes en médecine traditionnelle. Les plantes ont été choisies en fonction de leurs utilisations par les populations locales de la wilaya de Tlemcen, Alger, Tipaza et Blida dans la prévention et les traitements des candidoses buccales.

Les zones d'enquête ont été choisies par rapport à une biodiversité très dense et une médecine traditionnelle très développée. Un autre critère de choix a été la facilité d'approche et d'échange avec les tradithérapeutes, les herboristes et les phytothérapeutes qui sont généralement de la même ethnie que l'enquêteur.

Les informations de terrain recueillis sont résumées dans le tableau. Un screening primaire de l'activité antifongique nous a permis de choisir deux plantes : la partie aérienne de la goyave (*Psidium guajava*) et les écorces de noyer (*Juglans regia*). Les monographies des plantes sélectionnées sont présentées dans l'annexe 1.

**Tableau III** : les espèces récoltées lors de screening primaire.

#	espèce	Appellation locale
1	<i>Psidium guajava</i>	Goyave
2	<i>Juglans regia</i>	swak
3	<i>Ajuga iva</i>	chandgoura
4	<i>Rubia tinctorium</i>	el foua
5	<i>Echinops spinosus</i>	tassakra

Le matériel végétal sélectionné a été récolté le mois de novembre 2021. Les lieux de récolte des deux plantes sont présentés dans le tableau et la Figure 9. L'identification botanique des espèces a été identifiée et confirmée par DOCTEUR METAI Mhamed au laboratoire d'Ecologie et de la biodiversité végétale à l'Université SAAD DAHLEB DE BLIDA.

**Tableau IV** : les données recueillis sur les espèces choisies.

#	espèce	Appellation locale	Famille	Lieu de Récolte	Altitude	Organes étudiés
1	<i>Psidium guajava</i>	Goyave وافةج	myrtacées	Commune de fouka tipaza	36°66'40674 N	Feuilles
2	<i>Jglance regia</i>	سواك	juglandacées	Nedroma tlemcen	35°04'35629 N	Ecorce



**Figure 21** : Situation géographique des stations de collecte

### 1.1 Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal n'est généralement pas utilisé immédiatement après la cueillette, il est nécessaire de connaître les meilleures méthodes pour en conserver ses principes actifs et par conséquent ses propriétés thérapeutiques. La conservation des plantes médicinales impose trois étapes : la dessiccation, le conditionnement et le stockage. Après chaque récolte, le matériel végétal est nettoyé (débarrassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'ombre, à l'abri de la poussière et dans des endroits bien aérés, à l'abri de l'humidité et à température ambiante. Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre. Le temps de séchage était d'une semaine jusqu'à dix jours.

Le matériel végétal utilisé dans les extractions par solvant a été broyée. Les poudres obtenues ont été tamisées et conservées à l'abri de la lumière dans un flacon en verre bien fermé dans un endroit sec, en vue de son utilisation ultérieure.

## 1.2 Préparation des extraits

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et parmi les étapes de ce chemin l'étape d'extraction qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale. Elle est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (171). Elle dépend de la méthode utilisée et du solvant approprié qui préservent les propriétés biologiques des métabolites secondaires isolés.

Dans ce travail nous avons utilisé deux méthodes d'extraction solide-liquide à savoir la macération et l'extraction par soxhlet. L'éthanol est utilisé comme solvant d'extraction. Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums solides : liquides, les plus souvent trouvés dans la littérature, sont généralement situés entre 1/10 et 1/50. On a choisi le ratio 1/15 (g/ml) dans la présente étude.

### 1.2.1 Extraction par macération

La macération est une méthode traditionnelle et couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Dans le présent travail, environ 10 g de matériel végétal séché est mise en contact avec 150ml d'éthanol et placés dans un agitateur mécanique (figure 23) à une température (37°C) à un taux d'agitation constant de 100 RPM pendant 72h. Après cela, l'extrait a été filtré à l'aide du papier filtre Whatman n° 1 et concentré sous vide sur un évaporateur rotatif à 40 °C. Les extraits bruts ont été pesés afin de calculer le rendement, puis stockés à 4 °C au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.



**Figure 22 :** Appareil d'extraction par macération



**Figure 23 :** Evaporateur rotatif

### **-Calcul du rendement**

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de l'extrait obtenu et la masse de la matière première végétale traitée. Ce rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = ([Me] / [Ms]) \times 100$$

Ms : masse de la matière végétale séchée en (g).

Me : masse de l'extrait obtenu après évaporation en (g).

### 1.2.2 Extraction par soxhlet

L'extracteur soxhlet est un appareil permettant d'effectuer une extraction solide-liquide. Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant, Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu' à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche(71).

10 g d'échantillon séché et finement broyé des deux plantes est placée dans une cartouche poreuse à l'intérieur du siphon, et cela, en présence de 150 mL de solvant (éthanol) pendant environ 4 heures .Le mélange est filtré et l'extrait obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif, pesé puis conservé dans des flacons stériles jusqu'à utilisation ultérieure. Le rendement de chaque extraction est calculé en utilisant la même formule précédente.

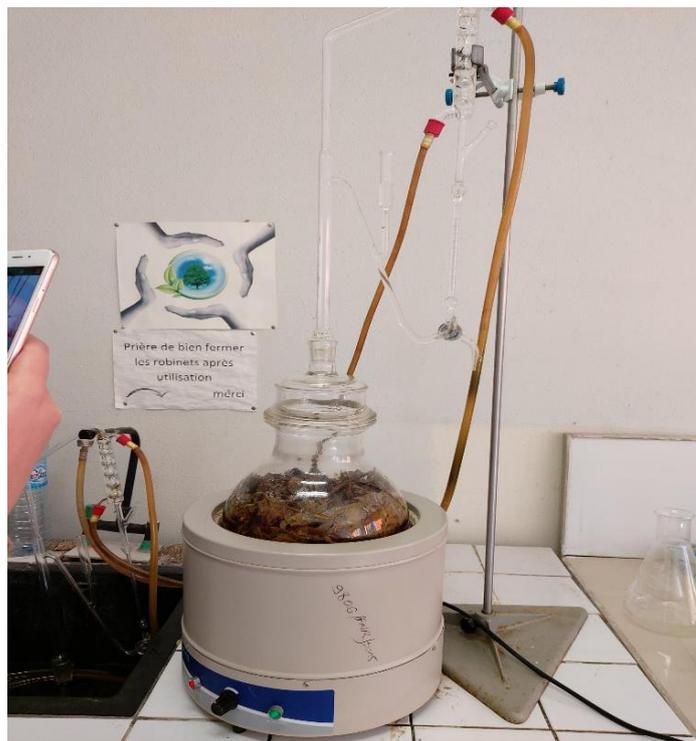


**Figure 24 :** Extraction par l'appareil soxhlet

### 1.2.3 L'hydrodistillation

C'est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. L'avantage de cette technique réside en la diminution de la température de distillation. Les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition.

Dans cette étude les hydrodistillations ont été assurées grâce à un appareil de type Clevenger, on introduit 500g de la matière végétale sèche (la partie aérienne des deux plantes) dans un ballon de 6L contenant 4L d'eau de robinet puis on chauffe l'ensemble pendant une durée de 4h. Ce ballon est relié à un réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite. L'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 4 h. Après condensation, l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat. La récupération de cette huile essentielle est effectuée du haut de l'essencier, à l'aide d'une pipette pasteur. Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'être retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre). L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des piluliers en verre ambré et conservée à une température de 4 °C. Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière végétale sèche. 5°C.



-1-



-2-

**Figure 25** : Appareil de hydro distillation

Le rendement en huile essentielle a été calculé en utilisant la relation suivante :

$$\text{RHE} = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

R HE: Rendement en huile essentielle (%)

M HE : Masse de l'huile essentielle extraite en (g)

M MV : Masse de matière végétale séchée en (g)

## 2 Analyse de la composition chimique d'huile essentielle par CPG et CPG/SM

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées dans le centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques : Bousmail à l'aide d'un chromatographe Hewlett Packard Agilent 6890 plus, équipé Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973, et d'une colonne capillaire Type : HP-5MS , Dimensions (30 m×0,25 mm×0,25 µm) avec une phase stationnaire :5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. Les conditions suivantes ont été appliquées :

- Température du four : 60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C., isotherme pendant 10 min.
- Durée d'analyse : 113 min
- Les échantillons ont été injectés en mode split (1:50) en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur pureté : N6.0 ; Débit GV : 0.5 ml/min

Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 230 °C par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

- Le volume injecté des échantillons est de 0,2 µL
- Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)
- Délai du solvant : 3.5min
- Température de l'interface :280 °c
- Type d'ionisation : Impact électronique



**Figure 26** : Chromatographe CPG/SM.

### 3 Dosage des polyphénols totaux

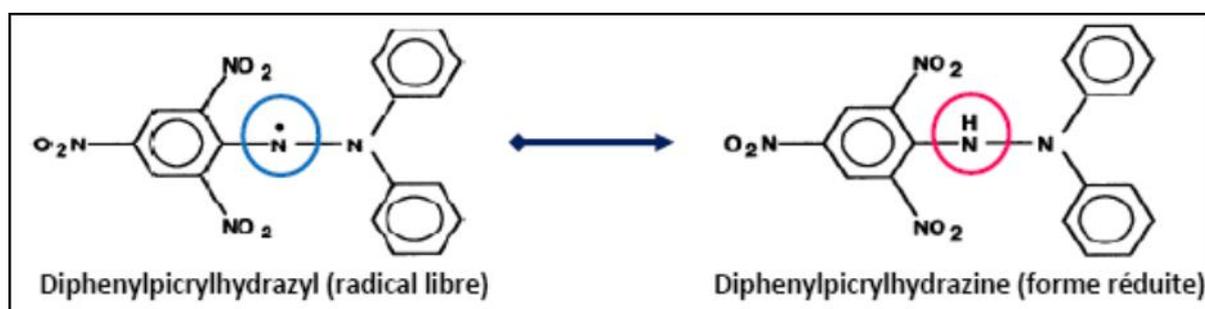
Le dosage des polyphénols totaux des différents extraits éthanoliques a été déterminée avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par (172). Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation en milieu alcalin des composés phénoliques par le réactif « Folin-Ciocalteu », qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu. L'intensité de la couleur bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 - 765 nm.

Le dosage consiste à mélanger un volume de 0.5 ml des solutions éthanolique des extraits avec 2.5ml du réactif de Folin- Ciocalteu dilué 10 fois par l'eau distillée et 2.5 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium ( $NaHCO_3$ ) à 7.5 % fraîchement préparée. Les tubes sont agités et incubés à 45°C pendant 45 min. L'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde  $\lambda = 765$  nm. Les concentrations des polyphénols des échantillons sont déterminées à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec un polyphénol témoin : l'acide gallique. La courbe d'étalonnage est effectuée à différentes concentrations et réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait).

## 4 Activité antioxydante

### 4.1 Piégeage du radical 2,2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH•)

Le DPPH est un radical stable à température ambiante et de couleur violet caractéristique. Il est un des premiers radicaux à avoir été utilisé pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical. Ceci s'observait par le changement de couleur allant du violet forme oxydée au jaune forme réduite. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. (173, 174)



**Figure 27** : Forme libre et réduite du DPPH (174).

Pour la mesure de cette activité nous avons utilisé la méthode décrite par Brand-Williams et al (175) 1 ml d'une solution de DPPH dans l'éthanol (0.006%) est mélangé avec un volume égal des solutions éthanolique des extraits et d'huile essentielle à différentes concentrations. Le mélange est incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotomètre, Optizen POP). Le contrôle négatif est composé d'1mL de la solution éthanolique du DPPH et d'1mL d'éthanol tandis que le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique et le BHT dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé. La diminution de l'absorbance de la solution DPPH• indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH•.

Après 30 minutes, les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 517 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) donné par la formule suivante :

$$PI\% = \frac{AC - AE}{AC} \times 100$$

Avec : PI% : pourcentage d'inhibition

AC : absorbance du contrôle négatif

AE : absorbance de l'échantillon testé

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI<sub>50</sub>) : La concentration inhibitrice de 50 appelée aussi EC<sub>50</sub> ou Efficient Concentration 50. Les CI<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations testées).

#### 4.2 Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électron, caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (176).

Cette méthode consiste à mélanger un millilitre extraits à différentes concentrations avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes puis 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (177).

## 5 Evaluation in vitro des activités Biologique

### 5.1 Activité antifongique :

Les souches utilisées sont 02levures de *Candida albicans* de référence : *Candida albicans* ATCC 10231 ; *Candida albicans* ATCC 26790.

L'activité antifongique des différents extraits et l'huile a été évaluée par deux méthodes :

- technique de diffusion sur gélose Sabouraud;
- technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

### 5.2 Technique de diffusion sur gélose

Dans cette méthode, le milieu de culture utilisée est la gélose Sabouraud à un pH de 7.2 à 7.4, ce qui permet de produire des zones d'inhibition visibles.

L'inoculum est préparé par suspension de 5 colonies distinctes d'une culture jeune de 24 h dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0.85%). L'inoculum est ajusté au standard 0.5 McFarland par un spectrophotomètre à 530 nm soit une densité optique de 0.12 à 0.15 pour avoir  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml. Après 15 minutes de la préparation de la suspension de levures, la surface de la gélose Sabouraud estensemencée par écouvillonnage 3 fois avec une rotation de la boîte de Pétri de  $60^\circ$  pour assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Des disques stériles en papier filtre (6 mm) sont imprégnés par les extraits ou l'huile à tester (10  $\mu$ l/ disques) et sont déposés sur la gélose.

L'antifongique de référence utilisé est l'amphotéricine B (0.2 mg/ disque). Après 15 min de l'application des disques, les boîtes sont incubées à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 20 à 24 h [NCCLS, 2004]. La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (mm).

### 5.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

C'est une méthode de microdilution sur milieu liquide utilisant des microplaques à fond rond (96 puits) pour déterminer les CMI des agents antifongiques.

100  $\mu$ l du bouillon Sabouraud est transféré dans chaque puits, ensuite 100  $\mu$ l de l'extrait est déposé dans le premier puits, après avoir bien mélangé le contenu du puits, 100

$\mu\text{l}$  est prélevé pour être ajouté au puits suivant et ainsi de suite jusqu'au 10<sup>ème</sup> puits. Enfin, 100  $\mu\text{l}$  de l'inoculum ( $1 \text{ à } 5 \times 10^4$  cellules/ml) est déposé dans chaque puits. Les deux derniers puits représentent des témoins négatifs : le puits n°11 contient le milieu de culture et l'inoculum et le puits n°12 contient uniquement le bouillon Sabouraud. Les microplaques sont ensuite, scellées et placées dans l'étuve à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24 h.

---

## **3ème partie : Résultats et discussion**

---

## Rendement et Caractéristiques organoleptiques des extraits

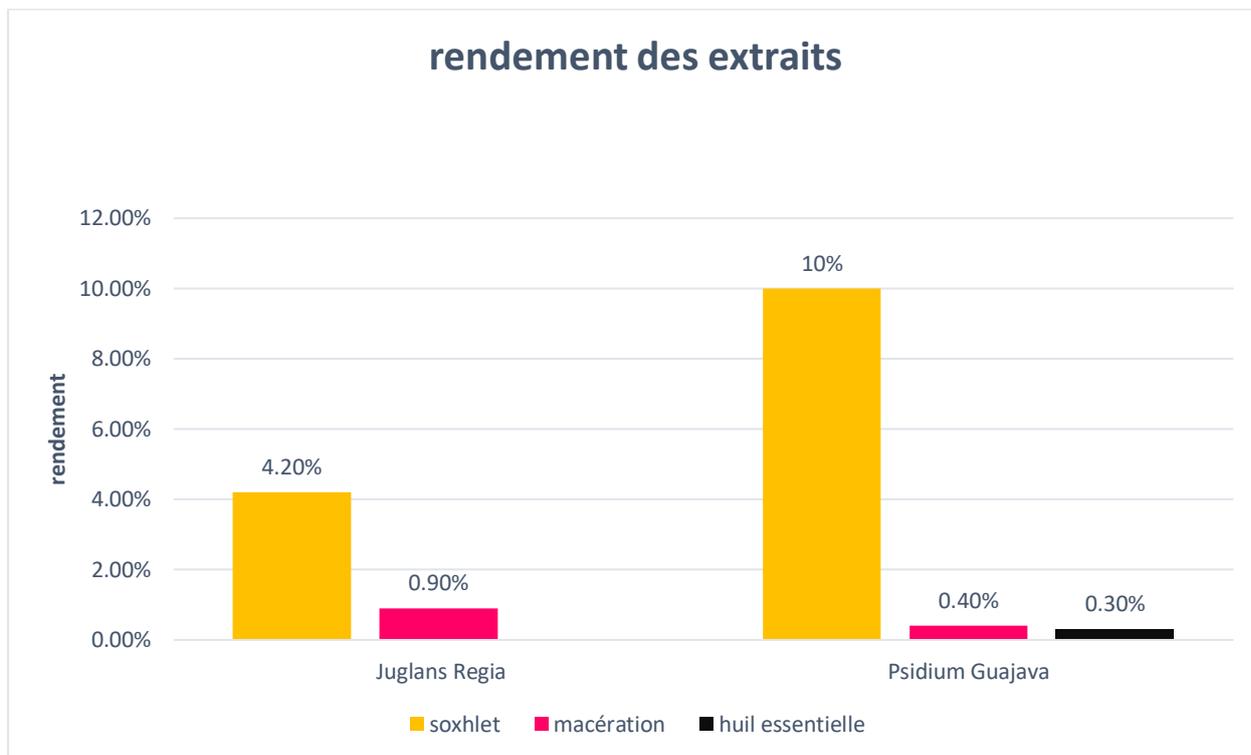
### 1 Extraits bruts

La macération et l'extraction par soxhlet de la partie aérienne de *Psidium guajava* et des écorce de tronc de *Jugulans regia* nous a permis d'obtenir quatre extraits éthanoliques caractérisés par deux couleurs (marron et vert) et deux aspects différents (poudre et pâteux) dont les caractéristiques organoleptiques et rendements sont mentionnées dans le tableau n° VI:

**Tableau V** : L'aspect, la couleur et le rendement des extraits éthanoliques des feuilles de *Psidium guajava* et des écorce de tronc de *Jugulans regia*

Extrait	Aspect	Couleur	Odeur
 <i>P. guajava</i> macéré	Poudre	Vert clair	Faible odeur
 <i>P. guajava</i> soxhlet	Pâteux	Vert noirâtre	Odeur moyenne
 <i>J. regia</i> macéré	Poudre	Marron noirâtre	Odeur moyenne
 <i>J. regia</i> soxhlet	Pâteux	Marron noirâtre	Forte odeur

La détermination de rendement de l'extrait après chaque extraction est une étape importante. Dans le présent travail les rendements d'extraction ont été calculés par rapport au poids du matériel végétal sec et les résultats ont été exprimés en pourcentage et représentés dans la figure n28



**Figure 28** : histogramme des Rendements des extraits bruts des échantillons *Juglans regia* et *Psidium guajava*.

D'après ces résultats, nous constatons que le rendement est variable et dépend considérablement de la méthode utilisée, en utilisant le même solvant organique. Pour l'extrait des écorces de « *Juglans regia* » on remarque que le rendement le plus élevé est celui obtenu par soxhlet (4.20%), alors que la macération donne un rendement moyen (0.9%). Pour l'extrait de la partie aérienne de « *Psidium guajava* », la méthode soxhlet offre un meilleur rendement (10%) contrairement à la macération qui donne un rendement faible (0.4%). Cette différence observée peut être due à plusieurs facteurs telle que la méthode utilisée, le choix des solvants, les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid), la méthode d'extraction (macération, extraction par soxhlet) et les propriétés chimiques des métabolites secondaire à extraire. L'extraction par Soxhlet donne

généralement des rendements élevés et ceci grâce aux cycles d'extraction répétés avec du solvant chauffé jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière végétale (Penchev, 2010) mais contrairement à la macération elle présente l'inconvénient de dégradation de certains composés chimiques thermolabiles.

En comparant ces résultats avec la littérature, nous avons constaté que nos rendements d'extraction étaient inférieurs. Ainsi selon **Ayaovi Bruno 2017** (178) la macération pendant 72h des feuilles de *Psidium guajava* avec l'éthanol a donné un rendement de 21,90 % et d'après Mouraa et all (2012) (179), l'extraction par soxhlet de la même plante par l'éthanol 5% pendant 3h a donné un rendement de 21% .En ce qui concerne écorces de *Juglans regia* la macération méthanolique des écorces provenant de la région du Cachemire (Inde) a donné un rendement maximale de 12.21% (180).

Cependant, il reste difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions environnementales, à la durée du stockage, à la période de la récolte. En outre selon les études antérieures dans ce domaine il a été constaté que le rendement d'extraction varie d'une famille botanique à une autre, entre les plantes de la même espèce, d'un stade de développement à un autre et d'une saison à une autre (**181, 182**). Aussi il est important de souligner que l'utilisation de différentes méthodes et des solvants de polarités variables dans les processus d'extraction du même matériel végétal réduisent les possibilités de comparaison entre les études réalisées sur les mêmes espèces (183).

## **2 Huile essentielle de *Psidium guajava***

Les critères d'appréciations d'une huile essentielle sont ses propriétés organoleptiques telles que le goût, la couleur, et l'odeur. Ces propriétés ne donnent qu'une information très limitée sur cette essence. La qualité d'une essence et sa valeur commerciale sont définies par des normes fixées. Ces normes ont été établies par plusieurs organisations connues à l'échelle mondiale en précisant les conditions opératoires des analyses. Les caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle distillée de la partie aérienne *Psidium guajava* sont mentionnées dans le tableau n° et comparées avec ceux de norme **A F N O R. (2000)**.

Le rendement en huiles essentielles extraites par hydrodistillation a été calculé à partir du poids d'huile essentielle par rapport à la masse du matériel végétal traité et le résultat est mentionné dans le tableau ci-dessous.

**Tableau VI** : Caractères organoleptiques de l'HE de *Psidium guajava*.

<b>Caractéristique</b>	<b>Normes (Afnor, 2000)</b>	<b>Résultats obtenus</b>
<b>Aspect</b>	Liquide mobile et limpide	Liquide
<b>Couleur</b>	Jaune pale	Jaune pale
<b>Odeur</b>	Epicé .Pénétrante	Faible odeur pénétrante particulière
<b>Rendement</b>	-	0.3%

L'huile essentielle (HE) extraite par la méthode d'hydrodistillation était un liquide de couleur jaune pâle avec une faible odeur particulière. Le rendement d'extraction était de 0.3%. La comparaison avec les rendements d'extraction de la partie aérienne de la même plante provenant de différente région du monde énoncés dans des travaux antérieurs montre les teneurs en huile essentielle étaient apparemment influencées par la localisation géographique. La plante collectée des différentes régions de la chine a donné des rendements de 0.18%, 0.61 et 0.75% (184) tandis que les feuilles cultivées à Taïwan présentaient des teneurs en huile plus faibles (0,18-0,22%, v/w) (185, 186). En Népal, Tunisie et en Nigeria l'extraction de la partie aérienne de *Psidium guajava* a donné des rendements de 0.5%, 0.66% et 0.75% respectivement (187, 188).

Des recherches antérieures ont révélé que les conditions environnementale des différentes régions géographiques telles que la température, les précipitations, la composition du sol et l'altitude peuvent influencer de manière significative le rendement en huile essentielle (189, 190).

Sangwan et al. (2001) ont rapporté que lorsque les plantes poussent dans des conditions favorables, elles n'ont pas besoin de développer des mécanismes d'adaptation à l'environnement, ce qui favorise la production de métabolites primaires. En revanche, un environnement stressant peut stimuler la régulation de la production de métabolites secondaires dont les huiles essentielle chez les plantes(191).Le rendement en huile essentielle

peut également être fortement affecté par le génotype, la période de récolte, le lieu ,la durée et la température de séchage (192).

### **3 Analyse de la composition chimique d'huile essentielle de *Psidium guajava* par CPG/SM**

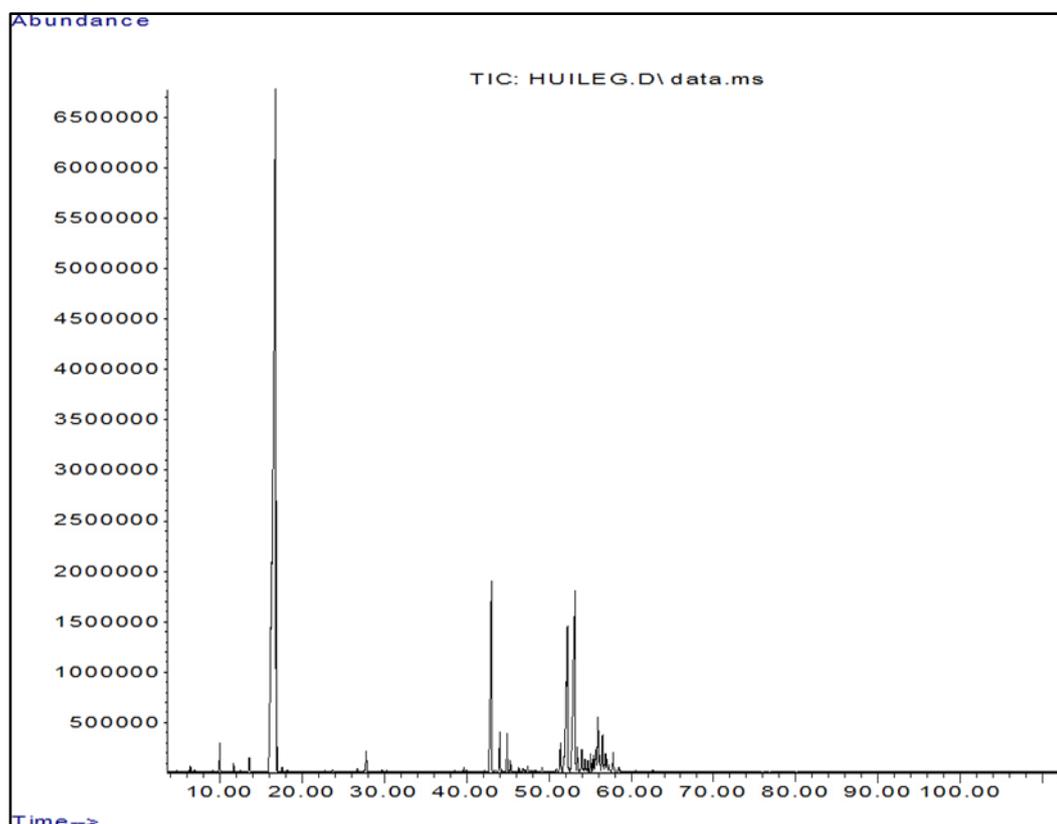
L'étude des huiles essentielles (HEs) est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables(193).

Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans le domaine de la chimie analytique, la caractérisation des huiles essentielles demeure un challenge. En effet, l'identification des constituants d'une huile essentielle est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement des techniques d'analyses ainsi, que la mise en oeuvre d'une méthodologie d'analyse rigoureuse(194).

L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate et la plus importante. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ses substances. Dans la présente étude l'huile essentielle de la partie aérienne de *Psidium gyava* est obtenue par l'hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. C'est la méthode la plus recommandée pour extraire les huiles essentielles des produits végétaux. Elle est très facile à mettre en oeuvre. L'extraction des huiles essentielle est toujours suivie d'une méthode d'analyse dont le but est la détermination de la composition chimique.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la méthode d'analyse utilisée pour la détermination de la composition chimique de notre huile essentielle. Ces deux méthodes sont devenues incontournable pour les laboratoires de recherche et contrôle qui étudient les huiles essentielles. Elles permettent d'associer la capacité séparative des méthodes chromatographiques pouvoir de caractérisation des méthodes spectroscopique et spectrométrique Ainsi, le couplage CPG/SM est devenu incontournable pour les laboratoires de recherche et contrôle qui étudient les huiles essentielles (195).

Dans le présent travail l'huile essentielle est analysée par CPG/SM. Le profil chromatographique est représenté sur la figure (30). L'analyse a permis d'identifier 78 composés représentant 94.2% de la composition totale d'huile essentielle.



**Figure 29** : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de *Psidium guajava*.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plus d'une centaine de composés et parmi ces nombreux composés, l'un domine généralement ; on l'appelle composé majoritaire. En général, une huile essentielle est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures (196).

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Psidium guajava* est un mélange complexe. De nombreux constituants sont présents en faible proportion. En outre, d'autres composés corréluent entre eux. Elle est principalement dominée par la classe des monoterpènes avec un pourcentage de 71.74% suivi des acides, des alcools et des sesquiterpènes. Les principaux composés volatils identifiés dans la classe des monoterpènes sont le Limonène avec un pourcentage de (50.65%). Le caryophyllène représente 0.74% des

sesquiterpènes. Il existe plusieurs rapports sur la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne *P. guajava* provenant de divers endroits dans le monde entier, et il existe une grande variation dans la concentration et pourcentage des différents constituants(187). Une variété de composés est identifiée dans l'huile essentielle (HE), notamment l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -caryophyllène, le limonène, le veridiflorol et le nerolidol. Notre huile essentielle est caractérisée par la prédominance de limonène avec un pourcentage de 50.65% ce qui proche des résultats trouvés au Nigeria par Ogunwande et al (186).

Par ailleurs, le caryophyllène a été identifié comme étant le composé majoritaire des huiles essentielles étudiées dans la plus part des travaux antérieurs. Les travaux de (Afaf Weli et al) à Oman ont montré une prédominance d'iso-caryophyllène (33.53%) suivi du veridiflorene (13.00%), farnesene (11.65%) et dl-limonene (9.84%). Selon Arian et al le  $\beta$ -caryophyllène était le composé majoritaire avec un pourcentage de 20.34%. Khadhri et al ont rapporté aussi de  $\beta$ -caryophyllène (27,7 %), suivie de l' $\alpha$ -pinène (14,7)(188).

Cependant autres travaux sur la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *P guajava* collectées au Brazil, ont montré que l'huile essentielle contient principalement du 1,8 cineole (42.68%) and  $\alpha$ -terpineol (38.68%) comme composé majoritaire. Selon l'étude de Silva et al, l' $\alpha$ -pinène (23,9%) et le 1,8-cinéole (21,4%) se sont révélés être les principaux composés de HE de la partie aérienne de cette plante(197).

Les variations quantitatives trouvées dans la composition chimique entre notre étude et les différents travaux antérieurs effectués sur cette plante peuvent être attribuées à la variabilité génétique et/ou à des conditions géographiques environnementales différentes. Les différentes procédures utilisées pour l'extraction des composants volatils et les différentes procédures analytiques peuvent aussi responsables de cette variation. Selon les instituts de recherches des produits naturels, la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. Nombreux travaux de recherche signalent l'impact des effets macroscopiques et microscopiques sur la composition chimique de l'huile essentielle. En effet, sa composition chimique peut varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres. Elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc.) et/ou technique (la nature de stockage, la procédure d'extraction de l'essence de la plante). Selon bruneton (198) . La qualité des essences obtenues dépend dans une large mesure de l'état de fraîcheur du végétal et du temps écoulé entre la récolte et la transformation industrielle. Un stockage de la plante pendant 24 heures suffit pour induire des changements

considérables dans la composition chimiques. Certains facteurs abiotiques peuvent aussi influencer la composition chimiques des huiles essentielles tels que le climat des régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol.

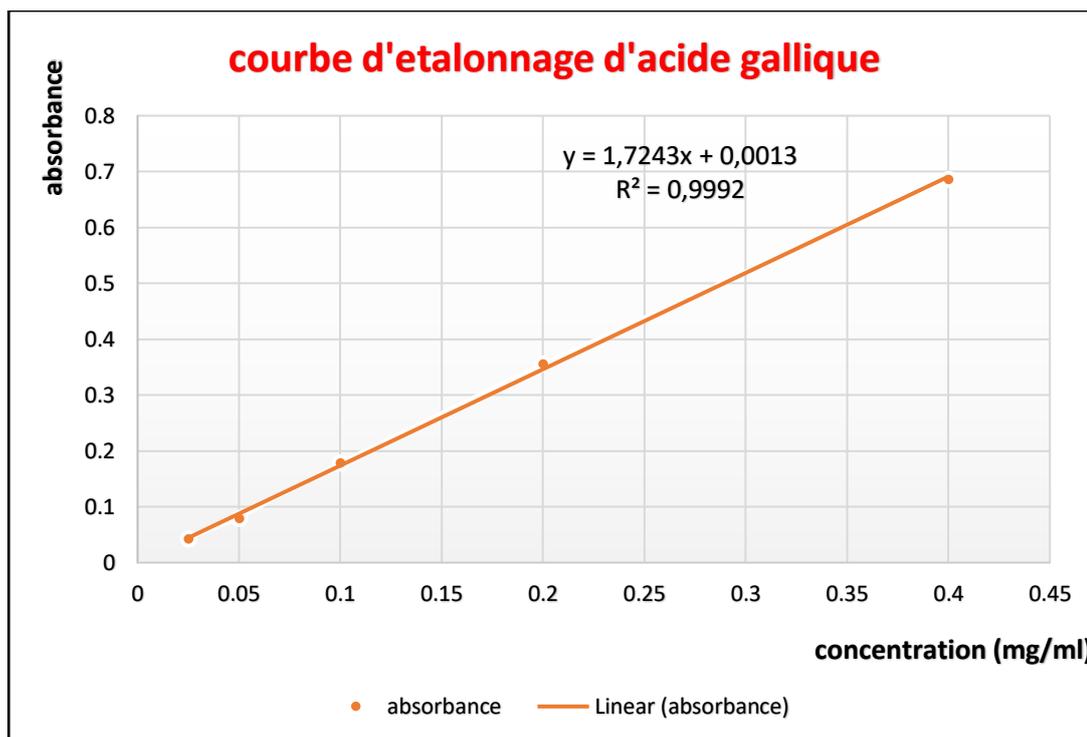
#### 4 Dosage des polyphénols totaux

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches in vivo et in vitro, pour rechercher de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques. Les polyphénols suscitent actuellement un intérêt croissant des nutritionnistes, des industriels pharmaceutiques et agro-alimentaires grâce à leurs propriétés biologiques et leur implication probable dans la prévention des diverses maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (199).

Ils constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes (200). Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de la relation entre les diverses activités biologiques de ces métabolites secondaires telles que les activités antibactériennes, antiviral, antiinflammatoire antithrombotique et vasodilatatrice et leurs propriétés antioxydante(201, 202).

C'est la raison pour laquelle, le dosage des phénols totaux des deux plantes étudiées a été effectué dans cette partie de notre étude. Le dosage et l'analyse quantitative des composés phénoliques totaux dans les extraits éthanoliques *Psidium guajava* et *Juglans regia* est réalisé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Considérée comme une méthode de référence pour la détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes. C'est une méthode pratique, simple et reproductible (203).

Pour cela, une courbe de d'étalonnage est préalablement réalisée avec des solutions étalons de l'acide gallique à différentes concentrations (composé phénolique de référence) dans les mêmes conditions de l'analyse des échantillons. Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées à partir de la de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).



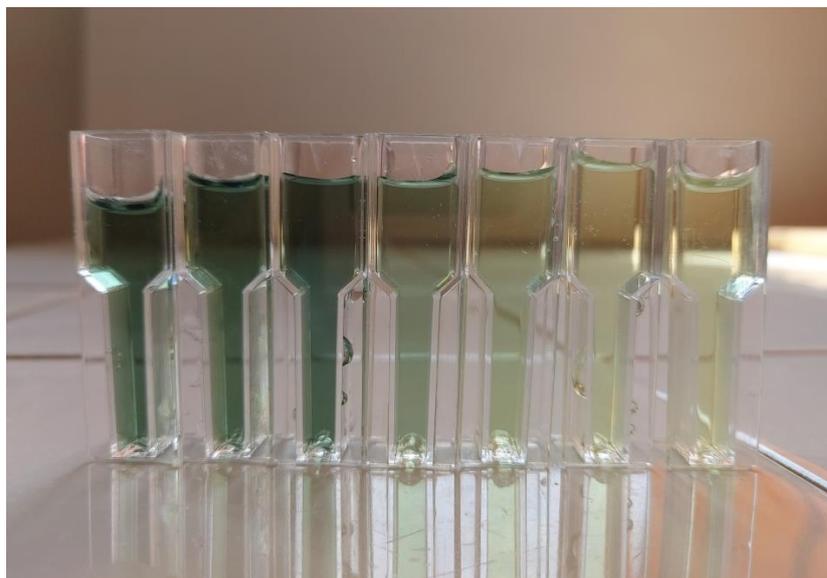
**Figure 30** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

D'après la figure ci-dessus, on remarque que le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est proche de 1 ( $R^2 = 0,9992$ ) ; Cette courbe peut être donc utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols des échantillons.

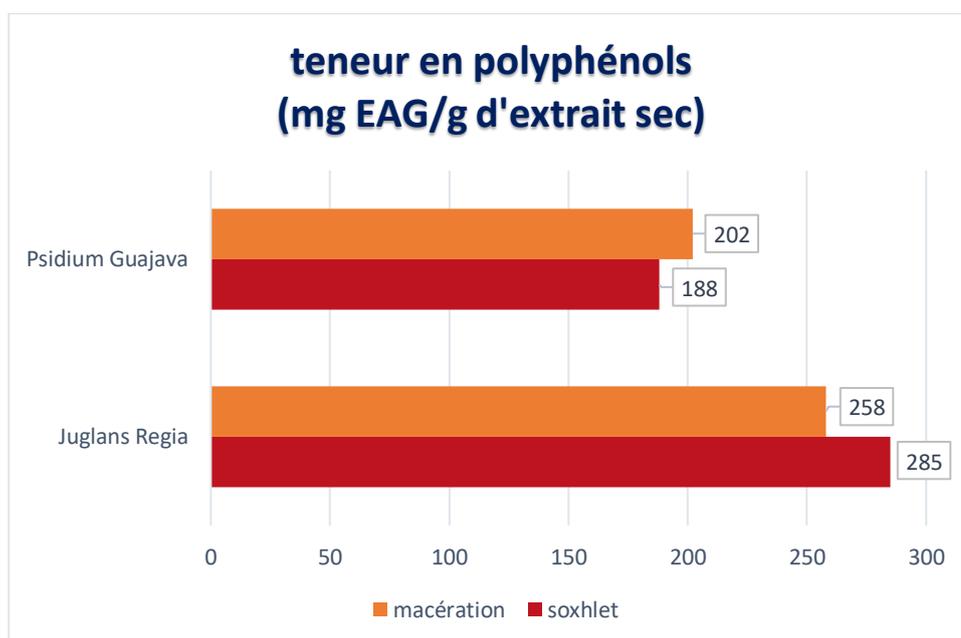
Les résultats calculés sont exprimée en tant que moyenne de trois répétitions  $\pm$  l'écart-type et ils sont mentionnés dans le tableau et la figure suivantes :

**Tableau VII** : Résultats du dosage des polyphénols

	<b>Teneur en polyphénols (mg EAG/g d'extrait sec)</b>	
	<b>Juglans regia</b>	<b>Psidium Guajava</b>
<b>Soxhlet</b>	285 $\pm$ 0.022	188 $\pm$ 0.020
<b>macération</b>	258 $\pm$ 0.018	202 $\pm$ 0.058



**Figure 31 :** Concentration croissante en polyphénols.



**Figure 32 :** Concentration des composés phénoliques totaux de *Psidium guajava* et *Juglans regia*.

Le tableau et la figure 32 représentent les variations de la teneur en polyphénols des extraits des écorces de *Juglans regia* et les feuilles de *Psidium guajava* obtenus par les deux méthodes d'extraction : soxhlet et macération. Ces résultats montrent que l'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* préparé par la méthode de soxhlet est plus riche en composés phénolique avec une teneur de  $285 \pm 0.022$  mg EAG/g d'extrait suivi de l'extrait éthanolique de la même plante préparé par macération avec une teneur de  $258 \pm 0.018$  mg EAG/g d'extrait. Par ailleurs, le macéré éthanolique de la partie aérienne *Psidium guajava* a donné une teneur de  $202 \pm 0.058$  mg EAG/g d'extrait en composés phénoliques qui est un peu plus élevé de celle de l'extrait préparé par soxhlet qui a marqué la valeur la plus basse avec un taux de  $188 \pm 0.020$  mg EAG/g d'extrait.

La comparaison des résultats obtenus dans le présent travail avec la littérature a montré une grande variabilité dans la teneur totale des polyphénols en fonction des polarités des solvants utilisés et de différentes procédures d'extraction suivies. Pour les écorces *Juglans Regia* la teneur en polyphénol totaux des deux extraits éthanoliques est inférieur à celui enregistré par (M. Boulfia, et al.2020) qui ont trouvé une teneur en polyphénol total de l'ordre  $327.972 \pm 0.06$  mg EAG/g d'extrait dans les extraits acétoniques préparés par macération des écorces de cette plante collectés de Oued Amlil Provenant de Taza, Maroc. Autre recherche sur des extraits d'éthyle acétate dans la région Mahdia (Tunisia) a révélé un taux  $34.833$  mg qui est aussi plus élevé que nos résultats. Pour la partie aérienne de *Psidium guajava* la teneur en polyphénol totaux des deux extraits éthanoliques est supérieur à celui trouvée par Seo et al qui rapporté une teneur en PTC de  $185$  mg GAE/g et de  $150$  mg GAE/g dans des extraits préparés par la méthode de macération avec de l'éthanol à 50 % et 70 %, respectivement (204) .

D'autres rapports dans la littérature ont confirmé des teneurs de  $288,56$  mg GAE/g sur l'extrait sec obtenu avec de l'éthanol à 50 %, et sur l'extrait sec obtenu avec 70%, le TPC de  $229,80$  mg GAE/g a été enregistré (205).

Ces différences dans les résultats en teneurs de composés phénoliques, peuvent probablement être expliquées par les différence dans l'origine (206) , la variété, la saison de récolte de la plante, la localisation géographique, la maturité et les différentes maladies qui peuvent affecter la plante (207) . En outre les conditions climatiques dures des endroits où les plantes poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité)

stimulent généralement la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols. Aussi, elle peut être liée à la distribution des métabolites secondaires, qui peut changer pendant les stades développement de la plante (208).

Le procédé et le solvant d'extraction peuvent aussi influencer le taux des composés phénoliques. Généralement, la solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui peut varier de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins (209).

L'extraction des composés phénoliques dans le matériel végétal est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction, la taille de l'échantillon, temps et les conditions de stockage ainsi que la présence de substances interférentes (210). Les composés phénoliques dans les extrait des plantes sont plus souvent associés à d'autres biomolécules (protéines, polysaccharides, terpènes, chlorophylle, lipides, et composés inorganiques) et le solvant d'extraction peut emporter ces substances non phénoliques qui peuvent interférer durant toute évaluation phénolique donnant des teneurs apparent plus élevées ou plus faibles (211, 212).

## 5 Activité antioxydante

L'équilibre entre l'oxydation et l'antioxydation est considéré comme crucial pour le maintien de bien être des systèmes biologiques. Les composés réducteurs d'origine exogène ou les antioxydants exogènes tels que la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols jouent un rôle clé et essentiel dans cet équilibre. Plusieurs études *in vitro* ont décrit les propriétés antioxydantes et ont mis en évidence l'activité cytoprotectrice de constituants alimentaires végétaux tels que les polyphénols leurs effets préventifs contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (213).

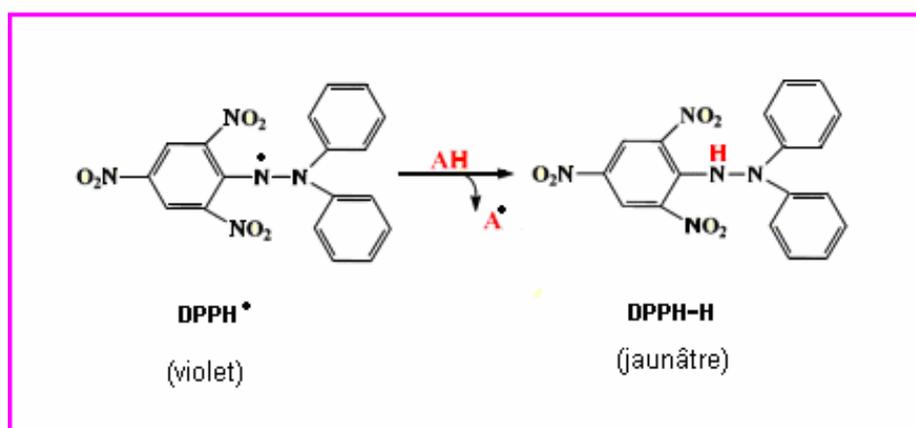
Ces composés peuvent réagir par plusieurs mécanisme afin d'inhiber les phénomènes d'oxydation: soit par piégeage ou réduction des radicaux libres, ou par la chélation des métaux de transition (39). Considérant les aspects multiples des antioxydants et de leur réactivité, plusieurs tests d'antioxydants ont été appliqués. Plusieurs tests antioxydants complémentaires *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés pour l'évaluation du pouvoir antioxydant

mais aucune méthode universelle n'est adoptée afin de de quantifier avec précision l'activité antioxydante.

Dans cette étude les extraits bruts éthanolique préparés à partir de de la partie aérienne de *Psidium guajava* et les écorces de *Jugulans regia* et l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Psidium guajava* ont été étudiés pour leurs activités antioxydantes en utilisant deux méthodes : le piégeage des radicaux libres : DPPH et la méthode de la réduction de fer (FRAP). L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme antioxydant de référence.

### 5.1 Piégeage des radicaux libres DPPH

Ce test est très largement utilisé et recommandé pour l'évaluation directe et rapide de l'activité antioxydante et ceci grâce à sa facilité, sa reproductibilité et sa précision pour la mesure de l'activité antioxydante des extraits des végétaux. En outre, cette méthode n'implique pas de de nombreuses étapes et de nombreux réactifs et elle est peu coûteuse par rapport aux autres modèles d'essai. Il est bien connu que quand une solution de DPPH (1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est mélangée avec celle d'une substance (AH) contenant des antioxydants qui peut donner un atome d'hydrogène, le radical libre stable DPPH (couleur violet foncé) est converti en sa forme réduite 1,1-diphényl-2-picryle hydrazine ce qui entraîne une décoloration ou une couleur jaune pâle résiduelle provenant du groupe du groupe picryl encore présent facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (131, 174).



**figure 33** : structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (203).

Dans la présente étude l'activité antioxydante évaluée par le test de piégeage du radical DPPH a donné des valeurs qui nous ont permis de tracer des courbes du pourcentage d'activité anti radicalaire pour les extraits éthanoliques, HE, BHT et la vitamine C. La cinétique du pourcentage d'activité anti radicalaire nous a permis de déterminer l'IC50, qui correspond à la concentration des extraits nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu. Notons IC50 est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, plus cette valeur est basse, plus l'activité anti-oxydante est grande. Cette concentration est calculée graphiquement par les régressions linéaires des tracés : pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons testés. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous et la figure n 34.

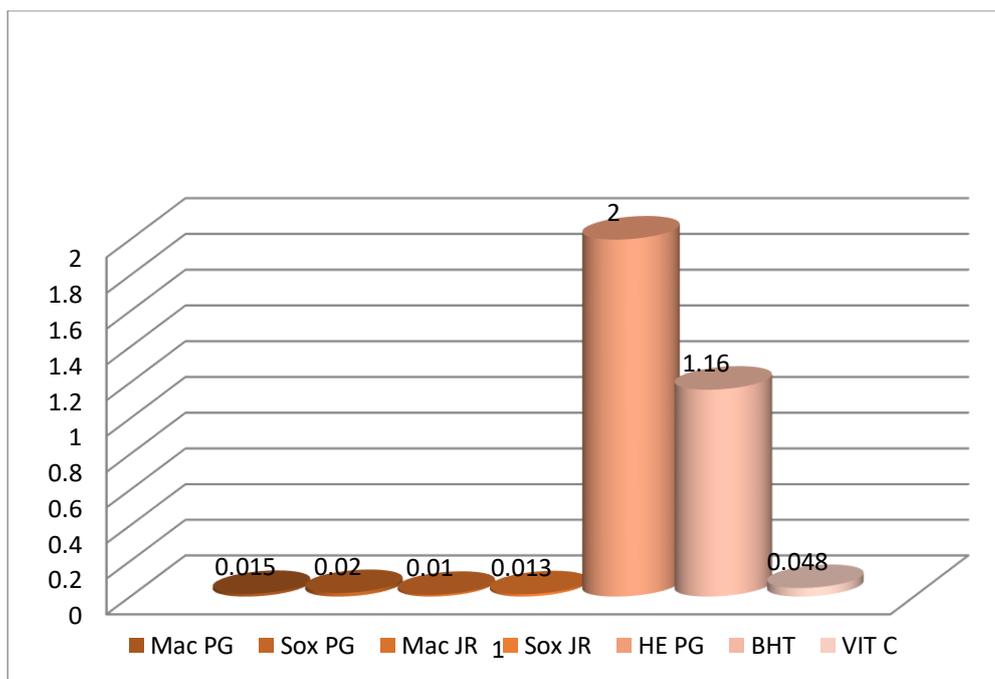
**Tableau VIII** : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et du BHT à différentes concentrations.

Echantillons	Activité antioxydante						
<b>J.R Macéré</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0.0015</b>	<b>0,003125</b>	<b>0,00625</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.025</b>	
	Le pourcentage d'inhibition (%)	16%	22%	40%	74%	87%	
<b>J.R Soxhlet</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0.003125</b>	<b>0.00625</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.025</b>	<b>0.05</b>	
	Le pourcentage d'inhibition (%)	10%	30%	67%	76%	88%	
<b>P.G Macéré</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0.00015</b>	<b>0.003125</b>	<b>0,000625</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.025</b>	<b>0.05</b>
	Le pourcentage d'inhibition (%)	13%	21%	40%	69%	88%	92%
<b>P.G Soxhlet</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0.00015</b>	<b>0.003125</b>	<b>0.00625</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.025</b>	<b>0.05</b>
	Le pourcentage		13%	22%	42%	77%	92%

<b>P.G HE</b>	d'inhibition (%)	-					
	Concentration (mg/mL)	<b>0.28125</b>	<b>0.5626</b>	<b>1.125</b>	<b>2.25</b>	<b>4.5</b>	<b>-</b>
	Le pourcentage d'inhibition (%)	9.96%	16.33%	27.55%	56.55%	76.44%	
<b>BHT</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	Le pourcentage d'inhibition (%)	29,40%	35,60%	48,90%	72,90%	84,10%	87,35%
<b>Vit C</b>	Concentration (mg/mL)	<b>0.04</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.08</b>	<b>0.2</b>	
	Le pourcentage d'inhibition (%)	39.40	51.03	68.57	97.84	98.36	

**Tableau X : Les valeurs des IC50 (mg/ml)**

Antioxydant	IC 50 mg/ml
<b>Macérer de J.R</b>	0.011
<b>Soxhlet de J.R</b>	0.0131
<b>Macérer de P.G</b>	0.0155
<b>Soxhlet de P.G</b>	0.02
<b>HE de P.G</b>	2
<b>BHT</b>	1.16
<b>Vitamine C</b>	0.048



**Figure 34** : histogramme des IC<sub>50</sub> des extraits et HE étudiés ainsi que le BHT et vit C.

A la lumière de la lecture des résultats obtenus on peut constater que l'activité anti radicalaire est dose dépendante car elle est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons. Les extraits éthanoliques des deux plantes étudiées préparés par la macération et par la méthode de soxhlet ont montré une activité antioxydante très intéressante avec des IC<sub>50</sub> qui ne dépassent pas 20µg/ml (0.02 mg/ml) et qui reste supérieur à celle du BHT (1.16 mg/ml) et de la vitamine C (0.048 mg/ml).

D'autre part, l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Psidium guajava* présente une activité antioxydante faible avec une IC<sub>50</sub>= 2mg/ml ce qui est moindre par rapport au pouvoir antiradicalaire des antioxydants synthétiques de référence. Dans une autre étude menée par Wei Cai Leea en Malaisie sur l'activité antioxydante d'huile essentielle extraite des feuilles de *P. guajava* par trois essais différents : piégeage des radicaux libres (DPPH), le pouvoir réducteur (FRAP), Test de blanchiment au bêta-carotène, ont montré un pouvoir antioxydant modéré. Il est possible d'expliquer l'activité antioxydante obtenue dans la présente étude par les propriétés chimiques de l'huile essentielle qui contient le Limonène comme composé majoritaire. Dans une étude antérieure l'activité antioxydante de limonène a été étudiée par la méthode DPPH et l'IC<sub>50</sub> a été trouvée égale à 1,50 mg/ml (214).

Il est établi dans plusieurs études que l'activité d'une HE est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les différents constituants. Cependant, il est prouvé que les activités antioxydantes des composés majoritaires, testés séparément, donnent, souvent, des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'huile essentielle. En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle est à l'origine du pouvoir antioxydant (215, 216). Les travaux de Gachkar et al (217) ont démontré que les huiles avec une prédominance monoterpénique ont une activité antioxydante assez modérée ce qui est en concordance de nos résultats.

Les deux extraits de la partie aérienne *P. guajava* préparés par la méthode de macération et la méthode Soxhlet ont montré presque le même pouvoir antioxydant avec des IC50 proches de 0.0155 et 0.02 mg/ml respectivement. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs, Une étude menée par Y. Lahlou et al sur les extraits des feuilles préparés par macération de *P. guajava* ont révélé une bonne capacité antiradicalaire avec des IC50 de  $102 \pm 9.97 \mu\text{g/mL}$ .

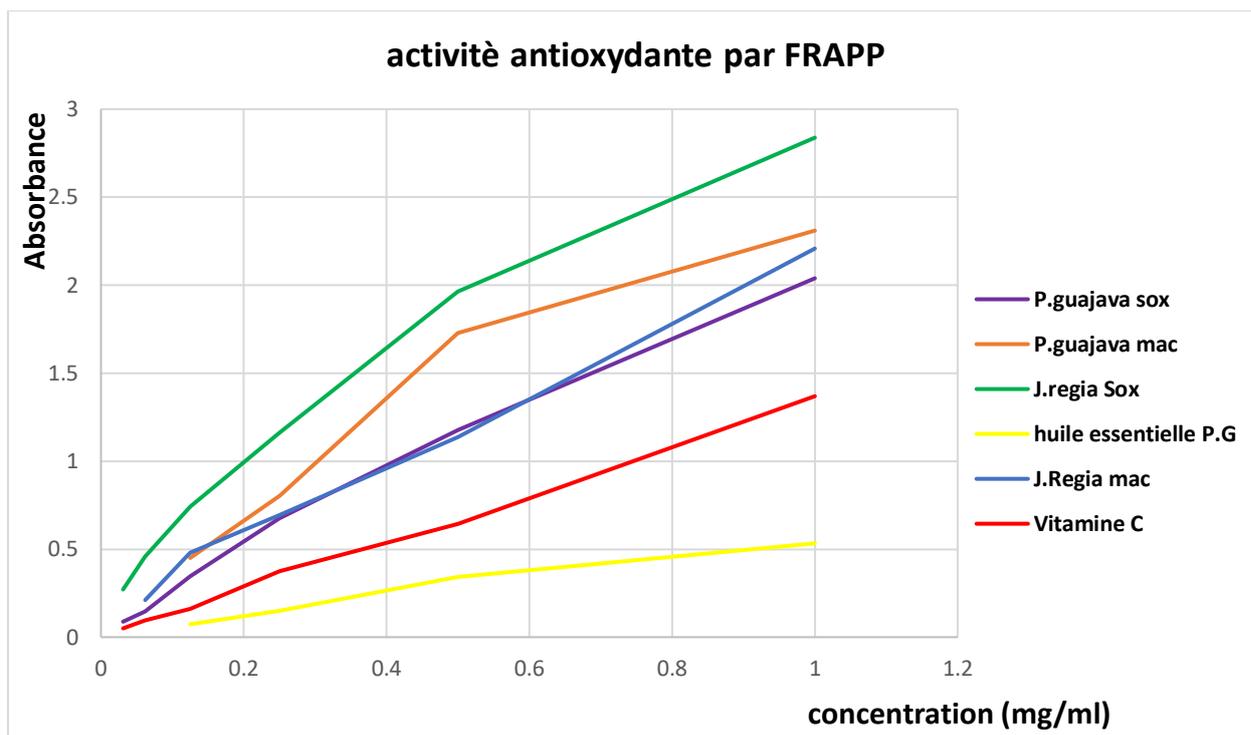
En ce qui concerne l'extrait de *J.regia* ; l'étude menée par Noumi et al. 2011 sur l'extrait d'acétate d'éthyle des écorces provenant de la Tunisie a montré un fort pouvoir antiradicalaire avec une IC50 de  $3 \mu\text{g/ml}$  ce qui est supérieur au pouvoir antioxydant des deux extraits de la même plante étudiés dans notre étude avec des valeurs de IC50 de 11 et  $13.1 \mu\text{g/ml}$ . Cependant une autre étude menée par KBhatia, et al 2006 (218) sur des extraits aqueux a montré une faible activité de piégeage des radicaux avec une valeur d'IC50 =  $601 \mu\text{g/ml}$ . Cette variation des résultats pourrait s'expliquer par la différence de réactivité des extraits due à leur complexité chimique, les conditions expérimentales, le protocole expérimental utilisé et différentes procédures et solvants adoptés pour l'extraction du matériel végétal ainsi que les facteurs liés à la croissance de l'espèce végétale elle-même (région de récolte, climat et stade de maturité).

Globalement, les résultats obtenus par la méthode du piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que les extraits des deux plantes étudiées ont une forte capacité antiradicalaire qui pourrait être attribuée aux métabolites secondaires des plantes notamment les composés phénoliques (Sala *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2004; Krishnaiah

*et al.*, 2011). Selon plusieurs études, les composés phénoliques sont les principaux agents qui peuvent céder de l'hydrogène aux radicaux libres et ainsi interrompre la réaction en chaîne de l'oxydation des lipides à la première phase de l'initiation (219) . Cette grande capacité des composés phénoliques à piéger les radicaux peut être attribuée à la présence de groupes hydroxyles phénoliques (220). Il est néanmoins évident que l'activité antioxydante des composés phénoliques dépend principalement de la position et du nombre des groupes hydroxyle donneurs d'hydrogène sur les cycles aromatiques des composés phénoliques (120, 221).

## 5.2 Pouvoir réducteur FRAP

L'évaluation du pouvoir réducteur de fer (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) est basée sur la présence d'un réducteur dans les extraits qui provoque la réduction d'un oxydant (le fer ferrique  $Fe^{3+}$ ) en lui cédant un électron pour former le fer ferreux  $Fe^{2+}$  et peut être évalué en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (222, 223). Il s'agit d'une technique à la fois rapide, simple, directe et reproductible La capacité réductrice des composés ou des échantillons est considéré comme l'indicateur majeur de leurs potentiels antioxydants. Les résultats de l'activité réductrice des extraits éthanoliques ainsi que huile essentielle des plantes étudiées sont représentés dans la figure suivante.



**Figure 35 :** Pouvoir réducteur des extraits et HE des feuilles de PG et d'écorces de JR.

Les résultats obtenus montrent que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Notons que l'extrait de *Jugulans regia* préparé par la méthode de soxhlet présente le pouvoir réducteur le plus élevé suivie par le macéré des deux plantes *Psidium guajava* et *Jugulans regia* respectivement ensuite l'extrait de soxhlet de *P. guajava*. Ces activités sont nettement meilleure que celle du VIT C et huile essentielle de *Psidium guajava*. Ces résultats confirment que les extraits renferment des substances pouvant réduire l'ion ferrique en ion ferreux. Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont des substances donneuses d'électrons qui jouent un rôle important dans la démonstration de la capacité de réduction. Par conséquent, le pouvoir réducteur et la teneur totale en phénoliques et en flavonoïdes peut être une raison de l'activité élevée du pouvoir réducteur (224).

Les études menées par **Tepe et al (2005)** et **Gulçin et al. (2003)** (225, 226) indiquent que la méthode et le solvant d'extraction ont une influence sur l'activité antioxydante des

extraits. La variation dans l'activité antioxydante pourrait être due à la quantité et /ou à la nature des substances antioxydantes présentes dans les extraits. L'activité antioxydante et la quantité de polyphénols d'un extrait sont des paramètres qui dépendent fortement des conditions opératoires de l'extraction, et en particulier de la nature et de la polarité du solvant. Elles ne sont pas favorisées dans le cas d'extraits utilisant des solvants purs (227).

Cependant, Les composés phénoliques ne sont pas les seuls à contribuer aux activités antioxydantes des extraits de plantes médicinales, ces plantes peuvent contenir plusieurs autres antioxydants non phénoliques tels que des composés azotés, des caroténoïdes, de l'acide ascorbique, de la vitamine E et du  $\beta$ -carotène qui pourraient également être responsables de l'amélioration de l'activité antioxydante des extraits de plantes (228).

## 6 L'activité antifongique

L'émergence de microorganismes et des levures pathogènes multi résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des mycoses aux antifongiques rend quelques fois le traitement thérapeutique inefficace, et met le praticien dans des situations délicates (229). Celui s'applique pour *Candida albicans*, l'agent causal le plus associé aux infections fongiques. Il a été identifié que *C. albicans* est un champignon pathogène prédominant, responsable de multiples formes de candidoses humaines primaires et émergentes (230).

Les candidoses méritent une attention plus particulière de par leur fréquence et leur ténacité. Par ailleurs, compte tenu de la recrudescence de ces infections et de l'utilisation plus fréquente d'un nombre limité d'agents antifongiques, on assiste à une émergence de souches pathogènes résistantes. Par conséquent, il existe un besoin urgent de nouveaux agents antifongiques pour la gestion efficace des infections à candida. La recherche sur les constituants actifs des remèdes naturels ou traditionnels est fortement une solution prometteuse et le recours aux plantes médicinales aux propriétés antifongique constitue alors une des plus intéressantes pistes à (231, 232).

Ce problème de résistance et celui de la récurrence justifient en quelque sorte le choix de ce travail dont l'objectif est de contribuer à la recherche d'autres produits antimycosiques qu'ils soient disponibles et moins chers. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique des extraits des deux plantes *Juglans regia* et *Psidium guajava* obtenues par les deux méthodes macération et Soxhlet contre deux levures du genre *Candida* connues pour leurs pathologies mycosiques buccales.

Cette étude a été réalisée par deux techniques complémentaires :

- La première méthode est la diffusion sur gélose (méthode de disques),
- La deuxième méthode est basée sur la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur microplaque.

Le choix des microorganismes dépend du but de la recherche. Dans un screening primaire, les souches de références (*C.albicans 10231* et *C.albicans 26790*) sensibles aux antifongiques de sont employées.

### 6.1 Evaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion des disques

L'activité antifongique des extraits préparés a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition ; de plus, leurs diamètres de zone d'inhibition et leurs valeurs CMI ont été déterminés.

Dans cette méthode, le milieu de culture utilisé est la gélose Sabouraud à un pH de 7.2 à 7.4, ce qui permet de produire des zones d'inhibition visibles. La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (mm).

La sensibilité des souches testées envers les extraits testés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition :

- Diamètre < 8mm: non sensible (-) ou résistante
- Diamètre compris entre 9 à 14 mm: sensible (+)
- Diamètre compris entre 15 à 19 mm: très sensible (++)
- Diamètre > 20 mm: extrêmement sensible (+++)

Les résultats du screening primaire de l'activité antifongique par la méthode de diffusion des disques sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

**Tableau IX :** Résultats de l'activité antifongique des extraits testée par la technique de diffusion des disques.

	<i>C.albicans10231</i>				<i>C.albicans26790</i>			
	1	2	3	means+Sd (mm)	1	2	3	means+Sd (mm)
<b>Ampho B</b>				<b>32</b>				<b>30</b>
<b>Gmac</b>				/				/
<b>G sox</b>				/				/
<b>J.R mac</b>		0	2	10,33 ±0,88	2	3	1	12±0,57
<b>J.R sox</b>	4	3	4	13,66±0,57	5	3	4	14±1
<b>He gy</b>				8±0,57	1	2	0	11+0,57



**Figure 36 :** Résultats de l'activité antifongique des extraits testée sur la souche *C.albicans26790* par la technique de diffusion des disques.

D'après le tableau nous remarquons que les deux extraits de la partie aérienne *P. guajava* n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance des deux souches de *Candida* testées. L'huile essentielle de la même plante a donné une activité antifongique modérée avec des zones d'inhibition de 8 et 11mm contre des souches de souches de *C.albicans 10231* et *C.albicans 26970* respectivement.

Les deux extraits éthanoliques des écores de *J. regia* préparés par la macération et la méthode de soxhlet ont donné un effet inhibiteur moyen sur les souches de levure testés avec des diamètres d'inhibition allant de 10,33 à 14 mm. En outre l'extrait des écorces de noyer préparé par soxhlet était plus actif que l'extrait de la même plante préparé par la macération.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que les différents extraits testés présentent une activité antifongique de magnitude variable et ceci peut être expliqué par la différence de composition entre les différents extraits, la méthode et solvant d'extraction et la solubilité d'extrait.

Selon **Anju Dhiman et al. 2022** (233) l'extrait méthanoliques des feuilles de de *Psidium guajava* préparé par soxhlet a montré un faible effet inhibiteur contre les souches de levures testées avec des un diamètre d'inhibition allant de ( $6.6 \pm 1.1$  à  $9 \pm 1.0$  mm) alors que nos extrait éthanoliques étaient inactifs contre les levures de candida testés ce qui confirme l'influence de type du solvant sur la composition chimique de l'extrait et par conséquent sur ses activités biologiques.

Il existe peu de publications sur l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de goyave. Les travaux de Sunita Munda et al sur l'activité antifongique d'huile essentielle extraite des feuilles *Psidium guajava* n'ont montré aucun effet inhibiteur de l'huile essentielle sur la croissance de la levure testée *C. albicans s (ATCC-66027)*.

D'après (**Croitoru et al. 2019**)(234) les activités anti candidales d'extrait d'acétate d'éthyle des écorces de *noyer* ont été testées contre plusieurs souches de *Candida*, en utilisant la méthode de diffusion sur disque afin de prévenir l'hygiène buccale et la carie dentaire. Les résultats ont révélé que l'extrait était efficace contre toutes les souches de *Candida* avec un diamètre d'inhibition compris entre 9,55 et 15 mm ce qui concorde avec nos résultats.

## 6.2 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits par la méthode des plaques de microtitration

Les résultats du screening primaire des extraits étudiés par la technique de diffusion sur disque ont mis en évidence une activité modérée. A la lumière des résultats préliminaires, nous avons choisi une évaluation quantitative de cette activité antifongique plus détaillée par la méthode de dilution en utilisant la plaque de microtitration (96 puits). Les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau X** : les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits.

	<i>C.albicans10231</i>	<i>C.albicans26790</i>
<b>Ampho B</b>	8	4
<b>J.R mac (mg/ml)</b>	0,156±0,00	0,156±0,00
<b>J.R Sox (mg/ml)</b>	0.078±0.00	0.078±0.00
<b>Hg (v/v %)</b>	/	0,390±0,00

D'après les résultats mentionnés, nous pouvons conclure que l'extrait des écorces de *J. regia* préparé par la méthode de soxhlet était le plus active à inhiber la croissance des deux souches de *C.albicans* testées avec une concentration minimale inhibitrice de 78µg/ml suivi de l'extrait de la même plante préparé par macération qui a donné aussi une activité antifongique intéressante avec une CMI de 156µg/ml envers les deux souches de levures testés. Cette différence trouvée entre l'activité antifongique des deux extraits de la même plante préparés par deux méthodes différentes pourrait être due à la perte des composés thermolabiles au cours du procédé d'extraction, du broyage ou la méthode de conservation de la plante.

L'étude menée par Noumi et al (235) a montré que les trois extraits préparés par macération des écorces *J. regia* dans trois solvants différents (acétone dilué, acétate d'éthyle et méthanol) étaient actifs contre toutes les souches de *Candida*, mais leur efficacité était variable. Les CMI étaient comprises entre 0,006 à 0,195 mg/ml. L'extrait d'acétate d'éthyle était le plus efficace. Plusieurs études ont démontré aussi l'activité antimicrobienne des produits de noix, en particulier de l'écorce (236).

Cette activité antifongique remarquable peut être attribuée à la composition chimique des extraits des écorces de cette plante. Les deux extraits testés dans le présent travail étaient riches en polyphénols totaux. Des études antérieures ont démontré que l'écorce de *J. regia* contient plusieurs constituants actifs sur le plan thérapeutique ou le naphthoquinone : juglone était le composé majoritaire associé à de nombreux polyphénols bioactifs(237). Juglone ou 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone est un naphthoquinone d'un grand intérêt en raison de sa réactivité chimique et de sa bioactivité. Les propriétés antifongiques de ce composé ont été confirmées par plusieurs recherches dans ce domaine(237, 238).

Huile de goyave n'a pas fait l'objet de screening secondaire contre *C.albicans* 10231 vu que le diamètre de zone d'inhibition était de (8+0.57 mm) et par conséquent, l'huile a une très faible activité vis-à-vis de cette souche. Par contre, cette huile essentielle a inhibé la croissance de *C.albicans* 26790 avec une CMI de 0,390±0,00 (% , v/v). Selon Souza et al. (2005) (239), le mode d'action qui se traduit par l'inhibition de la croissance des microorganismes par les huiles essentielles fait intervenir de nombreux mécanismes dépendant des principaux composants de l'huile essentielle. Il est à noter que la lipophilie est une caractéristique importante des huiles essentielles, leur permettant de traverser la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique en franchissant les différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides. Ainsi, elles modifient la perméabilité des organites, et affectent directement le pH intracellulaire et l'équilibre des ions inorganiques (240).

L'activité antifongique de notre huile essentielle peut être attribuée au composé majoritaire qui est le limonène. Comme elle peut être due à une synergie entre les différents composés. Selon Hao Yu et al (241) le D-limonène à inhiber significativement la croissance de *C. tropicalis* à une concentration de 40 µL/mL produisant une zone d'inhibition de 14,4 ± 0,6 mm de diamètre. Dans une autre étude menée par **Julián E. Muñoz et al** le limonène a inhibé la croissance de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis in vitro* à des concentrations ≥500 µM. Les huiles essentielles contenant du limonène sont capables d'exercer un effet fongicide sur des souches de *Candida* en induisant des modifications morphologiques dans les cellules de levure et en inhibant la formation de pseudohyphes(242).

Des études antérieures ont décrit que l'utilisation de limonène à des concentrations entre 0,6 et 5 mM induit l'apoptose chez *C. albicans*, en raison des dommages causés à la paroi et à la membrane cellulaires, les auteurs ont affirmé que la mort cellulaire était

probablement due au stress oxydatif produit par le limonène, qui entraîne des lésions de l'ADN, des altérations du cycle cellulaire et, enfin, l'apoptose de la levure (243).

Selon certains autres auteurs (239, 244) il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats trouvés et ceux rapportés par la littérature, ceci peut être dû :

- A la nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'huile essentielle, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;
- Au procédé d'extraction ;
- A la composition chimique des huiles essentielles utilisées ;
- Au niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- A la nature des souches testées ;
- Aux méthodes utilisées pour estimer l'activité antifongique ;

## Conclusion Générale et perspective

La phytothérapie traditionnelle et l'utilisation des plantes médicinales présentent un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales offrent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Le présent travail est réalisé dans le cadre de la valorisation de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle locale pour leurs vertus thérapeutiques en établissant une relation entre leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques.

Les deux plantes choisies dans cette investigation sont les écorces de *Juglans regia* récoltées de la région de Tlemcen et la partie aérienne de *Psidium guajava* récoltée de la région de Tipaza. La sélection des plantes est basée sur quelques données ethnopharmacologiques.

Les deux Plantes ont fait l'objet d'une extraction par deux méthodes la macération et la méthode de soxhlet, une extraction d'huile essentielle de la partie aérienne de *P.guajava* et une évaluation de potentiel antioxydant et d'activité antifongique.

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu ; cette analyse a montré que les extraits éthanolique bruts issus des deux plante sont riches en composés phénoliques.

L'analyse chimique d'huile essentielle extraite de la partie aérienne *Psidium guajava* a permis d'identifier 78 composés représentants 94.2% de la composition totale d'huile essentielle. Elle est principalement dominée par la classe des monoterpènes avec un pourcentage de 71.74%.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'ensemble des extraits et d'huile essentielle a été réalisé par deux méthodes : méthode piégeage de radical libre (DPPH), capacité à réduire le fer (FRAP). Les extraits étudiés ont montré une activité de piégeage du radical libre DPPH très intéressante avec des IC50 qui ne dépassent pas 20µg/ml (0.02 mg/ml) et qui reste supérieur à celle du BHT et de la vitamine C, alors que l'huile essentielle de *Psidium guajava* présente une activité antioxydante faible avec une IC50= 2mg/ml ce qui est moindre par rapport au pouvoir antiradicalaire des antioxydants de référence.

En outre, l'activité antifongique des extraits des deux plantes ont été testées individuellement sur deux souches de référence (*Candida albicans* 10231et 26790). L'huile

essentielle de *Psidium guajava* a donner une activité seulement vis-à-vis les candida 26790, et

seulement les deux extraits éthanoliques macéré et soxhlet de *Juglans regia* qui étaient actifs sur les deux souches de levures *C.albicans* avec des CMI de 0.078 mg/ml

L'ensemble des résultats obtenus montre que les deux plantes étudiées sont de puissants capteurs de radicaux libres, possédant ainsi diverses propriétés biologiques liées à cette activité antioxydante. Ces sources potentielles d'antioxydants naturels peuvent être exploitées dans des préparations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. En outre, les extraits des écorces de *Juglans regia* sont douées d'activité antifongique intéressante et peuvent être exploitées dans des préparations pharmaceutiques. D'autres études approfondies sont nécessaires de nombreuses perspectives sont envisagées :

- Compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules isolées en utilisant des techniques chromatographiques, spectrales et spectrophotométriques.
- Elargir le panel des tests des activités in vitro,
- Evaluer et tester les différents extraits et molécules isolées in vivo afin d'y trouver une application pharmaceutique de ces molécules actives.

Etudier la toxicité des extraits pour déterminer leur utilisation

---

## **Annexe**

## Monographie de *Psidium guajava*

La goyave est l'un des fruits les plus complets que nous a offerts la nature. Ce fruit a une riche histoire de l'utilisation de la médecine ; récemment devenue un grand intérêt pour les scientifiques qui se livrent eux-mêmes dans la recherche pharmaceutique, nutritionnelles et pharmacologiques et dans le développement de nouveaux médicaments en raison de sa teneur élevée en composés organiques et inorganiques comme les métabolites secondaires(245).

### 1 nomenclature et taxonomies

Le genre PSIDIUM L a été décrit par Carl von Linné en 1753 de la famille des Myrtaceae et est réparti en plusieurs espèces originaires des régions les plus chaudes de l'hémisphère occidental.

La classification scientifique de la goyave, selon (246) est la suivante :

- Règne: planta
- Sous règne :Tracheobionta
- Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Ordre : Myrtales
- Famille : Myrtaceae
- Genre : Psidium
- Espèce : *P. guajava*

Le nom de genre Psidium vient du grec sidion qui signifie écorce de grenade(245).

- Nom français : goyavier / goyave ; (Guadeloupe, Martinique) ; gouyave (Haïti)
- Nom arabe : وافةج
- Nom en English: guava.

- Nom en espagnol : Guayaba común

## 2 Description de la plante

La Goyave est un arbuste qui peut atteindre 8 à 13 m de hauteur. Souvent ramifié très bas, il est assez tortueux et à bois très dur.

Son écorce lisse, mince, verte ou rougeâtre caractéristique se détache par plaques, Les feuilles persistantes sont opposées de forme oblongue à elliptique sont couvertes d'un fin duvet sur la face inférieure. Elles peuvent atteindre 15 cm de long et 6 cm de large. Le pétiole est court (3–5 mm). Elles sont aromatiques lorsqu'on les froisse. Les fleurs axillaires sont solitaires ou bien en cyme par 2 ou 3. Les pétales de 10–20 mm, blancs au nombre de 4, des nombreuses étamines (150-175), très visibles, font de 6 à 9 mm.



**Figure 37** : feuille de goyavier

La fleur est pollinisée par les insectes. Aux Antilles, la floraison a surtout lieu en avril-juillet.

Le fruit comestible très riche en vitamine C et en fer, est de forme ronde, ovoïde ou piriforme. Il est de couleur verte et vire au jaune à maturité . Sa pulpe rose-rouge est sucrée et parfumée . Le fruit renferme également de nombreuses petites graines dures.



**Figure 38** : fleur de goyavier

Le fruit est une baie ovoïde ou pyriforme, de 3–7 cm, avec à l’apex son calice persistant. La chair est blanche ou jaunâtre ou rose. Elle contient de nombreuses graines . Aux Antilles, la fructification a surtout lieu en septembre-octobre (247)



**Figure 39** : Fruit de goyavier

*Psidium guajava* aime les situations lumineuses et les températures élevées. il est indifférent à la nature du sol tant que celui-ci est humide et bien drainé. A la Réunion il se développe particulièrement bien entre 0 et 600 m d'altitude. On le retrouve à des altitudes plus élevées dans les cirques de Cilaos et Mafate.

La goyave est généralement multipliée par semis. la fructification commence 3 à 4 ans après le semis (248).

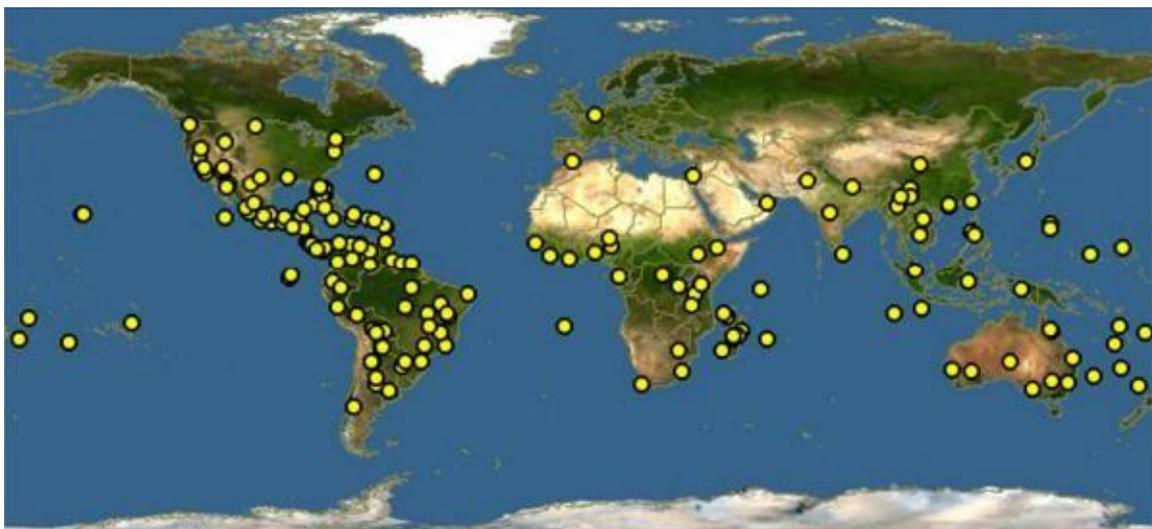
### 3 Habitat et répartition géographique du genre

Le goyavier tire son origine de l'Amérique Tropicale (249). Il tire son nom du mot indien *guyaba*, sous lequel on le désignait à Saint-Domingue. Il se propage avec une telle rapidité et croit avec tant de vigueur qu'en moins d'un demi-siècle, il a envahi totalement certaines îles d'Océanie (Tahiti).

Il existe à l'état sauvage et à l'état cultivé au Mexique, dans toutes les Antilles, le Guatemala, le Venezuela, les Guyanes, le Pérou et le Brésil oriental(250). Originaire des forêts tropicales humides et sèches, on le trouve également sur les rives des fleuves.

En Europe, il n'est pas très rustique et ne résiste pas à des températures négatives prolongées(251).

En Afrique il s'installe sous forme de petits îlots forestiers à travers les savanes côtières de la Côte d'Ivoire. (figure40).



**Figure 40 :** Distribution de la goyave dans le monde (Google, 2021)

En Algérie le goyavier est timidement cultivé sur le littoral, sans qu'il existe de plantation régulière. Il produit à Fouka (Tipaza) Exotisme dans la Mitidja. Il a été introduit à la fin des années 1970 à titre d'expérimentation, selon Hadj Ahmed Hamada, le seul

agriculteur en Algérie à se spécialiser dans la culture de ce fruit. En septembre et octobre, c'est la saison des goyaves communément appelées par la population locale les « goyaves » ou « djewaffa » au Moyen-Orient. Certains affirment que ce fruit a été introduit en Algérie directement du Moyen-Orient, d'autres pensent qu'il a été ramené d'Amérique Latine par les colons. Cette dernière hypothèse est la plus plausible puisque certaines maisons coloniales de Fouka ont toujours eu un ou deux goyaviers dans leurs jardins. Il a même été planté au Jardin d'Essais du Hamma, à Alger.

Aujourd'hui plusieurs agriculteur cherche à la cultivé dans les différente régions de pays à savoir les wilayas de AIN TEMOUCHENT, JIJEL, BLIDA...

#### **4 Métabolisme biochimique**

Le fruit renferme des glucides principalement des oses ,des acides organiques tels que l'acide ascorbique (vitamine C), des terpénoïdes : triterpènes , des vitamines B, des traces d'huile essentielle renfermant des composés phénoliques, plus particulièrement des phénols dont l'eugénol.

Il est caractérisé par une teneur élevée en acide protocatéchique, quercétine, acide férulique, acide ascorbique, quercétine, acide gallique et acide caféique qui sont des antioxydants importants. Son apport à l'organisme est inestimable car elle est riche en phosphore, niacine, potassium, vitamines A et B, C, fer, calcium, acide folique, et les acides organiques (252). L'Huile essentielle des feuilles de goyavier contient des Monoterpènes (~45%): Alpha pinène, Limonène et Sesquiterpènes (~21%): Béta Caryophyllène (253).

#### **5 activités biologiques**

La goyave est très riche en antioxydants qui contribuent à réduire l'incidence des maladies dégénératives telles que le dysfonctionnement cérébral, l'inflammation, les maladies cardiaques, le cancer, l'artériosclérose et l'arthrite (254).

Dans les fruits, les oxydants les plus abondants sont les polyphénols (flavonoïdes) et l'acide ascorbique(255)

Les extraits aqueux et organiques de *Psidium guajava* ont montré l'activité antibactérienne indiquée contre des espèces de *Staphylococcus aureus*, de *Proteus*, et

des espèces de *Shigella*. (256).

Le fruit mûr de la goyave a été signalé comme laxatif utilisé pour traiter la constipation. Des études indiquent que le fruit de goyave est plus efficace antidiarrhéique lorsqu'il est utilisé avec la peau.

*Psidium guajava* diminue la glycémie. Il a été démontré que l'extrait de fruit de goyave rétablit considérablement la perte de poids corporel et réduit le taux de glucose sanguin dans la condition diabétique.

L'activité anticancéreuse (cancer du sein MCF-7) de l'extrait méthanolique de la peau du fruit a été étudiée in vitro sur des Lignées cellulaires MCF-7 contre lignée cellulaire normale. Les valeurs ont révélé que l'activité antiproliférative était observée dans les cellules MCF-7 proportionnelle à concentration de l'extrait (255).

## 6 Utilisations médicinales traditionnelles

Les racines, l'écorce, les feuilles et les fruits immatures, en raison de leur astringence, sont couramment utilisées pour stopper la gastro-entérite, la diarrhée et la dysenterie, sous les tropiques.

Les feuilles écrasées sont appliquées sur les plaies, les ulcères et les endroits rhumatismaux, et les feuilles sont mâchées pour soulager les maux de dents.

La décoction de feuilles est prise comme remède contre la toux, la gorge et les maux de poitrine, gargarisée pour soulager les ulcères buccaux et les gencives enflammées ; et également pris comme emménagogue et vermifuge, et un traitement pour la leucorrhée. Il a été efficace pour arrêter les vomissements et la diarrhée chez les patients atteints de choléra. Il est également appliqué sur les maladies de la peau.

Une décoction des nouvelles pousses est prise comme fébrifuge, elle ainsi combinée de feuilles et d'écorce est administrée pour expulser le placenta après l'accouchement.

L'infusion de feuilles est prescrite en Inde dans les affections cérébrales, la néphrite et la cachexie. Un extrait est administré dans l'épilepsie et la chorée et une teinture est frottée sur la colonne vertébrale des enfants en convulsions (257).

La goyave présente aussi des vertus en cosmétologie, pour les cheveux notamment, elle en limite la perte ; elle est astringente et redonne de l'éclat à la peau ; ainsi elle peut être utilisée comme une lotion nettoyante.

Ce fruit est un bon gommage naturel Anti-Acnéique et contre les points noirs grâce à ses propriétés qui soulagent les irritations cutanées.

De plus les propriétés antibactériennes de la goyave, éliminent les bactéries buccales, assurant ainsi une meilleure haleine (258).

## MONOGRAPHIE DE *Juglans regia*

### 1 Nomenclature et taxonomie

Le noyer commun est une espèce forestière et fruitière d'une grande importance, du fait que ses fruits, son bois, son écorce et ses feuilles, trouvent une large utilisation dans la vie quotidienne algérienne (259).

\* **Désignations vernaculaires :** D'après Vanier (1999), *Juglans* vient du nom latin *Jovis glans* qui signifie gland de Jupiter (260).

Plusieurs appellations sont données : Noyer, Noyer commun, Noyer de Grenoble, Noyer royal, Calottier, Ecalonnier, Gojeutier, Gauguier, Gland de Jupiter, Acajou (261).

\* **Partie utilisée :** L'écorce



**Figure 41 :** *l'écorce J.regia "M'iswak"*.

### \* Origines courantes

Le noyer sauvage a été sans doute indigène dans les Balkans et les régions Himalayennes. Il paraît que l'arbre serait venu d'Asie par l'intermédiaire des Perses, et que sa culture se soit répandue aussi bien en Extrême-Orient qu'en Europe occidentale.

L'introduction du noyer en Algérie était par la région de R'haouat (les moulins) à Batna, dans le début du siècle dernier, par l'apport de noix qui sont semées dans la zone qui répond mieux aux exigences écologiques de l'espèce : altitude, lumière, chaleur, sol **(259)**.

### \* classification botanique

Selon le service de la conservation des ressources naturelles de département de l'Agriculture de l'U.S.A., le noyer blanc ou noyer commun (*J. regia*) est classé comme suit :

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Tracheobionta

**Super Division :** Spermatophyta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**S/classe :** Hamamelididae

**Ordre :** Juglandales

**Famille :** Juglandaceae

**Genre :** *Juglans* L.

**Espèce :** *Juglans regia* L.

## 2 Description botanique

*Juglans regia* est un grand arbre à feuilles caduques qui peut vivre 150 à 200 ans(262). L'arbre peut atteindre des hauteurs de 25 à 35 mètres, et un tronc qui atteint jusqu'à 2 mètres de diamètre, souvent court à large couronne. C'est une espèce de lumière, exigeant une exposition importante au soleil pour bien développer (Fig.41).

L'écorce est lisse de couleur marron avant d'être mature, gris argenté avec une texture plus rugueuse à large fissures pour les branches les plus matures (263) . Les feuilles sont de 25 jusqu'à 40 centimètres de long, disposées en alternance, imparipennées avec 5 à 9 folioles, jumelé en alternance avec une foliole terminale. Les folioles les plus grandes sont les trois au sommet, elles mesurent de 10 à 18 cm de long et 6 - 8 cm de large ; les paires des folioles basales sont les moins développée, et beaucoup plus petits, 5 à 8 cm de long (264).



**Figure 42 :** Arbre de *Juglans regia* L.



**Figure 43 :** fruits et feuilles de *J.regia*.

### 3 Répartition géographique du noyer

**Aire de sa répartition dans le monde :** Le noyer est originaire d'Asie occidentale, d'Europe sud-orientale, de Chine et des régions Himalayennes. Sa culture s'est développée

dans le sud d'Asie, en Europe Centrale, en Afrique du nord, en Amérique du nord ainsi qu'en Australie où il a été acclimaté(265)

**Aire de sa répartition en Algérie :** *Juglans regia L.* est cultivé traditionnellement, il se trouve souvent sous forme de peuplement dans différentes régions de l'Algérie constitués généralement d'hybrides naturels et sa culture n'a pas connue une grande extension car elle est confrontée à plusieurs problèmes entravant son développement (266).

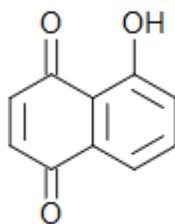
On le trouve principalement dans le massif de **l'Aurès**, les régions d'**Annaba**, de **Sétif**, la grande **Kabylie**, **Tlemcen**, **Tebessa**, **Djelfa**, **Saïda**, près de Sougueur au sud de **Tiaret**. Il se trouve presque dans toutes les régions de **Batna**. Cependant, les surfaces plantées appartiennent généralement aux privés, par conséquent, il est pratiquement absent dans les statistiques officielles algériennes (267).

#### 4 Constituants biochimiques

Plusieurs composés phénoliques isolés à partir de la plante comme le pyrogallol, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide protocatéchique, l'acide gallique, genistique, protocatechique, paracoumarique, caféique, acide chlorogénique, et néo-chloroénique, les tanins, les glansrins, adénosine, adénine pourrait fournir une base chimique de certains des avantages pour la santé (268).

La quantification des composés flavonoïdes dans la vérité de noyer cultivé en Portugal, a révélé que les flavonols étaient toujours les principaux composés, variant entre 54,8 % et 62,9 % du total des composés phénoliques, tandis que la quercétine 3-galactoside était toujours le principal constituant (269).

Parmi les constituants figure aussi les Quinones : naphthoquinones (hydrojuglone, juglone) les Huile essentielle et la Vitamine C.



**Figure 44 :** structure de juglone (5hydroxy-1,4-naphtagulone)

## 5 Activités biologique

Les extraits organiques ainsi que les extraits aqueux des feuilles, d'écorces de *J. regia* de différents pays a montré un large spectre d'activité antibactérienne contre des bactéries Gram positifs et Gram négatifs à savoir, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.... (270). De plus, *J. regia* présentait une activité antifongique contre une vaste gamme de champignons, à savoir **Candida albicans** et autres . Il a été prouvé aussi que les extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle de *J. regia*, inhibent jusqu'à 95% du virus de mosaïque de tabac. Alors que l'extrait méthanolique inhibe le virus Sindbis à une concentration minimale de 1,5 µg/ml (271).

Le potentiel antioxydant des extraits d'acétate d'éthyle, butanol, méthanol et d'éther de pétrole de *J. regia* a été mesuré par différentes méthodes ; dont tous les extraits ont montré une forte activité antioxydants (272).

## 6 Utilisation traditionnelle

La plante *juglans regia.L* est utilisée comme un remède d'actualité à l'inflammation dermique et la transpiration excessive des mains et des pieds. C'est aussi un remède domestique commun au traitement d'eczéma chronique et scrofule.

traditionnelles mondiales comme antimicrobien, anthelminthique, l'astringent, kératolytique, anti diarrhéique, hypoglycémique, dépuratoire, tonifiant, carminative et pour le traitement de sinusite, le froid et le mal d'estomac (270).

Une étude réalisée en 2004, par l'institut des recherches fondamentales en déficiences intellectuelles (OMRDD) a révélé qu'un extrait méthanolique de *Jugulans regia* était capables

d'inhiber et dé-fibrillaire la protéine  $\beta$  amyloïde fibrillaire, le principal composant de plaques séniles dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (273).

Les extraits de benzène, de méthanol et d'éthanol de l'écorce de *J. regia* sont dotés d'une importants activité anthelminthique contre les vers de terre *Pheretima posthuma*, comparable à celle du médicament standard prescrit dans se genre de cas le citrate de pipérazine.

L'écorce est utilisée comme **miswaks** pour le nettoyage de dents. Dans Le Népal la pâte d'écorce est utile dans l'arthrite, des maladies de peau, le mal de dents et la croissance de cheveux. Le manteau de graine est utilisé pour guérir des blessures.

De nombreuses études montrent que les extraits de *J. regia* présentent différentes autres activités comme l'activité anti-inflammatoire, antidépressif, hypotriglycéridémique, et hépatoprotective (274).

## Bibliographie

1. Kim H-S. Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):37-9.
2. Gupta A, Naranawal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences*. 2012;1(1):8-26.
3. Wong SK, Lim YY, Chan EWC. Antioxidant properties of Hibiscus: Species variation, altitudinal change, coastal influence and floral colour change. *Journal of Tropical Forest Science*. 2009:307-15.
4. Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, Deecaraman M, Kumar RM, Aravindan P, et al. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(8).
5. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*. 2009;114(4):1198-205.
6. GÜLÇin I, Alici HA, Cesur M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;53(3):281-5.
7. Pianalto KM, Alspaugh JA. New horizons in antifungal therapy. *Journal of Fungi*. 2016;2(4):26.
8. Kaddem S. *Les plantes médicinales en Algérie*, Ed. Bouchène, Oued Zenati, Algérie. 1990.
9. Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural product reports*. 2007;24(6):1225-44.
10. Qaddoori AG. *Antimicrobial evaluation of selected medicinal plants using molecular approach: University of Salford (United Kingdom)*; 2016.
11. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*. 2004;67(12):2141-53.
12. Valecha N, Looareesuwan S, Martensson A, Mohammed Abdulla S, Krudsood S, Tangpukdee N, et al. Arterolane, a new synthetic trioxolane for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a phase II, multicenter, randomized, dose-finding clinical trial. *Clinical infectious diseases*. 2010;51(6):684-91.
13. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(3):206-20.
14. Butler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural product reports*. 2005;22(2):162-95.
15. Bouzabata A. *Les médicaments à base de plantes en Algérie: réglementation et enregistrement*. *Phytothérapie*. 2017;15(6):401-8.
16. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2015;2(3):251-86.
17. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*. 2015;33(8):1582-614.
18. Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell*. 2007;130(5):769-74.
19. Bernardini S, Tiezzi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural product research*. 2018;32(16):1926-50.
20. Miller JS. The discovery of medicines from plants: a current biological perspective<sup>1</sup>. *Economic Botany*. 2011;65(4):396-407.
21. Yahia Y, Elfalleh W, Tlili N, Hannachi H, Loumerem M, Ferchichi A. Phytochemical contents and antioxidant activities of some Tunisian faba bean populations. *Roman Agric Res*. 2013;30:65-74.
22. Leonti M. The future is written: impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134(3):542-55.

23. Saslis-Lagoudakis CH, Savolainen V, Williamson EM, Forest F, Wagstaff SJ, Baral SR, et al. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(39):15835-40.
24. Chen L, Morrow JK, Tran HT, Phatak SS, Du-Cuny L, Zhang S. From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(9):1217.
25. Erb M, Kliebenstein DJ. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant physiology*. 2020;184(1):39-52.
26. Small E, Catling PM. *Les cultures médicinales canadiennes*: NRC Research Press; 2000.
27. Degenhardt DC, Lincoln DE. Volatile emissions from an odorous plant in response to herbivory and methyl jasmonate exposure. *Journal of chemical ecology*. 2006;32(4):725-43.
28. Judd WSC, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J. . « Secondary Plant Compounds Plant systematics: a phylogenetic approach»  
(Chap 4, Structural and Biochemical Characters) Second Edition, Sinauer Associates.États-Unis., 2002, 576 p.
29. Dewick P. *Front Matter and Index. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 2001.
30. Mahmoud SS, Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant science*. 2002;7(8):366-73.
31. Lincoln T, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology Fourth Edition Sinauer Associates, Inc Capítulo*. 2006;13:125.
32. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie–plantes médicinales–3ème Ed Techniques et documentations*. Paris pp. 1999:227-310.
33. Lois R, Buchanan BB. Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an Arabidopsis mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta*. 1994;194(4):504-9.
34. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21(10):1374.
35. Yao LH, Jiang Y-M, Shi J, Tomas-Barberan F, Datta N, Singanusong R, et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*. 2004;59(3):113-22.
36. Macheix J-J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique: PPUR presses polytechniques*; 2005.
37. Bragazza L, Freeman C. High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment*. 2007;377(2-3):439-43.
38. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11):317-33.
39. Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*. 2009;47(8):2083-91.
40. Huang W-Y, Cai Y-Z, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*. 2009;62(1):1-20.
41. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 2006;99(1):191-203.
42. Paterson I, Anderson EA. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*. 2005;310(5747):451-3.
43. Galati G, O'brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free radical biology and medicine*. 2004;37(3):287-303.
44. Harborne JB, Tomás-Barberán FA, Williams CA, Gil MI. A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*. 1986;25(12):2811-6.

45. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008;78(2):189-99.
46. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, et al. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial crops and products*. 2010;32(3):639-49.
47. Hoffmann E, Muetzel S, Becker K. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. *British journal of nutrition*. 2002;87(5):421-6.
48. Jean B. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.): Lavoisier; 2009.
49. Wei A, Shibamoto T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(12):7218-25.
50. Donelian A, Carlson L, Lopes T, Machado R. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub> and by steam distillation. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2009;48(1):15-20.
51. Hopkins WG. *Physiologie végétale: De Boeck Supérieur*; 2003.
52. Eikani MH, Golmohammad F, Rowshanzamir S. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Food Engineering*. 2007;80(2):735-40.
53. Paduch R, Kandefor-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2007;55(5):315-27.
54. Bruneton J. *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales*. 1999.
55. Cushnie TT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;44(5):377-86.
56. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *International journal of molecular sciences*. 2007;8(9):950-88.
57. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(S2):S310-S29.
58. Khenaka K. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. 2011.
59. J G. *Huiles Essentielles. Documentaire: Constantes Physico-Chimiques Vol Papier (1996);. . Dossier : K345. Base.*
60. Padrini F, Lucheroni MT. *Le grand livre des huiles essentielles: Éditions de Vecchi*; 2003.
61. Sihvonon M, Järvenpää E, Hietaniemi V, Huopalahti R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(6-7):217-22.
62. Belaiche P. *L'aromatogramme : traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1M S A Editeur, Paris, 204p.* 1979.
63. Cai Y-Z, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*. 2006;78(25):2872-88.
64. Hohtola A. *Bioactive compounds from northern plants. Bio-Farms for Nutraceuticals: Springer*; 2010. p. 99-109.
65. Theis N, Lerdau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*. 2003;164(S3):S93-S102.
66. León-Méndez G, Pájaro-Castro N, Pájaro-Castro E, Torrenegra-Alarcón M, Herrera-Barros A. Essential oils as a source of bioactive molecules. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2019;48(1):80-93.
67. Mehdizadeh L, Moghaddam M. *Essential oils: Biological activity and therapeutic potential. Therapeutic, probiotic, and unconventional foods: Elsevier*; 2018. p. 167-79.

68. Giacometti J, Kovačević DB, Putnik P, Gabrić D, Bilušić T, Krešić G, et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food research international*. 2018;113:245-62.
69. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*. 2010;4(2):104-11.
70. Krause J, Tobin G. Discovery, development, and regulation of natural products. Using old solutions to new problems-natural drug discovery in the 21st century. 2013;1:1-35.
71. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif K, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*. 2013;117(4):426-36.
72. Butler MS, Robertson AA, Cooper MA. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural product reports*. 2014;31(11):1612-61.
73. Smith RM. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography A*. 2003;1000(1-2):3-27.
74. Koçak E, Pazır F. Effect of Extraction Methods on Bioactive Compounds of Plant Origin. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 2018;6(6):663-75.
75. Pavlić B, Šojić B, Teslić N, Putnik P, Kovačević DB. Extraction of bioactive compounds and essential oils from herbs using green technologies. *Aromatic Herbs in Food: Elsevier*; 2021. p. 233-62.
76. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*. 2017;6(4):42.
77. Bourgou S, Beji RS, Medini F, Ksouri R. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia. *Journal of New Sciences*. 2016;28.
78. Silva L, Nelson D, Drummond M, Dufossé L, Glória M. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*. 2005;38(8-9):1087-96.
79. Soxhlet Fv. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytechnisches Journal*. 1879;232(5):461-5.
80. <https://www.berkem.com/fr/expertise/extraction-vegetale>. [
81. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:100-9.
82. Stalikas C, Fiamegos Y, Sakkas V, Albanis T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(2):175-89.
83. Letellier M, Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*. 1999;27(3):259-70.
84. Romdhane M, Gourdon C, Casamatta G. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics*. 1995;33(3):221-7.
85. Kaufmann B, Christen P, Veuthey JL. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2001;12(5):327-31.
86. Kwon J-H, Belanger JM, Pare JJ, Yaylayan VA. Application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*. 2003;36(5):491-8.
87. Hurren D. Supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub>. *Filtration and Separation*. 1999;3(36):25-7.
88. Lang Q, Wai CM. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*. 2001;53(4):771-82.
89. Brachet A, Rudaz S, Mateus L, Christen P, Veuthey JL. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*. 2001;24(10-11):865-73.

90. Kohen R, Nyska A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*. 2002;30(6):620-50.
91. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*. 1982;1(8):945-51.
92. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):1019-26.
93. Group ACPS. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. *Annals of epidemiology*. 1994;4(1):1-10.
94. Holevinsky KO, Nelson DJ. Simultaneous detection of free radical release and membrane current during phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(14):8328-36.
95. Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 2003;108(10):863-32.
96. Migdal C, Serres M. Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Sciences: M/S*. 2011;27(4):405-12.
97. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*. 2007;74(7):636-43.
98. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical care*. 2006;10(1):1-8.
99. Beaudoux J-L, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, Legrand A, editors. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Annales pharmaceutiques françaises*; 2006: Elsevier.
100. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*. 2008;585(2-3):325-37.
101. Peyrot F. Réactions des espèces réactives de l'azote dérivées du monoxyde d'azote avec la mélatonine et quelques indoles apparentés. Implications biologiques: Université Paris XI; 2004.
102. Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 2004;2(1):3-6.
103. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
104. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;884(1):19-40.
105. SOUILEM A, KADRI Y. Étude de la phytothérapie traditionnelle dans la région de Tsabit et d'Adrar: Université Ahmed Draia-Adrar; 2018.
106. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872-9.
107. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*. 2016;24(5):547-53.
108. Benbrinis S. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus* 2018.
109. Beddou F. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Coss & Dur. 2015.
110. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1990;280(1):1-8.
111. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular research*. 2007;73(2):341-7.
112. Dontha S. A review on antioxidant methods. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;9(2):14-32.
113. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.

114. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*. 2012;2012.
115. Yorimitsu M, Muranaka S, Sato EF, Fujita H, Abe K, Yasuda T, et al. Role of alpha-tocopherol in the regulation of mitochondrial permeability transition. *Physiological chemistry and physics and medical NMR*. 2004;36(2):95-107.
116. Béguel J-P, Huvet A, Quillien V, Lambert C, Fabioux C. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2013;157(1):63-71.
117. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002;13(10):572-84.
118. Couliadiati T, Millogo-Kone H, Lamien-Meda A, Lamien C, Lompo M, Kiendrébéogo M, et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Combretum niroense* Aubrév. ex Keay (Combretaceae). *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2009;12(3):264-9.
119. Nkhili E-z, editor *Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant*2009: Avignon.
120. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*. 1996;20(7):933-56.
121. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*. 1993;215(2):213-9.
122. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231-46.
123. Shahidi F. *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications: The American Oil Chemists Society*; 1997.
124. Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(4):823-37.
125. Vuković-Gačić B, Nikčević S, Berić-Bjedov T, Knežević-Vukčević J, Simić D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and chemical toxicology*. 2006;44(10):1730-8.
126. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*. 2014;79(7):R1231-R49.
127. Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, Sant'Ana AS, Khaneghah AM, Gavahian M, et al. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*. 2018;113:156-66.
128. Sharma A, Cannoo DS. A comparative study of effects of extraction solvents/techniques on percentage yield, polyphenolic composition, and antioxidant potential of various extracts obtained from stems of *Nepeta leucophylla*: RP-HPLC-DAD assessment of its polyphenolic constituents. *Journal of food biochemistry*. 2017;41(2):e12337.
129. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
130. Becker S, Dailey LA, Soukup JM, Grambow SC, Devlin RB, Huang Y-CT. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environmental health perspectives*. 2005;113(8):1032-8.
131. Alam MN, Bristi NJ, Rafiqzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*. 2013;21(2):143-52.
132. Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Bazzaz BSF. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):1-28.
133. Lewis RE, editor *Current concepts in antifungal pharmacology*. *Mayo Clinic Proceedings*; 2011: Elsevier.

134. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 2009;23(4):525-30.
135. Maskarinec SA, Johnson MD, Perfect JR. Genetic susceptibility to fungal infections: what is in the genes? *Current clinical microbiology reports*. 2016;3(2):81-91.
136. Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2006;2(11):602-10.
137. ABDESSALEM Hayat BC. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes locales envers *Candida albicans* responsable d'infection buccales et d'origine dentaire.
138. Chambard F. Les candidoses cutanéomuqueuses: physiopathologie et conseils à l'officine. Faculté de pharmacie de Grenoble. 2009.
139. Agban A, Gbogbo KA, Hoekou YP, Atchou K, Tchacondo T, Batawila K, et al. Évaluation de l'activité antifongique des extraits de *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh.(Fabaceae) sur *Candida albicans*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2013;7(3):1041-7.
140. Ezekowitz R, Williams D, Koziel H, Armstrong M, Warner A, Richards F, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 1991;351(6322):155-8.
141. Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis L, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*. 1995;63(3):847-52.
142. Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert J-C, Balard P, et al. PPAR $\gamma$  promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity*. 2003;19(3):329-39.
143. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate medical journal*. 2002;78(922):455-9.
144. Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infection and immunity*. 1997;65(3):1077-82.
145. Clohisy DR, Bar-Shavit Z, Chappel J, Teitelbaum S. 1, 25-Dihydroxyvitamin D $_3$  modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(33):15922-9.
146. Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RAB. Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*. 1998;64(1):108-13.
147. Coste A, Linas MD, Cassaing S, Bernad J, Chalmeton S, Séguéla JP, et al. A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon- $\gamma$ -and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49(5):731-40.
148. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological reviews*. 2004;201(1):139-55.
149. Emami E. Relation entre la commutation phénotypique de *Candida albicans* et la stomatite prothétique. 2006.
150. Courjol F. Impact de l'expression des  $\beta$ -1, 2 mannosides pariétaux de *Candida albicans* sur la virulence: Université du Droit et de la Santé-Lille II; 2014.
151. Belmadani A. Effets de la dermaseptine-S 1 sur la croissance, la transformation, la formation de biofilms et l'expression de certains gènes de virulence de *C. albicans*. 2018.
152. Maisch PA, Calderone RA. Adherence of *Candida albicans* to a fibrin-platelet matrix formed in vitro. *Infection and Immunity*. 1980;27(2):650-6.
153. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*. 2016;34(4):487-94.

154. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 1993;26(6):1069-89.
155. Schmidt-Westhausen A, Bendick C, Reichart P, Samaranayake L. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*. 2004;47(9-10):435-41.
156. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):15.
157. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(2):175-9.
158. Maheronnaghsh M, Tolouei S, Dehghan P, Chadeganipour M, Yazdi M. Identification of *Candida* species in patients with oral lesion undergoing chemotherapy along with minimum inhibitory concentration to fluconazole. *Advanced biomedical research*. 2016;5.
159. Sitheeque M, Samaranayake L. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2003;14(4):253-67.
160. McCullough M, Savage N. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Australian dental journal*. 2005;50:S36-S9.
161. Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, et al. Active surveillance of candidemia, Australia. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(10):1508.
162. Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010: incidence, létalité et tendances. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 2013(12-13):109-14.
163. Debré P, Forster E. Louis Pasteur 1994. Paris Éditions Flammarion. 1874.
164. Faber HK, Dickey LB. The treatment of thrush with gentian violet. *Journal of the American Medical Association*. 1925;85(12):900-1.
165. Huang NN, Sarria A, High RH. Therapeutic evaluation of nystatin and amphotericin in oral moniliasis in infants and children. *Therapeutic evaluation of nystatin and amphotericin in oral moniliasis in infants and children*. 1958.
166. Mansour A, Gelfand EW. A new approach to the use of antifungal agents in infants with persistent oral candidiasis. *Journal of Pediatrics*. 1981;98(1):161-2.
167. Alban J, Groel J. Amphotericin B oral suspension in the treatment of thrush. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*. 1970;12(8):479-84.
168. Scherrer AM, Motti R, Weckerle CS. Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, Southern Italy). *Journal of ethnopharmacology*. 2005;97(1):129-43.
169. Cannas S, Moliccotti P, Usai D, Maxia A, Zanetti S. Antifungal, anti-biofilm and adhesion activity of the essential oil of *Myrtus communis* L. against *Candida* species. *Natural Product Research*. 2014;28(23):2173-7.
170. Sardi JCO, Almeida AMF, Giannini MJSM. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—a brief review. *Archives of oral biology*. 2011;56(10):951-9.
171. Michel AP, Mittapalli O, Mian MR, Sudaric A. Evolution of soybean aphid biotypes: understanding and managing virulence to host-plant resistance. *Soybean-molecular aspects of breeding InTech*, New York. 2011:355-72.
172. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 299: Elsevier; 1999. p. 152-78.
173. Boughendjioua H. Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de citrus limon, cinnamomum zeylanicum et thymus numidicus Doctorat en sciences spécialité: Biologie végétale Université Badji Mokhtar de Annaba. 2014;144:125-30.
174. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J sci technol*. 2004;26(2):211-9.

175. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
176. Yıldırım A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(8):4083-9.
177. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 1986;44(6):307-15.
178. YAOVI AB, DOUGNON JT, BOKO CK, SESSOU P, DOSSA F. Phytochimie et activités antibactériennes des extraits de quelques plantes médicinales sur une souche de *Escherichia coli* isolée chez les poulets. *EPAC/UAC*; 2017.
179. Moura P, Prado GHcd, Meireles MAdA, Pereira C. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2012;62:116-22.
180. Pan X, Niu G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2003;42(2):129-33.
181. Perry NB, Anderson RE, Brennan NJ, Douglas MH, Heaney AJ, McGimpsey JA, et al. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999;47(5):2048-54.
182. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of food science*. 2009;74(7):M358-M63.
183. Miralles DG, Jiménez C, Jung M, Michel D, Ershadi A, McCabe M, et al. The WACMOS-ET project—Part 2: Evaluation of global terrestrial evaporation data sets. *Hydrology and Earth System Sciences*. 2016;20(2):823-42.
184. Ji X-d, Pu Q-l, Garraffo HM, Pannell LK. The essential oil of the leaves of *Psidium guajava* L. *Journal of Essential Oil Research*. 1991;3(3):187-9.
185. Wang L, Wu Y, Huang T, Shi K, Wu Z. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Psidium guajava* L. Leaves from different geographic regions in China. *Chemistry & Biodiversity*. 2017;14(9):e1700114.
186. Ogunwande IA, Olawore NO, Adeleke KA, Ekundayo O, Koenig WA. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(2):136-8.
187. Satyal P, Paudel P, Lamichhane B, Setzer WN. Leaf essential oil composition and bioactivity of *Psidium guajava* from Kathmandu, Nepal. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2015;3(2):11-4.
188. Khadhri A, El Mokni R, Almeida C, Nogueira J, Araújo MEM. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 2014;52:29-31.
189. Rajabi Z, Ebrahimi M, Farajpour M, Mirza M, Ramshini H. Compositions and yield variation of essential oils among and within nine *Salvia* species from various areas of Iran. *Industrial Crops and Products*. 2014;61:233-9.
190. Benyelles B, Allali H, Dib MEA, Djabou N, Paolini J, Costa J. Chemical composition variability of essential oils of *Daucus gracilis* Steinh. from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*. 2017;14(6):e1600490.
191. Sangwan N, Farooqi A, Shabih F, Sangwan R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*. 2001;34(1):3-21.
192. Yezza S, Djedjai R. Analyse physicochimique et activités biologiques des huiles essentielles de quelques épices: Master thesis, Faculty of Nature and Life Sciences, Kasdi Merbah University ...; 2016.
193. Yamna ANE. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'HUILE EXTRAITE DU ROSMARINUS OFFICINALIS. L 2014.
194. Boyle W. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*. 1955;66(1):25-8.
195. FERNANDEZ X, CABROL-BASS D. Analyse des arômes. 2007.

196. Rhayour K. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. 2002.
197. da Silva JD, Luz AIR, da Silva MHL, Andrade EHA, Zoghbi MdGB, Maia JGS. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(3):240-3.
198. Launay A. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales—cinquième édition J. Bruneton, Éditions Lavoisier Tec & Doc, 2016, 1 488 p, 195, 00€. *Phytothérapie*. 2017;15(5):316.
199. Bonnaille C, Salacs M, Vassiliova E, Saykova I. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*. 2012;7:35-45.
200. Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food chemistry*. 2007;103(2):381-8.
201. Tohma HS, Gulçin I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *International Journal of Food Properties*. 2010;13(4):657-71.
202. Rock E. Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra–CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments. 2003;63122:37-42.
203. Ramadan MF. Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2010;5(1):47-50.
204. Seo J, Lee S, Elam ML, Johnson SA, Kang J, Arjmandi BH. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Science & Nutrition*. 2014;2(2):174-80.
205. Morais-Braga MF, Carneiro JN, Machado AJ, Sales DL, Dos Santos AT, Boligon AA, et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(2):302-13.
206. Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Hamidinia A, Bekhradnia A. Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoids content of *Parrotia persica* Mey. *Pharmacologyonline*. 2008;2(9):560-7.
207. Park HJ, Cha HC. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean Journal of Biological Sciences*. 2003;7(4):327-30.
208. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, et al. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 2008;331(5):372-9.
209. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 2010;15(12):8813-26.
210. Koffi E, Sea T, Dodehe Y, Soro S. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)*. 2010;5(3):550-8.
211. Jayaprakasha GK, Singh R, Sakariah K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*. 2001;73(3):285-90.
212. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*. 2006;97(4):654-60.
213. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2010;3(4):228-37.
214. Shah BB, Mehta AA. In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. *Asian J Pharm Pharmacol*. 2018;4:883-7.
215. Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1524-8.
216. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food chemistry*. 2004;84(4):519-25.

217. Candan F, Sokmen A, Daferera D, Donmez E. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey.
218. Bhatia K, Ahmad F, Rashid H, Raisuddin S. Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. *Food and chemical toxicology*. 2008;46(11):3368-74.
219. Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*. 2009;112(4):874-9.
220. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(2):397-402.
221. Dziedzic SZ, Hudson BJ. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*. 1983;12(3):205-12.
222. Amarowicz R, Pegg R, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil J. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*. 2004;84(4):551-62.
223. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007;12(7):1496-547.
224. Mirzaalizadeh B, Sharif M, Daryani A, Ebrahimzadeh MA, Zargari M, Sarvi S, et al. Effects of Aloe vera and Eucalyptus methanolic extracts on experimental toxoplasmosis in vitro and in vivo. *Experimental parasitology*. 2018;192:6-11.
225. Gülçin İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu Öİ. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*. 2003;83(3):371-82.
226. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*. 2005;90(3):333-40.
227. Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(9):3890-7.
228. Arimboor R, Arumughan C. HPLC-DAD-MS/MS profiling of antioxidant flavonoid glycosides in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012;63(6):730-8.
229. Athamena S. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique: Université de Batna 2; 2009.
230. Sytykiewicz H, Chrzanowski G, Czerniewicz P, Leszczyński B, Sprawka I, Krzyzanowski R, et al. Antifungal activity of *Juglans regia* (L.) leaf extracts against *Candida albicans* isolates. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2015;24(3).
231. Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé R. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de mycologie medicale*. 2017;27(1):1-19.
232. Patterson TF, Revankar SG, Kirkpatrick WR, Dib O, Fothergill AW, Redding SW, et al. Simple method for detecting fluconazole-resistant yeasts with chromogenic agar. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(7):1794-7.
233. Tasiu M, Abdulmumin Y, Abdulmumin T, Murtala M, Shehu A, Abubakar A, et al. Antimicrobial Evaluation of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles using Aqueous Peel Extracts of Guava (*Psidium guajava*) and Pumpkin (*cucurbita pepo*).
234. Serea D, Râpeanu G, Constantin OE, Bahrim GE, Stănciuc N, Croitoru C. ULTRASOUND AND ENZYMATIc ASSISTED EXTRACTIONS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FOUND IN RED GRAPE SKINS BĂBEASCĂ NEAGRĂ (*VITIS VINIFERA*) VARIETY. *The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI Food Technology*. 2021;45(1):9-25.

235. Noumi E, Snoussi M, Trabelsi N, Hajlaoui H, Ksouri R, Valentin E, et al. Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(17):4138-46.
236. Alkhawajah AM. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. *The American journal of Chinese medicine*. 1997;25(02):175-80.
237. Clark AM, Jurgens TM, Hufford CD. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*. 1990;4(1):11-4.
238. Wianowska D, Garbaczewska S, Cieniecka-Roslonkiewicz A, Dawidowicz A, Jankowska A. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. *Microbial Pathogenesis*. 2016;100:263-7.
239. Braga L, Leite AA, Xavier KG, Takahashi J, Bemquerer M, Chartone-Souza E, et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of microbiology*. 2005;51(7):541-7.
240. Souza ELd, Stamford TLM, Lima EdO, Trajano VN, Barbosa Filho JM. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005;48(4):549-58.
241. Qin X-J, Yu Q, Yan H, Khan A, Feng M-Y, Li P-P, et al. Meroterpenoids with antitumor activities from guava (*Psidium guajava*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017;65(24):4993-9.
242. Muñoz JE, Rossi DC, Jabes DL, Barbosa DA, Cunha FF, Nunes LR, et al. In Vitro and In Vivo Inhibitory Activity of Limonene against Different Isolates of *Candida* spp. *Journal of Fungi*. 2020;6(3):183.
243. Thakre A, Zore G, Kodgire S, Kazi R, Mulange S, Patil R, et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical mycology*. 2018;56(5):565-78.
244. Sarikurkcu C, Ozer MS, Eskici M, Tepe B, Can Ş, Mete E. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(7):1801-5.
245. Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum LL, et al. *World checklist of Myrtaceae*: Royal Botanic Gardens; 2008.
246. Dakappa SS, Adhikari R, Timilsina SS, Sajjekhan S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2013;3(2).
247. Metwally A, Omar A, Ghazy N, Harraz F, El Sohafy S. Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*. 2011;3(21):89-104.
248. Routhier M-C. Caractéristiques de germination de sept espèces de Myrtaceae d'Argentine: effets d'une stratification au froid, de la lumière et de la dessiccation des graines: Library and Archives Canada= Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa; 2008.
249. Foss SL. Evaluation of resistance to *Selenothrips rubrocinctus* Giard among various *Psidium* genotypes based on some fruit parameters: University of Hawai'i at Manoa; 1980.
250. Van Den Abeele M, Vandenput R. *Starchy crops*. *Starchy crops*. 1951.
251. Yadav AK, Singh S, Dhyan D, Ahuja PS. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian journal of plant science*. 2011;91(1):1-27.
252. Vijaya Anand A, Velayuthaprabhu S, Rengarajan RL, Sampathkumar P, Radhakrishnan R. Bioactive compounds of guava (*Psidium guajava* L.). *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*. 2020:503-27.
253. Bezerra JDP, Machado AR, Firmino AL, Rosado AWC, Souza CAFd, Souza-Motta CMd, et al. Mycological diversity description I. *Acta Botanica Brasilica*. 2018;32:656-66.
254. SOMMAIRE A, ANNONCES P. John Libbey Eurotext-Bulletin du Cancer-Actualités en can... <http://www.jle.com.gate2.inist.fr/fr/revues/bdc/e-docs/actualit>.
255. Pandian RS, Jayalakshmi M. HPLC analysis of water soluble vitamin B in leaves *Psidium guajava*. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;5(1):69-72.

256. Sugi M, Noda A, Sato N. Influence of the global warming on tropical cyclone climatology: An experiment with the JMA global model. *Journal of the Meteorological Society of Japan Ser II*. 2002;80(2):249-72.
257. Mathon C. Caractérisation, identification et quantification de biomarqueurs et principes actifs dans des compléments alimentaires ou des phytopréparations: University of Geneva; 2014.
258. Argueta A, Cano Asseleih LM, Rodarte García ME. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana 1994.
259. CHADDA D. Influence des matières organiques (feuilles, châtons et racines) du noyer (*Juglans regia* L.) sur le comportement de jeunes plants de pommier (*Malus domestica* Borkh) dans la région de R'haouat (Hidoussa)(Belezma): Université de Batna 1-Hadj Lakhder; 2008.
260. Bouby L, Pradat B, Ruas M-P. Les restes de fruits dans les dépôts archéologiques du Midi de la France (Ve-XVIe siècles). *Archéologie du Midi médiéval*. 2005;23(1):145-93.
261. Depoërs P, Ledoux F, Meurin P. De la lumière à la guérison: la phytothérapie entre science et tradition: Amyris; 2008.
262. Mohni C, Pelleri F, Hemery GE. The modern silviculture of *Juglans regia* L.: a literature review. *Die Bodenkultur*. 2009;60(3):19-32.
263. Sabatier S. Variabilité morphologique et architecturale de deux espèces de noyers: "*Juglans regia* L.", "*Juglans nigra* L." et de deux noyers hybrides interspécifiques: Montpellier 2; 1999.
264. Shah TI, Sharma E, Ahmad G. *Juglans regia* Linn: A phytopharmacological review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014:264-73.
265. Boukhari F. Extraction et analyse de l'huile essentielle et des métabolites secondaires lourds de *Juglans regia* L." étude pharmacologique" 2017.
266. Mansour DH. evaluation chimique et activite antidermatophyte de quelques plantes medicinales d'algerie.
267. Benahmed-Djilali A, Chemoul T, Kal S, Nabiev M, Besombes C. Propriétés d'une pommade antibactérienne formulée à base de saponines extraites des feuilles de noyer. *Phytothérapie*. 2018;16(S1):S245-S53.
268. Luczak S, Swiatek L, Zadernowski R. Phenolic acids in leaves and pericarp of walnut, *Juglans regia*. *Acta Pol Pharm*. 1989;46:494-9.
269. Sousa A, Ferreira IC, Calhelha R, Andrade PB, Valentão P, Seabra R, et al. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2006;14(24):8533-8.
270. ÇİTOĞLU GS, ALTANLAR N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2003;32(3):159-63.
271. Mouhajir F, Hudson J, Rejdali M, Towers G. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. *Pharmaceutical biology*. 2001;39(5):364-74.
272. Almeida IF, Fernandes E, Lima JL, Costa PC, Bahia MF. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry*. 2008;106(3):1014-20.
273. Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food chemistry*. 2009;113(1):160-5.
274. Taha NA, Al-wadaan MA. Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review. *African Journal of Microbiology Research*. 2011;5(32):5796-805.

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle et la découverte de nouvelles molécules actives à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude chimique des extraits et d'huile essentielle de *Juglance regia* et *Psidium guajava* ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydantes et antifongiques. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la technique spectrophotométrique par le réactif du Folin-Ciocalciu. L'activité antioxydante a été déterminée, in vitro par le test du piégeage du radical libre DPPH et la méthode réduction de fer (FRAP). En outre, la détermination de l'activité antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des micro-dilutions en milieu liquide. L'étude de la composition chimique d'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Psidium guajava* a été réalisée par la GC-MS.

Les résultats obtenus ont montré une remarquable richesse des différents extraits en polyphénols totaux dont la teneur varie entre 188 et 285 mg EAG/g d'extrait. L'analyse chimique d'huile essentielle extraite de la partie aérienne *Psidium guajava* a permis d'identifier 78 composés représentant 94.2% de la composition totale d'huile essentielle dont le Limonène était le composé majoritaire avec un pourcentage de 50.65%.

Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits ont une importante activité de piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup> (valeurs des IC50 varient entre 0.011mg/ml et 0,02 mg/ml) comparable à celle des antioxydants de synthèse acide ascorbique et le BHT.

Les résultats de l'étude de l'activité antifongique ont montré que les extraits d'écorce de *Juglans regia* étaient actifs sur les deux souches de levures *C.albicans* avec des CMI de 0.078 mg/ml.

**Mots clés :** *Juglans regia* , *Psidium guajava* , Huile essentielle, polyphénols, antioxydants, antifongiques, *Candida albicans*.

### Abstract

In the context of the valorization of medicinal plants of the traditional pharmacopoeia and the discovery of new active molecules from natural sources, we were interested in this work in the chemical study of extracts and essential oil of *Juglance regia* and *Psidium guajava* as well as in the evaluation of antioxidant and antifungal activities. The content of total polyphenols was determined by the spectrophotometric technique by the Folin-Ciocalciu reagent. The antioxidant activity was determined, in vitro, by the DPPH free radical scavenging test and the iron reduction method (FRAP). In addition, the determination of the antifungal activity was carried out by the disc diffusion method and the micro-dilution method in liquid medium. The study of the chemical composition of essential oil extracted from the aerial part of *Psidium guajava* was performed by GC-MS.

The results obtained showed a remarkable richness of the various extracts in total polyphenols whose content varies between 188 and 285 mg EAG/g of extract. The chemical analysis of essential oil extracted from the aerial part *Psidium guajava* allowed to identify 78 compounds representing 94.2% of the total composition of essential oil of which Limonene was the major compound with a percentage of 50.65%.

The antioxidant activity evaluation methods show that all extracts have a significant free radical scavenging activity DPPH<sup>\*</sup> (IC50 values vary between 0.011mg/ml and 0.02 mg/ml) comparable to that of synthetic antioxidants ascorbic acid and BHT.

The results of the antifungal activity study showed that *Juglans regia* bark extracts were active on both *C.albicans* yeast strains with MICs of 0.078 mg/ml.

**Key words:** *Juglans regia* , *Psidium guajava* , Essential oil, polyphenols, antioxidants, antifungal, *Candida albicans*.

### الملخص

في سياق تقييم النباتات الطبية للأدوية التقليدية واكتشاف جزيئات نشطة جديدة من المصادر الطبيعية، اهتمنا في هذا العمل بالدراسة الكيميائية للمستخلصات والزيوت الأساسية لـ *Juglance regia* و *Psidium Guajava* وكذلك بتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والفطريات. تم تحديد المحتوى الكلي للـ polyphenols من خلال تقنية القياس الطيفي بواسطة كاشف Folin- Ciocalciu. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة في المختبر من خلال اختبار احتجاز الجذور الحرة DPPH وطريقة تقليل الحديد (FRAP). بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد النشاط المضاد للفطريات بطريقة الانتشار على الأقراص وطريقة التخفيف الدقيق في الوسط السائل. وأجريت دراسة التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخرج من الجزء الجوي لـ *Psidium guajava* بواسطة GC-MS.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ثراء ملحوظاً للمستخلصات المختلفة في إجمالي الـ polyphenols الذي يتراوح محتواه بين 188 و 285 mg EAG/ من المستخلص. أتاح التحليل الكيميائي للزيت العطري المستخرج من الجزء الجوي *Psidium guajava* تحديد 78 مركباً تمثل 94.2% من التركيب الكلي للزيت العطري الذي كان Limonène هو المركب الأكبر منه بنسبة 50.65%.

تُظهر طرق تقييم النشاط المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات لها نشاط محاصرة مهم لـ DPPH الجذري الحر (تختلف قيم IC50 بين 0.011 و 0.02 mg/ml) مقارنة بمضادات الأكسدة في تخليق حمض الأسكوربيك و BHT.

أظهرت نتائج دراسة النشاط المضاد للفطريات أن مستخلصات لحاء *Juglans regia* كانت نشطة على كل من سلالات خميرة *C.albicans* مع قيم CMI تبلغ 0.078 mg/ml.

**الكلمات المفتاحية :** *Psidium guajava* ، *Juglans regia* ، الزيت الأساسي، polyphenols ، مضادات الأكسدة، مضادات الفطريات، *C.albicans*