

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE DE CONSTANTINE 1
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**

**THESE PRESENTEE EN VUE
DE L'OBTENTION DU DOCTORAT EN SCIENCES**

**EVALUATION CHIMIQUE ET ACTIVITE
ANTIDERMATOPHYTE DE QUELQUES PLANTES
MEDICINALES D'ALGERIE**

Présentée par

Mansour-Djaalab Hadria

Membres du jury :

BRERHI El Hacene	Président	Pr. Univ. Constantine 1
KHELIFI Douadi	Examineur	Pr. Univ. Constantine 1
BELKHIRI Abdelmalek	Examineur	Pr. Univ. Constantine3
MELIZI Mohamed	Examineur	Pr. Univ. Batna
DJEBBAR Mohamed Réda	Examineur	Pr. Univ. Annaba
HAMDY PACHA Youcef	Rapporteur	Pr. ENV. El Harrach Alger

Année universitaire 2013-2014

A la mémoire de mes parents

A Hamid

A Esma Imen et Hanane

A ma petite Neïla

A tous les miens

A foulla

Avec qui j'ai partagé les moments les plus durs et les plus beaux. Au nom de notre amitié et des liens fraternels qui nous unissent

REMERCIEMENTS

Au Professeur Bererhi El Hacene. Directeur de l'institut des Sciences Vétérinaires Université Constantine1. Pour nous avoir encouragé jusqu'à l'aboutissement de ce travail, il nous serait difficile de trouver les mots pour vous exprimer l'ampleur de notre gratitude, sachez que nous apprécions votre dimension scientifique, mais aussi votre non moins importante dimension humaine. Nous vous remercions d'honorer la présidence de notre jury de soutenance.

Professeur Hamdi Pacha Youcef. Directeur du Laboratoire de pharmacologie-toxicologie de l'institut des Sciences vétérinaires Université Constantine 1. Pour avoir dirigé la présente thèse, pour ses conseils et ses encouragements; je n'oublie pas que je lui dois mes premiers acquis dans le domaine de la phytothérapie. Merci pour m'avoir transmis la passion de la recherche et de m'avoir sans cesse soutenu durant ces années. Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans votre bienveillance et votre esprit encourageant. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Professeur Belkhir A. Vous avez su, plus que quiconque, nous enseigner le métier de chercheur grâce à la rigueur et l'honnêteté scientifique dont vous faite preuve. À aucun moment vous n'étiez absent quand on a eu besoin de vous pour nous éclairer par vos conseils avisés et votre écoute. Soyez assuré de notre profonde gratitude et veuillez accepter nos sentiments de respect et de reconnaissance.

Professeur Melizi M. Pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury, veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.

Professeur Khelifi.D. Vous nous faites beaucoup d'honneur en acceptant de siéger dans ce jury. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect.

Professeur Djebbar MR. Pour avoir accepté de compter parmi notre jury et de juger ce travail.

Professeur Merghem. Pour nous avoir accueilli au sein de votre laboratoire de biochimie micro-moléculaire et phytochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Constantine 1, et pour nous avoir dirigé dans l'interprétation de nos résultats phytochimiques. Sincères remerciements pour votre collaboration.

A tous les membres du laboratoire de Pharmacologie Toxicologie et particulièrement à Zouhir.

Nos remerciements vont aussi aux collègues et amis de l'institut des sciences vétérinaires qui ont, chacun à leur façon, et ce, à différentes étapes de notre cheminement, contribué par leur soutien moral. Sincères remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I : LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES MEDICINALES

I.1 La phytothérapie.....	3
I.1.1 Définition.....	3
I.1.2 Différents types de la Phytothérapie.....	4
I.1.3 Pharmacopée	4
I.1.3.1 Parties utilisées.....	4
I.1.3.2 Galénique phytothérapeutique.....	4
I.1.3.3 Posologies.....	5
I.1.4 Etat des recherches en phytothérapie	5
I.2 Les plantes médicinales	6
I.2.1 Définition	6
I.2.2 Métabolites secondaires	7
I.2.2.1 Les composés phénoliques	7
I.2.2.1.1 Flavonoïdes.....	7
I.2.2.1.2 Tanins.....	10
I.2.2.1.3 Coumarines.....	12
I.2.2.2 Les composés terpéniques.....	14
I.2.2.2.1 Stéroïdes, stérols et terpénoïdes.....	14
I.2.2.2.2 Saponosides.....	16
I.2.2.2.3 Huiles essentielles.....	17
I.2.2.3 Composés azotés.....	18
I.2.2.3.1 Alcaloïdes.....	18

CHAPITRE II : MONOGRAPHIE DES PLANTES ETUDIEES

II.1 <i>Juglans regia</i>	21
II.1.1. Etude systématique	21
II.1.2 Etude botanique.....	21
II.1.3 Aire de répartition du noyer	22
II.1.4. Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Juglans regia</i>	23
II.1.5 Etude chimique de l'espèce <i>Juglans regia</i>	24
II.1.5.1 Fruits.....	24
II.1.5.2 Feuilles.....	24
II.2 <i>Pistacia lentiscus</i>	25
II.2.1 Etude systématique	25

II.2.2 Etude botanique	26
II.2.3 Aire de répartition de l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i> L.	28
II.2.4 Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	29
II.2.5 Etude chimique de l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i>	29
II.2.5.1. Fruits.....	30
II.2.5.2. Feuilles.....	30
II.3 <i>Lawsonia inermis</i>	32
II.3.1 Etude systématique	32
II.3.2. Etude botanique.....	32
II.3.3 Aire de répartition de l'espèce <i>Lawsonia inermis</i>	34
II.3.4 Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>lawsonia inermis</i>	34
II.3.5 Etude chimique de l'espèce <i>lawsonia inermis</i>	35
II.3.5.1. Fruits.....	35
II.3.5.2. Feuilles.....	35

CHAPITRE III : LES SOUCHES ETUDIEES ET LEURS EFFETS

III.1 Généralités sur la systématique des champignons	37
III.2 Cas des champignons filamenteux	38
III.2.1. Dermatophytes	38
III.2.2 Contaminants opportunistes ou moisissures.....	41
III.3 Cas des levures et champignons levuriformes	42
III.3.1 Les levures	42
III.3.2 Les champignons levuriformes	43
III.4. Effets des Champignons sur l'homme et les animaux.....	44

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

I.1 Matériels.....	47
I.1.1 Choix et identification du matériel végétal.....	47
I.1.2 espèces végétales étudiées.....	47
I.1.2 1 Collecte et conservation du matériel végétal.....	47
I.2 Méthodes et techniques.....	48
I.2.1 Méthode d'obtention des extraits totaux.....	48
I.2.1 1 Préparation de l'échantillon végétal.....	48
I.2.2 méthodes d'analyse phytochimique des extraits.....	50
I.2.2.1. Réactions de caractérisation.....	50
I.2.2.1.1- Détection des polyphénols.....	50
I.2.2.1.2. Détection des alcaloïdes.....	51
I.2.2.1.3. Détection des terpènes.....	52

I.2.2.1.4 Détection des saponosides.....	52
I.2.2.2 Préparation des extraits pour l'affrontement (partitions entre solvants)....	54
I.2.2.3 Chromatographie analytique sur couche mince (CCM).....	56
I.2.2.3.1 Principe.....	57
I.2.2.3.2 Mode opératoire.....	57
I.2.2.3.3 Révélation (visualisation des tâches).....	59
I.2.2.3.4 Relation fluorescence-structure.....	61
I.2.2.3.5 Relation structure - Rapport frontal ou facteur de rétention.....	62
I.2.2.4 Analyse spectrale (spectrophotométrie UV- Visible).....	63
I.2.2.5 Analyse qualitative par HPLC.....	67
I.2.3 Activité biologique.....	67
I.2.3.1 Test de l'activité antifongique des extraits totaux.....	69
I.2.3.1.1 Méthode de diffusion sur milieu solide.....	70
I.2.3.1.2 Méthode de dilution sur milieu liquide.....	71
I.2.3.2 Test de l'activité antifongique des phases.....	72
I.3 Traitements statistiques des données.....	74

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Extraction et affrontement.....	75
II.2 Caractérisation qualitative en tube.....	76
II.3. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM).....	78
II.3.1 CCM analytique sur plaque de gel de silice.....	79
II.3.1.1 Révélation au réactif de Neu	79
II.3.1.2 Révélation au réactif de Liebermann-Burchard.....	85
II.3.1.3 Révélation au réactif FeCl ₃	88
II.3.2 CCM sur plaque de verre polyamide DC6.....	91
II.4 Analyse spectrale (spectrophotométrie UV- Visible).....	94
II.5 Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....	98
II.6 Activité biologique.....	101
II.6.1 Activité antifongique des extraits totaux.....	101
II.6.2 Activité antifongique des extraits des phases.....	107

CONCLUSION	112
-------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
--	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure de base des classes les plus répandues des flavonoïdes	8
Figure 2 : Exemple de structure de base des tanins condensés.....	11
Figure 3 : Structure de base des classes les plus répandues des coumarines.....	12
Figure 4: Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.....	14
Figure 05: Description botanique de <i>Juglans regia</i>	22
Figure 06 : Distribution géographique du noyer.....	23
Figure 07: Description botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arbuste).....	26
Figure 08: Branche, feuilles et fleurs de <i>Pistacia lentiscus</i>	27
Figure 09: Les fruits de <i>Pistacia lentiscus</i>	27
Figure 10: le Mastic de <i>Pistacia lentiscus</i>	27
Figure 11: Distribution géographique de genre <i>Pistacia lentiscus</i>	28
Figure 12: Description botanique de <i>Lawsonia inermis</i>	33
Figure 13: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de <i>T.</i> <i>Rubrum</i>	40
Figure 14: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de <i>T.</i> <i>Mentagrophytes</i>	40
Figure 15: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de <i>M.</i> <i>Canis</i>	40
Figure 16: Aspect microscopique de culture de souche de <i>Candida</i> <i>albicans</i>	42
Figure 17 : Extraction des plantes étudiées.....	49
Figure 18 : Schémas des tests phytochimiques pour la détection des Polyphénols.....	53
Figure 19 : Schéma du test phytochimique pour la détection des stéroïdes.....	53
Figure 20 : Schéma du test phytochimique pour la détection des alcaloïdes.....	54
Figure 21 : Protocole d'extraction.....	56
Figure 22 : Méthode de dépôts lors d'une CCM analytique.....	58
Figure23: Migration des constituants de l'extrait lors d'une CCM analytique.....	59
Figure 24: Structure de 2-aminoéthyl diphenyl borate (réactif de Neu).....	60
Figure 25 : Structure de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique réactif de Liebermann Burchard.....	60

Figure 26 : Relation entre la radiation absorbée et la couleur parue d'une substance.....	65
Figure 27 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde.....	65
Figure 28 : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC.....	68
Figure 29 : CCM analytiques des extraits de <i>Lawsonia inermis</i>, <i>Juglans regia</i> et de <i>Pistacia lentiscus</i> sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau(10/1/0,5)(visibleàœil nu).....	28
Figure 30 : CCM analytiques des extraits de <i>Lawsonia inermis</i>, <i>Juglans regia</i> et de <i>Pistacia lentiscus</i> sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant Acetate d'ethyle/Methanol/Eau (10/1/0,5) (sous UV à 254nm).....	82
Figure 31 : CCM analytiques des flavonoïdes de <i>Juglans regia</i>,<i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant (révélation au réactif de Neu à 365nm).....	83
Figure 32: CCM analytiques des flavonoïdes de <i>Juglans regia</i>, <i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant (révélation au réactif de Neu à 265nm).....	83
Figure 33 : CCM analytiques des phases des extraits de <i>Juglans regia</i>,<i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice avant révélation.....	87
Figure 34: CCM analytiques des phases des extraits de <i>Juglans regia</i>, <i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice après révélation au réactif de Libermann- Burchard.....	87
Figure 35 : CCM analytiques des phases des extraits de <i>Juglans regia</i>, <i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice révélées au réactif FeCl₃ (avant révélation).....	90
Figure 36 : CCM analytiques des phases des extraits de <i>Juglans regia</i>, <i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Lawsonia inermis</i> sur plaque de gel de silice révélées au réactif FeCl₃.....	90
Figure 37 : Chromatogrammes résultants de l'analyse de l'extraits de <i>Juglans regia</i> par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v).....	91

Figure 38 : Chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits de <i>Lawsonia inermis</i> et de <i>Pistacia lentiscus</i> par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10).....	92
Figure 39 : Spectres d'absorption UV des extraits de PLE dans le méthanol.....	95
Figure 40: Spectres d'absorption UV des extraits de JRE dans le méthanol	96
Figure 41: Spectres d'absorption UV des extraits de LNI dans le méthanol	97
Figure 42 : Profil du chromatogramme (HPLC) de la phase acétate d'éthyle (AC) de <i>Lawsonia inermis</i>.....	98
Figure 43: Spectres UV des pics élués à partir de la phase acétate d'éthyle (AC) de <i>Lawsonia inermis</i>.....	99
Figure 44 : Activité antifongique des extraits végétaux sur <i>Trichophyton rubrum</i>	102
Figure 45 : Activité antifongique des extraits végétaux sur <i>Trichophyton Mentagrophyte</i>...	103
Figure 46 : Activité antifongique des extraits végétaux sur <i>Microsporum Canis</i>.....	104
Figure 47: Activité antifongique des extraits végétaux sur <i>Candida albicans</i>.....	104

LISES DES TABLEAUX

Tableau 01 : Composition des huiles essentielles des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> des régions d'Alger, Tizi-Ouzou et Oran.....	31
Tableau 02: Les principaux dermatophytes et leur habitat d'origine Préférentiel.....	41
Tableau 03 : Habitat, groupe et répartition, et maladies causées par les souches fongiques étudiées.....	45
Tableau 4 : Espèces utilisées pour le criblage phytochimique et les tests Antifongiques.....	48
Tableau 5 : Détermination de la structure des flavonoïdes par l'interprétation de leurs fluorescences	62
Tableau 06: Relation entre Rf- Structure flavonique	63
Tableau 07 : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes	66
Tableau 8 : Relation entre l'arrangement des groupements hydroxyles et le maximum d'absorption.....	67
Tableau 9: Souches fongiques testées.....	70
Tableau 10 : Criblage phytochimique des extraits méthanoliques bruts des différentes espèces végétales (LIN, PLE et JRE).....	76
Tableau 11 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes (révélation au réactif de Neu)	80
Tableau 12: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM révélées au réactif de Neu de <i>Lawsonia inermis</i>.....	80
Tableau 13 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM révélées au réactif de Neu de <i>Juglans regia</i>.....	80
Tableau 14 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM révélées au réactif de Neu de <i>Pistacia lentiscus</i>.....	81
Tableau 15 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes révélées au réactif de Liebermann-Burchard	85
Tableau 16 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de LIN révélées au réactif de Liebermann-Burchard.....	85
Tableau 17 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de JRE	

révélées au réactif de Liebermann-Burchard	86
Tableau 18 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de PLE	
révélées au réactif de Liebermann-Burchard	86
Tableau 19 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes	
révélées au réactif de FeCl ₃	88
Tableau 20: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de	
<i>Lawsonia inermis</i> (LIN) révélées au réactif de FeCl ₃	88
Tableau 21: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de <i>Juglans</i>	
<i>regia</i> (JRE) révélées au réactif de FeCl ₃	89
Tableau 22: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de	
<i>Pistatacia lentiscus</i> (PLE) révélées au réactif de FeCl ₃	89
Tableau 23: Différentes bandes d'absorption des phases obtenue des extraits	
de PLE, JRE et LIN réalisés dans le méthanol.....	94
Tableau 24: Résultats de l'analyse en HPLC de la phase acétate d'éthyle (AC)	
de <i>Lawsonia inermis</i>	100
Tableau 25 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de	
<i>Trichophyton rubrum</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la	
croissance fongique +/- écart type).....	101
Tableau 26 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de	
<i>Trichophyton mentagrophyte</i> (exprimé en diamètre d'inhibition	
de la croissance fongique +/- écart type).....	101
Tableau 27 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de	
<i>Microsporum canis</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la	
croissance fongique +/- écart type).....	103
Tableau 28 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Candida</i>	
<i>albicans</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance	
fongique +/- écart type).....	103
Tableau 29 : Concentration Minimale d'Inhibition (CMI) des extraits	
végétaux les plus actifs.....	105
Tableau 30 : Activité antifongique des factions ED, AC et 1B des extraits des	
plantes JRE, LIN et PLE sur la croissance <i>in-vitro</i> de	

Trichophyton rubrum (T. rub), *Trichophyton mentagrophytes (T. men)*, *Microsporum canis (M. canis)* et de *Candida albicans (C. Alb)*..... 108

Tableau 31 : Concentrations des différentes fractions des extraits testés (mg/ml) lecture à 420nm λ des flavonoïdes blanc 2ml de méthanol et 20 μ l de DMSO..... 108

ABREVIATIONS

Abs	Absorbance
AC	acétate d'éthyle
ACN	Acétonitril
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH₃ COOH	acide acétique
CMI	concentration minimale d'inhibition
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
DCM	dichlorométhane
DMSO	diméthylsulfoxyde
ED	éther diéthylique
EP	éther de pétrole
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
FeCl₃	chlorure de fer III
HCOOH	acide formique
HCl	Acide chloridrique
H₂O	Eau distillée
H₂ SO₄	Acide sulfurique
JRE	<i>Juglans regia</i> L.
GRISEO	Griseofulvine
LIN	<i>Lawsonia inermis</i> L.
M	<i>Microsporium</i>
Me OH	Méthanol
MEC	Méthyle éthyle cétone
Moy	Moyenne
ND	non déterminé
NaOH	Hydroxyde de sodium
Neu	Éthyle aminoester de l'acide diphényl borique
nm	Nanomètre

P	facteur statistique de comparaison de populations
PLE	<i>Pistacia lentiscus</i> L.
Rf	Rapport frontal
SD	+/- écart type
T	<i>Trichophyton</i>
T. rubrum	<i>Trichophyton rubrum</i>
T. mentagrophytes	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
M. canis	<i>Microsporum canis</i>
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
YPG	Yeast / Peptone / Glucose
δ	Déplacement chimique
λ max	Longueur d'onde maximale d'absorption
ν max	Fréquences d'absorption
1B	1 butanol

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les dermatophytes constituent un groupe de champignons capables de digérer la kératine et causer des dermatophytoses (**Kuiate et al., 2006**). Ils affectent environ 20 à 40% de la population mondiale. Les statistiques montrent une recrudescence des affections fongiques et une augmentation de la résistance de nombreux agents pathogènes aux traitements actuels (**Balkis et al., 2002; Dinesh Babu et Subhasree, 2009**).

Face à ces données et malgré d'importants progrès, le nombre d'antifongiques reste encore insuffisant. En effet, les champignons sont doués de redoutables facultés d'adaptation et il faut sans cesse trouver de nouveaux médicaments ou de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour lutter contre l'émergence d'espèces résistantes. Une alternative efficace à ces thérapeutiques chimiques est le développement de la phytothérapie, grand réservoir de principes actifs. L'usage des plantes en médecine traditionnelle a incité les chercheurs à purifier les molécules actives.

L'Algérie, de part sa situation géographique et climatique, possède une flore particulièrement riche et diversifiée depuis longtemps exploitée par la médecine traditionnelle de ses habitants. Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés) (**Radford et al., 2011**).

Pour contribuer à la valorisation de cette flore Algérienne, qui n'a pas encore livré tous ses secrets dans les domaines de la phytothérapie et de la chimiothérapie, nous inscrivons notre présente étude qui se propose d'approfondir les connaissances sur trois familles botaniques jouissant de grandes propriétés pharmacodynamiques :

Lawsonia inermis (*Lythraceae*) caractérisée par ses multiples usages contre l'eczéma, les mycoses, astringent, antiseptique, antifongique, Leshmanicide, cicatrisant des plaies et des blessures (**Hseini et Kahouadji, 2007 ; Serakta et al., 2013**).

Pistacia lentiscus (*Anacardiaceae*) reconnu pour son activité anti inflammatoire, antivirale, antibactérienne, antifongique, cicatrisante des brûlures et utilisé dans les traitements de l'eczéma (**Villar et coll, 1987; Magiatis et coll, 1999; Janakat et Al-Meir, 2002; Kordali et al., 2003; Paraschos et al., 2007; Yarikamarani et al., 2007; Benhammou et al., 2008 ; Djerrou et al., 2010 ; Djerrou et al., 2013**).

Juglans regia (*Juglandaceae*) montrant une utilisation thérapeutique non négligeable dans les soins du squelette, astringent, antiseptique, antifongique et kératinisant antibactérien et fongicide (Hscini et Kahouadji, 2007 ; Benhammou et al., 2008)

Le présent travail consiste essentiellement à effectuer un criblage chimique afin de connaître les grandes familles chimiques auxquelles on peut rattacher les propriétés pharmacodynamiques attribuées à chacune des trois plantes, puis à réaliser quelques expériences "*In vitro*" en guise de tests biologiques pour confirmer ou infirmer le bien-fondé de telles utilisations. Pour y parvenir, nous avons procédé à :

- L'extraction et la caractérisation chimique des extraits ;
- L'évaluation de l'activité antidermatophytique *In vitro* des extraits et fractions obtenus après les différents processus d'extractions et de partage.

*TRAVAUX
ANTERIEURS*

CHAPITRE I

LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES MEDICINALES

Durant ces dernières années, les recherches scientifiques se sont orientées vers les composés des plantes médicinales destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. En effet, les industries pharmaceutiques cherchent de plus en plus dans la diversité des molécules biologiques végétales dans le but d'avoir de nouveaux composés pourvus de propriétés inédites.

Ces molécules issues des plantes médicinales sont considérées comme une source très importante de médicaments; où plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel. Ce qui explique qu'aujourd'hui la phytothérapie dite naturelle semble gagner du terrain en évoluant en parallèle avec la médecine moderne.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante en tant que soins de santé primaire (**Bérubé, 2006**). Cette discipline de phytothérapie a donc depuis quelque années quitté le stade de « médecine de tisanes » ou des médecines alternatives pour devenir une méthode thérapeutique supplémentaire précise et prospective incluant des exigences, des posologies et des techniques particulières d'administration mesurée et prudente. Si l'on sait que sur la terre il existe environ 40000 variétés de plantes dont seulement 5% ont été étudié on en conclut qu'il reste un champ quasi inépuisable à la phytothérapie (**Gilles, 1976 ; Iserin, 2001 ; Waridel, 2003**).

I.1 La phytothérapie

I.1.1 Définition

Par définition la phytothérapie est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes (de l'ensemble des éléments de la plante). Ce terme vient du grec : «phytos» = la plante et «therapiea » = la thérapie. La phytothérapie fait partie des médecines parallèles, ou médecines douces et c'est l'une des sciences médicales les plus anciennes (**Larousse Médical, 2006**). Cette thérapie se veut naturelle et respectueuse de la santé du patient. Elle adhère à une philosophie caractérisée par la recherche du médicament le plus adapté au patient respectant son organisme, ainsi que par des conseils tant sur l'hygiène de vie que sur la nutrition. De plus le but recherché en phytothérapie est le retour à l'équilibre, en renforçant les défenses de l'individu (**Walker, 2006**).

I.1.2 Différents types de la Phytothérapie

Cette discipline regroupe :

- **L'aromathérapie** : qui repose sur l'utilisation des huiles essentielles ou essences des plantes par différentes voies (ingestion, inhalation, passage transcutané) cependant du fait que ces huiles sont des produits complexes à utiliser avec précaution et en respectant les doses prescrites, la voie d'administration la plus intéressante, car la plus rapide et la moins toxique, est la voie percutanée.
- **La gémothérapie** : qui consiste à utiliser des extraits alcoolisés et glycerinés de bourgeons et jeunes racines dilués au dixième. Chaque extrait est réputé avoir une affinité pour un organe ou une fonction. Par exemple, le macérât glyceriné de bourgeons de *Ribes nigrum*, ou cassis, dilué au dixième, agit en tant que stimulant de la zone corticale des glandes surrénales, c'est-à-dire de la même manière que la cortisone.
- **L'herboristerie** : (la méthode la plus classique et la plus ancienne) qui repose sur l'utilisation de décoctions, infusions et macérations de plantes.
- **La phytothérapie chinoise** : composante de la médecine chinoise traditionnelle avec l'acupuncture et la diététique.
- **La phytothérapie pharmaceutique** qui utilise des extraits végétaux à des doses optimales sous diverses formes galéniques.

I.1.3 Pharmacopée

En phytothérapie, il faut distinguer deux types de produits : les produits phytopharmaceutiques et les plantes en vente libre et utilisables directement en tisanes ou décoction.

I.1.3.1 Parties utilisées

Rarement une partie d'une plante est utilisée seule, souvent divers organes d'un végétal sont mélangés entre eux ou à d'autres extraits végétaux. Cependant nous remarquons qu'en médecine chinoise, les racines tendent à être les organes les plus utilisés, alors qu'en Europe, les plantes sont assez rarement utilisées dans leur intégralité : les parties aériennes de la plantes sont le plus souvent utilisées, suivies par l'écorce, les fleurs, les fruits et les racines.

I.1.3.2 Galénique phytothérapeutique

En général, les plantes sont mélangées de façon empirique depuis des générations sans support scientifique véritable. De façon classique elles sont utilisées en mélange, en décoction, diluées, sous forme d'huile essentielle, en cataplasmes ou telles quelles par voie orale (**Rigat et al., 2007**).

Concernant la préparation traditionnelle pour un usage interne, le plus souvent les plantes sont utilisées en décoction : tisanes, thés végétaux ou thés aromatisés, puis sous forme d'alcool ou d'huile essentielle ou d'essence, fabriquées par distillation ou encore macération dans des produits alcoolisés mais aussi en sirop, c'est-à-dire en solution sucrée aromatisée. Il existe également en phytothérapie humaine des formulations en gélules renfermant l'extrait végétal sous forme sèche ou en capsules renfermant un extrait huileux. Lors d'usage externe, les plantes sont utilisées en liniment (préparation huileuse), en lotion, en pommade, en bain ou encore directement en application locale sans préparation pharmaceutique particulière. On peut également citer les fumigations pour *Sambucus nigra* comme analgésique ou désinfectant.

I.1.3.3 Posologies

Concernant les posologies et les durées de traitement, il n'existe pas de règles précises rapportées. Les posologies concernant les tisanes et décoctions sont le plus souvent empiriques et peu précises (nombre de tasses par jour). Concernant les gélules et capsules, les posologies sont données en nombre de gélules ou capsules par jour selon l'intensité des symptômes.

I.1.4 Etat des recherches en phytothérapie

Les médecines alternatives, dont la phytothérapie, restent de manière générale très utilisées dans les pays en voie de développement, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, principalement pour des raisons de coût et de disponibilité des médicaments. Ce phénomène est particulièrement important dans certains pays : en Ouganda par exemple, 61% des éleveurs utilisent en priorité la phytothérapie lors de maladies du bétail et n'appellent le vétérinaire qu'en cas de non amélioration (**Tabuti *et al.*, 2003**).

La recherche en phytothérapie fait appel à des études d'efficacité réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme comme chez l'animal. Sa particularité réside dans l'existence de substances actives ayant des effets synergiques dans des mélanges de végétaux mais aussi parfois au sein d'un seul végétal et également dans la difficulté à isoler ces principes actifs. L'écueil principal rencontré dans les études phytothérapeutiques est le manque de standardisation de ces études, défaut récurrent des médecines alternatives. En phytothérapie, ce manque de standardisation concerne les systèmes sur lesquels un extrait végétal est testé, la teneur précise de cet extrait végétal, sa provenance, sa fraîcheur, etc. Ces éléments constituent autant de variations empêchant les études d'être complètement reproductibles et surtout comparables entre elles (**Wyllie 2006**).

Enfin, de nombreuses espèces végétales possèdent une toxicité propre, directe (hépatotoxicité par exemple) ou indirecte (photosensibilisation), qu'il est nécessaire de connaître avant toute commercialisation. La connaissance parfaite des constituants d'une plante et de leurs particularités est donc particulièrement nécessaire, comme pour tout médicament (Wyllie 2006).

La plupart des études ne s'intéressent qu'aux propriétés d'un végétal isolé et peu aux associations de végétaux en phytothérapie alors que nombre de médicaments utilisés traditionnellement en phytothérapie sont constitués de mélanges. Ces associations pourraient par ailleurs constituer une nouvelle génération de médicaments d'origine végétale. Enfin, la connaissance des effets des associations de végétaux et des mécanismes associés passe également par la connaissance des effets toxiques. Cette connaissance, non négligeable étant donné le nombre de mélanges végétaux disponibles dans le commerce sans que l'on ait l'assurance de leur innocuité, est malgré tout nécessaire pour la commercialisation de tout médicament (Wagner *et al.*, 2009).

I.2 Les plantes médicinales

I.2.1 Définition

La **Pharmacopée française (2010)** donne une définition claire des plantes médicinales : « Les plantes médicinales sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques ». On peut distinguer deux utilisations distinctes des plantes médicinales :

- La plante entière ou une partie de la plante est utilisée en l'état sans avoir subi d'extraction physico-chimique préalable. Le terme de totum est alors employé pour désigner l'ensemble ou la partie du végétal utilisé. Le totum contient de nombreuses familles d'actifs agissant en synergie.
- La plante entière ou une partie de la plante subit une extraction physico-chimique. On obtient alors un extrait aqueux, hydroalcoolique selon le solvant d'extraction utilisé. Cet extrait liquide subit généralement une étape de dessiccation. On obtient alors un extrait sec. L'extrait sec est concentré en actifs de la même famille chimique.

I.2.2 Métabolites secondaires

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés et carbohydrates. Ces métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont à faible prix de revient. Il existe aussi un métabolisme secondaire, chez les plantes : c'est une exclusivité du monde végétal. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Elles sont produites en très faible quantité et sont à des prix élevés. On les appelle, les métabolites secondaires.

Ce sont des produits, à structure chimique souvent complexe. Selon les espèces, ces métabolites sont très dispersés et très différents. Ce n'est seulement qu'à partir de la deuxième moitié du 20^e siècle, qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse chimique. Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires (**Bouhadjera, 2005**) classés selon leur appartenance chimique en plusieurs grands groupes: parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité.

I.2.2.1 Les composés phénoliques

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antiparasitaires, antioxydants (**Bahorun, 1997**). Selon **Diallo, (2005)**, les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié des groupements hydroxyles, ces molécules représentent une famille de plus 8000 composés (**Dacosta, 2003**). Parmi les composés polyphénoliques présents chez les plantes étudiées on retrouve dans une grande mesure les flavonoïdes les tanins et les coumarines.

I.2.2.1.1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes), souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993 ; Ghestem et al., 2001**). A l'état naturel ils existent le plus souvent sous forme d'hétérosides : les flavonosides (**Ghestem et al., 2001 ; Marfak, 2003**).

C'est-à-dire des dérivés de génines sur lesquelles un ou plusieurs oses sont greffés (**Hadi, 2004**). Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la

structure du 2-phényl-benzopyrone (Fiorucci, 2006). Ce groupe comprend plusieurs classes, subdivisées selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Bruneton, 1999 ; Marfak, 2003 ; Kim *et al.*, 2004 ; Skerget *et al.*, 2005) (figure 1) et dont les plus importantes sont :

- Flavones,
- Flavonols,
- Flavanones,
- Dihydroflavonols, Isoflavones,
- Isoflavon,
- Flavanes,
- Flavanols et anthocyanines.

Récemment de nombreux travaux ont montré que les fruits, les légumes, le thé, le soja constituent les sources alimentaires des flavonoïdes les plus étudiées (Gervais, 2001 ; Pelli et Lyly ., 2003 ; Cabrera *et al.*, 2007).

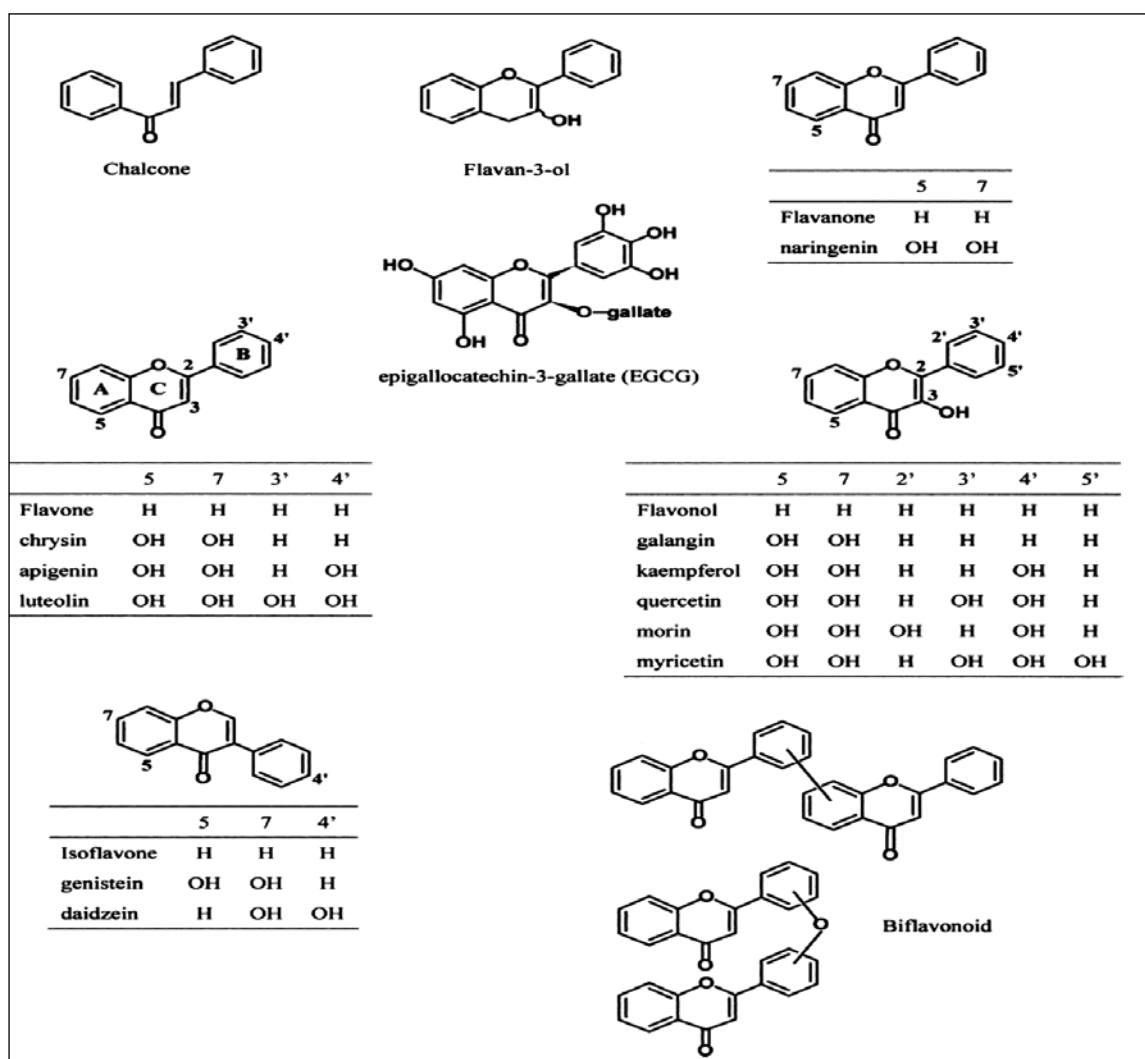


Figure 1: Structure de base des classes les plus répandues des flavonoïdes (Kim *et al.*, 2004).

- **Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont largement connus par leurs activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, anti agrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, antiinflammatoires, anti-hypertensives et antimicrobiennes (Das *et al.*, 1994 ; Formica et Regelson, 1995; Anderson *et al.* 1996 ; Yochum *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004 ; Cushine et Lamb, 2005 ; Orturno, 2005). Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des plus récentes études sur cette activité est celle d'Orturno (2005), qui démontre l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Cirtus parasidi* de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*.

En effet, la naringinine, l'héspéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *P. digitatum*. (Orturno, 2005). Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes* (Batawita, 2002). D'autres flavonoïdes extraits de la poudre des inflorescences mâles de *Borassus dethiopum* ont une activité contre des dermatophytes comme *Trichophyton rubrun* grâce à des fractions flavoniques (Guanon, 2003). Alors que les flavonoïdes des espèces *Maclura tinctoria* (El Sohly *et al.*, 2001) et *Terminalia alata* (Srivastava *et al.*, 2001) ont une forte activité anti-candidose.

Pour les autres activités des Flavonoïdes Szent Gyorgyi (1937) cité par Marfak (2003) ; Hadi (2004) et Sahpaz (2013) constatent qu'en limitant la dégradation de l'acide ascorbique, ces composés ont une action vasculoprotectrice et veinotonique appelée propriété vitaminique P. Pelli et Lyly (2003), de leur part, rapportent que les colorants des baies fortement colorées sont des anthocyanes qui peuvent jouer un rôle dans la prévention des cardiopathies. Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein et de la prostate, comme elles préviennent aussi l'ostéoporose (Besle *et al.*, 2004). D'autre part les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'aldose réductase.

En effet, Ong et Khoo (1997) ont rapporté que la myrécitine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques. En plus, les flavonoïdes ont une activité antioxydante car ils peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ces espèces réactives de l'oxygène comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Madhavi *et al.*, 1996 ; Tahrouch *et al.*,

2000 ; Bartosikova *et al.*, 2003). Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (Přemysl *et al.*, 2011). Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que l' α -tocophérol et le β -carotène (Přemysl *et al.*, 2011).

I.2.2.1.2 Tanins

Composés aromatiques polyphénoliques, non azotés, hydrosolubles et comme les flavonoïdes, dérivés d'extension du phénylpropane de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, à saveur astringente et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Frutos *et al.*, 2004 ; Sahpaz, 2013). Chez les végétaux supérieurs on distingue deux groupes de tanins de structures différentes: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés (Traoré, 1999 ; Frutos *et al.*, 2004).

➤ Tanins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixe, au moyen d'une liaison ester, des acides (acide gallique pour le groupe des gallotanins, et acide ellagique pour le groupe des ellagitanins). Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides gallique ou phénolique liés (Chung *et al.*, 1998 ; Ghestem, 2001).

➤ Tanins condensés

De structure plus complexe, les tannins condensés (proanthocyanidines) sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires. Ce sont des polymères de flavan-3-ol (Catéchine) et de flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux. Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère (*figure 2*). Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique des proanthocyanidines (Okamura *et al.*, 1993 ; Aganga et Mosase, 2001). Le contenu des aliments en proanthocyanidines peut être affecté par plusieurs facteurs tels que le stockage et la cuisson ; la teneur est plus élevée généralement dans

le fruit frais que le fruit séché ou cuit (Aron, 2007). Les tanins condensés ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (Porter et al., 1986).

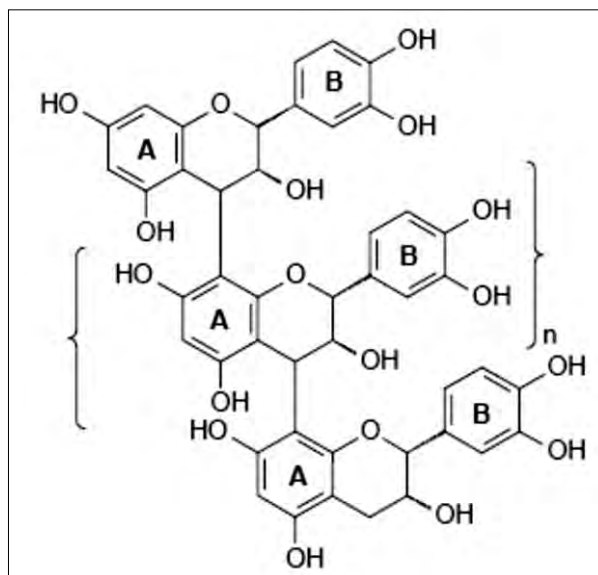


Figure 2 : Exemple de structure de base des tanins condensés (Li et al., 2004).

- **Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins**

De nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tanins sur différentes bactéries, virus et champignons (Hatano et al., 2005). Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, on a les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de cette plante contre *Exobasidium vexans* (Punyasiri, 2005), et les tannins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum cassis*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et de levures opportunistes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*...) (Latte, 2000). Cette action antifongique est couramment utilisée pendant les opérations œnologiques lors de la manufacture des vins car les tannins polaires de ces derniers ont une grande capacité à se fixer sur les champignons néfastes. (Mazauroic, 2005).

D'autres applications médicales des plantes à tanins peuvent être citées: ils ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, ils sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur

effet antiseptique, découlent de leur affinité pour les protéines ce qui leur donne la capacité de régénérer des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (Okuda *et al.*, 1983 ; Bruneton, 1999). De plus les tanins ont des grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (Frutos *et al.*, 2004).

Paolini et collaborateurs ont avancé que les plantes à tanins et plus largement les tanins condensés représentent une méthode alternative ou complémentaire de lutte contre les strongyloses gastro-intestinales chez les petits ruminants pour l'avenir. Ces substances d'origine naturelle s'inscrivent dans le chemin tracé par l'agriculture durable (Paolini *et al.*, 2003)

I.2.2.1.3 Coumarines.

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorota* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford *et al.*, 2001) (Figure 3).

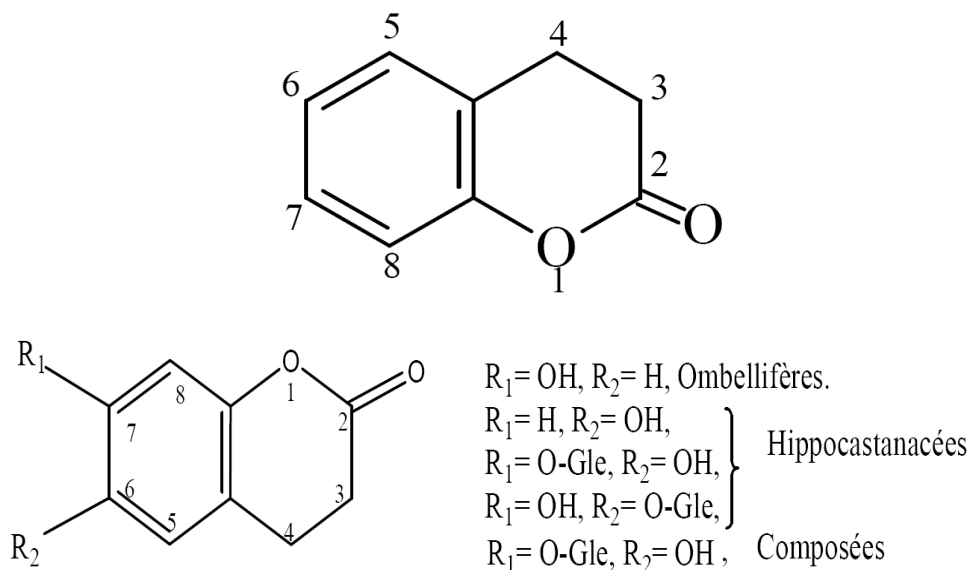


Figure 3 : Structure de base des classes les plus répandues des coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : *Légumineuses*, *Rutacées*, *Apiécées* et *Thymeleacées*. Elles se

trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (**Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004**).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (**Hoffmann, 2003**), Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (**Hofmann, 2003**).

On peut classer les coumarines en cinq catégories : (**Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004**)

- ✓ **Coumarines simples** : contenant les Coumarines et les Ombelliférones ;
- ✓ **Coumarines prenylées** : contenant les Rutaculine et les Osthol ;
- ✓ **Furanocoumarines** : contenant les Furanocoumarines linéaires (Bergaptène, Imperatorine) et les Furanocoumarines angulaires (Angelicine, Pimpinéline) ;
- ✓ **Pyranocoumarines** : contenant la visnadine.
- ✓ **Coumarines à l'état dimérique ou trimérique** : tels que les Dicoumarines (coumarines dimérique), la Dicoumarol, les Tricoumarines et les Triumbellattines.

- **Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des coumarines**

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (**Ochock et al., 1995; Taguchi, 2000; Ojala et al., 2000 ; Chen et al., 2004 ; Khan et al., 2005 ; Thati et al., 2007 ; Stefanova et al., 2007**). Ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes (**Anderson et al., 1996 ; Hu et al., 2005**).

Les coumarines se révèlent être des composés thérapeutiquement promoteurs dans l'amélioration du système immunitaire (action immunostimulante) : l'administration de la coumarine et de l'umbelliférone par des malades atteints de cancers ou de brucellose à raison de 100mg par jour a provoqué une augmentation des lymphocytes T Helper dans la circulation sanguine (**Bruneton,**

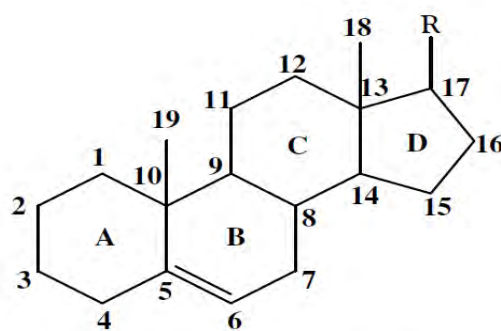
1993 ; Stefanova et al. 2007). Des activités antifongiques significatives ont également été signalées pour certaines coumarines.

Al-Amiery et al. (2012) dans leurs études *in vitro* ont montré que des coumarines de synthèse limitent la prolifération des espèces : *Aspergillus niger* et *Candida Albicans*. Tandis que les coumarines naturelles de l'espèce *Ruta graveolens* se comportent comme des fongicides actifs contre les *Candida* et les *Fusarium* (Ojala et al., 2000). De plus furocoumarines de la même espèce sont utilisés pour soigner l'eczéma et le psoriasis. (Abadie, 2007). Enfin Pour l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (Cottiglia et al., 2001 ; Laure, 2005 ; Khan et al., 2005).

I.2.2.2 Les composés terpéniques

I.2.2.2.1 Stéroïdes, stérols et terpénoïdes

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, ils regroupent plusieurs sous familles. Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles. Ils se présentent sous forme d'alcool libre (sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (glucoside stérols) Les stérols végétaux possèdent généralement une double liaison ou plus ; ils sont alors appelés les phytostérols par contre leurs analogues saturés sont appelés les phytostanols (Tanya, 1997 ; Robert et al, 2002).



R: chaîne latérale (C=0-10)

Figure 4: Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes

Parmi les stérols ou phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux on cite : le stigmastérol et le β -sitostérol. Ils représentent 80 % des stérols biosynthétisés à la surface du globe terrestre. Les stéroïdes et les triterpènes peuvent être considérés comme formés par

l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes.

La famille des terpénoïdes regroupe plusieurs sous familles :

- **Monoterpènes** et sesquiterpènes : Issus du couplage de deux unités isopréniques. Ils existent dans les huiles essentielles et sont largement distribués chez les végétaux supérieurs. On les retrouve sous les formes: Acycliques, Monocycliques, Aldéhydes le plus souvent acycliques, Alcools monocycliques, Alcools bicycliques, Alcools acycliques.

- **Diterpènes** : Ce sont des dérivés des hydrocarbures en $C_{20}H_{32}$, Issus du couplage de quatre unités isopréniques ($n = 4$). Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines, ils sont particulièrement abondants chez les *Lamiaceae* et les *Asteraceae*. Ils peuvent être acycliques ou bi ou tri-cycliques. Les plus intéressants sur le plan pharmacologique sont les diterpènes tricycliques à noyau taxane tel que le taxol et le taxotère qui sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l'ovaire, du poumon et du sein (Seghiri, 2008).

- **Triterpènes** : présentent une très forte unité structurale qui est fortement marquée chez les stéroïdes. En première approximation, on peut estimer qu'il n'y a pas de différences fondamentales entre les triterpènes et les stéroïdes. Ces derniers peuvent être regardés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu, au minimum, trois méthyles. C'est d'ailleurs la présence des méthyles en C-4 et C-14 qui a initialement servi à distinguer les stéroïdes des terpènes.

- **Sesquiterpènes** : Issus du couplage de trois unités isopréniques. Un très grand nombre des sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs. Ils peuvent intervenir dans les propriétés attribuées aux fractions volatiles. C'est le cas, par exemple du bisabolol et ses dérivés présents dans les huiles essentielles de matricaire. Les sesquiterpènes sont potentiellement actifs à cause de leurs fonctions lactones qui possèdent une activité antibactérienne (Gssypol). De plus, les *Astéracées* à lactones sesquiterpéniques sont fréquemment responsables de dermatites de contact d'origine allergique.

➤ **Polyterpènes:** toutes ces doubles liaisons sont de type Z (chaîne prioritaire). Chaque molécule comporte de 1000 à 5000 motifs isopréniques. L'isomère où toutes les liaisons sont de type E est la gutta-percha qui est une matière dure et cassante.

- **Caractérisation des stéroïdes et terpénoïdes**

La détection des stéroïdes et des hétérosides triterpéniques, est basée sur la réaction de Liebermann - Burchardt.

I.2.2.2.2 Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, appartenant aux stérols ou triterpènes. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, ils sont caractérisés par leur action tensioactive (abaissement de la tension superficielle). La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques, certains sont des matières premières pour l'hémisynthèse de molécules médicamenteuses stéroïdiques. Selon la nature des génines, et structurellement, les saponosides sont classés en deux groupes :

- **Saponosides à génines stéroïdiques**

Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau spirostane utilisés pour l'hémisynthèse des corticoïdes. Ces sapogénines possèdent toujours une fonction alcool secondaire en 3, susceptible de former une liaison hémiacétalique avec un ose ou un oside.

- **Saponosides à génines triterpènes**

Ils constituent la majorité des sapogénines des dicotylédones et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles.

Les saponosides donnent un certain nombre de réactions colorées, non spécifiques, mais fort utilisées pour leur mise en évidence, signalons la réaction de Liebermann Burchardt. Les réactions générales de détection des saponosides sont comme suit:

- l'acide sulfurique concentré dissout les saponosides et se colore successivement en jaune, rouge, bleu vert ou bleu violet.

- l'examen en lumière UV, révèle une fluorescence bleue pour les saponosides triterpéniques et jaune pour les stéroïdiques. Dans l'industrie, plusieurs méthodes de dosages sont utilisées,

notamment, une gravimétrie réalisée par précipitation des saponosides après hydrolyse et pesée du résidu.

Lors de la caractérisation des saponosides en milieu aqueux, la formation d'une couche hydrophobe est expliquée par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes entre un ou plusieurs groupes hydroxyles ou carboxyliques de saponoside et les molécules d'eau.

- **Propriétés physico-chimiques**

Les saponosides possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques qui nous facilitent leur caractérisation, éventuellement, le pouvoir aphrogène, l'action hémolytique et la saveur âcre. Ils se trouvent sous forme amorphe et sont solubles dans les solvants organiques polaires et l'eau. Ils sont pratiquement insolubles dans les solvants organiques apolaires. Leur point de fusion est compris entre 200°C et 300°C (**Dohou et al., 2003**).

- **Propriétés biologiques**

Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-œdémateuses. Ils sont particulièrement toxiques pour les poissons et autres animaux aquatiques. Actuellement, les recherches montrent que les saponosides isolés à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, possèdent des propriétés anti-bactérienne et antifongique (**Bouhadjera, 2005**).

I.2.2.2.3 Huiles essentielles

Les huiles essentielles parfois appelées essences, sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles. Elles sont obtenues par deux procédés, soit par distillation ou entraînement à la vapeur d'eau. Pour améliorer la qualité aromatique des huiles essentielles, l'extraction se fait à basse température et pression. La teneur des huiles essentielles est généralement faible, elle est de l'ordre de 1% à

5 %. Il existe quelque exception, exemple : Badiane de Chine, où la teneur en essence est supérieure à 5%, clou de girofle qui renferme plus de 15% d'essence (**Kouno et al., 1988**).

- **Propriétés physiques**

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun des propriétés physiques :

- ce sont généralement des liquides à température ordinaire.
- leur volatilité les oppose aux 'huiles fixes'.

- elles sont généralement incolores au jaune pâle, sauf quelque exception (huile d'Azulène, de couleur bleue).
- leur densité, le plus souvent est inférieure à celle de l'eau.
- elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire.
- peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools de titre élevé, dans les huiles fixes (liposolubles) et dans les solvants organiques usuels.

- **Propriétés biologiques**

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles entraîne des activités :

- propriété de diurèse : faisant fonctionner les quatre grands émonctoires (peau avec ses trois glandes, reins, poumons et intestins) et facilitant le drainage des déchets et des résidus hormonaux solubles et insolubles vers leurs émonctoires.
- propriétés spasmolytiques et sédatives : de très nombreuses drogues à huiles essentielles (badiane, menthe, verveine,...) sont efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux.
- propriétés irritantes : augmentent les mouvements de l'épithélium cilié au niveau de l'arbre bronchique et l'élimination rénale d'eau par effet local direct.

I.2.2.3 Composés azotés

I.2.2.3.1 Alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales. Leur extrême importance tient d'une part à leur activité et d'autre part à leur toxicité (Cordell 1981). Le terme d'alcaloïdes a été introduit par W. Meissner au début du XIX^e siècle ; pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect), il rappelle le caractère alcalin de ces substances, mettant à profit leur extraction et leur dosage.

Les alcaloïdes sont donc des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure complexe (Hemingway et Phillipson, 1980 ; Bruneton 2009). La présence d'azote confère à la molécule un caractère basique plus au moins prononcé, de distribution restreinte et douée d'activité pharmacologique significative (Roberts et Vink 1998 ; Waller et Nowacki 1978). Les alcaloïdes existent sous forme de sels (malates, méconates,

isobutyrate) et sous forme d'une combinaison avec les tanins. On distingue trois classes d'alcaloïdes :

➤ ***Alcaloïdes vrais***

Ils sont issus seulement du règne végétal, ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés.

➤ ***Pseudo-alcaloïdes***

Il s'agit dans la majorité des alcaloïdes terpéniques. Ils présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.

➤ ***Proto-alcaloïdes***

Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (**Bruneton 1987 et 2009**).

• **Propriétés physico-chimiques**

Les alcaloïdes sont de poids moléculaires extrêmement variables : de 100 à 900 Dalton, et certains peuvent atteindre un poids de 1000 g/mol (**Bruneton 2009**). Ils sont le plus souvent des solides cristallisables, rarement colorés, la plupart sont doués de pouvoir rotatoire (capables de dévier la lumière polarisée). Certains sont des liquides à température ordinaire (alcaloïdes généralement non oxygénés), ce sont des composés à caractère basique. Ils donnent des sels avec les acides minéraux (chlorures, sulfates, nitrates,), ou organiques (tartrates, sulfamates, ...).

Leur solubilité dans les différents solvants varie en fonction du pH, c'est à dire selon leur état:

- à l'état basique : ils sont solubles dans les solvants organiques non polaires et polaires et sont insolubles dans l'eau.

- à l'état sel : ils sont solubles dans les solvants polaires et l'eau et sont insolubles dans les solvants organiques non polaires.

• **Détection et caractérisation**

Les tests de caractérisation sont basés sur une extraction simple et rapide. Le plus généralement, on précipite les alcaloïdes par des réactifs généraux des alcaloïdes. L'extraction préliminaire, peut être une extraction classique qui consiste en une macération rapide dans un alcool : la solution alcoolique est évaporée et le résidu repris par de l'eau acidifiée ; après filtration les alcaloïdes sont recherchés dans le filtrat. Un autre test consiste à réaliser une macération dans de

l'eau acidifiée ; après filtration les alcaloïdes sont éventuellement révélés dans le filtrat par les réactifs généraux des alcaloïdes, par exemple les extraits secs peuvent être repris dans l'acide chlorhydrique (1N) en additionnant quelques gouttes du réactif de Wagner, afin d'obtenir un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes. La caractérisation spécifique est aussi possible pour les différents groupes des alcaloïdes, on peut ainsi utiliser le réactif de Vitali-Morin pour les alcaloïdes à noyau tropane estérifié et le réactif de Van Urk pour les alcaloïdes indoniques (**Bruneton, pour 2009**).

- **Propriétés biologiques**

Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique, en effet leurs activités pharmacologiques s'exercent dans les domaines les plus variés :

- les alcaloïdes qui agissent au niveau du système nerveux central sont soit dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine) ;

- les alcaloïdes qui interviennent au niveau du système nerveux autonome sont sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques (yohimbine), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anticholinergiques (atropine, hyoscyamine), ganglioplégiques (spartéine, nicotine).

Il est important de préciser l'existence des alcaloïdes utilisés dans d'autres domaines comme des curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), anti-tumoraux (vinblastine, ellipticine), d'antimalariques (quinine) et d'amoebicides (émétine). Les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotique comme la cyclosérine, la mytomyne (**Badiaga, 2012**).

CHAPITRE II

MONOGRAPHIE DES PLANTES ETUDIÉES

II.1. *Juglans regia*

II.1.1. Etude systématique

Selon **Mcgranahan et Chuck (2009)**, le noyer blanc ou noyer commun ou de Perse appartient au:

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Phanérogames*

S/embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

S/classe : *Apitales*

Ordre : *Amentales*

Famille : *Juglandacées*

Genre : *Juglans*

Espèce : *Juglans régia*.

II.1.2 Etude botanique

Arbre élevé de pleine lumière (figure 5) à :

- Ecorce de couleur blanc argenté mat qui reste longtemps lisse;
- Système racinaire pivotant, avec un chevelu abondant et ramifié, recouvert de mycorhizes (**Bretonneau, 1981**), ces racines sont traçantes et ont toujours tendance à remonter à la surface vers la couche fertile et aérée du sol (**Garavel, 1971**) ;
- Feuilles caduques, alternes, pétiolées, imparipennées, à 5-9 folioles ovales-aiguës, entières, glabres, aromatiques, sans stipules ;
- Fleurs verdâtres, monoïques, les mâles en chatons allongés, cylindriques, pendants, les femelles 1-4 dans un petit bourgeon à 4 écailles caduques, on peut distinguer un périanthe accompagné d'une écaille bractéale et divisé en 5-6 lobes inégaux et 14 à 36 étamines, à filets courts et anthères s'ouvrant en dehors, 2 larges stigmates courbés en dehors, l'ovaire est adhérent ;
- Fruit drupacé, arrondi, vert, formé d'un brou charnu se déchirant irrégulièrement et d'une noix à 2 valves ligneuses ridées renfermant une amande à 4 lobes sinués-lobulés (**Ait Youssef, 2006 ; Bock, 2013**).



[A] : Arbuste. [B] : Branche et fleurs et feuilles. [C] : Fruits

Figure 05 : Description botanique de *Juglans regia* (Mcgranahan et Chuck, 2009).

II.1.3 Aire de répartition du noyer

L'aire d'origine de cette espèce s'étend des moyennes montagnes d'Asie centrale (du Caucase au Turkestan), de l'Asie mineure, des Balkans et de l'Himalaya jusqu'à l'Est de la Chine (Germain, 1992 ; Ounis et Zitouni, 1996).

L'espèce existe encore à l'état sauvage sous forme de peuplement à l'Est de la Turquie, du Caucase et du Tadjikistan, au Nord de l'Irak, de l'Iran, de l'Afghanistan, du Pakistan, de l'Inde, au Népal et au Tibet, ainsi que sur les pentes Sud-Est de l'Himalaya et en Chine (Mc Granahan *et al.*, 1990). Dès l'Antiquité grecque, le Noyer commun a été cultivé et introduit en Europe puis, pendant la période romaine, en Afrique du Nord.

Il a été introduit au Chili et cultivé en Californie au XXème siècle (**Germain, 1992**). Il est également cultivé en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Afrique du Sud (**Garavel, 1959**). En Algérie, selon **Bonev (1973)**, on trouve le noyer dans le massif de l'Aurès, les régions d'Annaba, de Sétif, la grande Kabylie, Tlemcen, Tébessa, Djelfa, Saïda, près de Sougueur au sud de Tiaret.



Figure 06 : Distribution géographique du noyer

II.1.4. Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Juglans regia*

L'espèce *Juglans regia* a été abondamment utilisée en médecine; les feuilles ont été utilisées traditionnellement dans le traitement des inflammations cutanées, des ulcérations, elles ont un effet antidiarrhéique, antihelminthique, antiseptique et astringent (**Erdemoglu et al., 2003 ; Almeida et al., 2008**). En Algérie les feuilles ou folioles sont traditionnellement utilisées comme remède antiscrofuleux (censé traiter les écrouelles, ou guérir de la scrofule –lésion tumorale à type d'adénite cervicale chronique très souvent d'origine tuberculeuse : cette lésion torpide de la peau, des ganglions lymphatiques et des os forme des abcès froids, qui ont tendance à provoquer des fistules-) (**Ait Youssef 2006**). Les feuilles de noyer sont aussi utilisées contre le rachitisme, l'anémie car elles possèdent des actions fortifiante et tonifiante.

Les composés chimiques retrouvés dans les feuilles de noyer et pouvant expliquer ces actions sont les tanins et l'inositol (**Hazebroucq et Dorvault 1993**). Ce dernier joue un rôle essentiel dans les communications intracellulaires en modulant la concentration de calcium et intervient dans la mobilisation lipidique. **Paudel et al., (2013)** confirment que la présence d'eugénol et du salicylate de méthyle dans les feuilles sont compatibles avec les utilisations traditionnelles de cette plante pour traiter les maux de dents, les rhumatismes et les infections fongiques. L'écorce

des racines de cette espèce (dite Souak), est employé partout dans le monde arabe en usage externe, en mastication ou friction, pour blanchir les dents et pour rougir les lèvres et les gencives et pour combattre aussi les mauvaises haleines (**Ait Youssef, 2006**). Tandis que ses fruits verts confits sont employés pour combattre la constipation. Les usages externes de la plante sont très impressionnants tout particulièrement par leur nombre. On l'a employé pour soigner toutes sortes d'affections cutanées - eczéma, impétigo, psoriasis, abcès froids, plaies atones, de même que la transpiration excessive des mains et des pieds (**Vanier, 1999**).

D'autre part, une activité acaricide *in vitro* et *in vivo* des extraits des feuilles contre les espèces *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* a été confirmé par les travaux de **Wang et al., (2007)**. **Pereira et al., (2008)** trouvent que les fruits « noix » présentent non seulement une capacité antioxydante mais aussi antimicrobienne contre les bactéries gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) et de champignons (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*). **Serakta et al., (2013)** de leur part, trouvent que les extraits *J. regia* a un effet antileishmanioses en réduisant de façon significative ($P < 0,01$) le nombre de promastigotes. En fin, **Nabavi et al., (2011)** ont constaté que les fleurs de cette plante présentent une activité anti-inflammatoire significative.

II.1.5 Etude chimique de l'espèce *Juglans regia*

II.1.5.1 Fruits

Ils sont consommables et sont riches en acides gras insaturés (**Nabavi et al., 2011**). En effet le constituant principal des fruits est la matière grasseuse qui représente un taux allant de 78,83% à 82,14%, soit la valeur nutritionnelle autour de 720kcal pour 100g de fruits. L'acide linoléique est le principal acide gras avec une valeur maximale de 60,30%, pour certaines souches, suivie d'acides oléique, linoléique et d'acide palmitique (**Pereira et al., 2008**).

II.1.5.2 Feuilles

Elles laissent échapper une odeur aromatique et possèdent une saveur amère et astringente. Elles contiennent une huile essentielle de couleur jaune verdâtre, une matière acre appelée "juglandine" et une matière sucrée (**Lessourd, 1920**). Des Naphtoquinones dont la juglone (5-hydroxy-1,4

naphtoquinone) engendrée par oxydation de l'hydrojuglone est le principe actif le plus important pour ce végétal et il s'apparente à la lawsone (**Ait Youssef, 2006**), la juglone existe dans la plante fraîche (feuilles, brou) sous forme de glucoside du 1,4,5-trihydroxynaphtalène (2 % dans le brou, 0,6 % dans les feuilles).

Mais aussi sous forme libre, notamment dans la cire épicuticulaire (**Bruneton, 1993**). Les feuilles sont aussi riches en tanins hydrosolubles (3 à 4 % de tanins gallique et catéchiques) (**Hazebroucq et Dorvault 1993 ; Ait Youssef, 2006**). On note aussi la présence des hétérosides de flavonols (hypéroside, junglanoside), des acides phénols, des sérotonines graines : - acides gras insaturés : acide linoléique et linolénique, Inosite, carotène, pyrogallol (**Chiej, 1982**).

II.2 *Pistacia lentiscus*

II.2.1 Etude systématique

L'espèce *Pistacia Lentiscus L.* ou arbre de mastic appartient au :

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : *Spermaphyte*
- Sous-embranchement : *Magnoliophyta ou Angiospermes*
- Classe : *Magnoliopsida ou Eudicots*
- Sous-classe : *Rosidae* ou Eudicots moyennes dialypétales (plus de 90 000 espèces connues)
- Ordre : *Sapindales*
- Famille : *Anacardiaceae* qui a été proposée pour la première fois par Lindley en 1830, La composition de cette famille en genres et espèces diffère selon les auteurs. D'après **Kokwaro (1986)** et **Guyot (1992)**, elle compte 60 genres et 600 espèces. Pour **Mabberley (1987)**, elle renfermerait 73 genres et 850 espèces et le genre le plus grand en nombre d'espèce est *Rhus* avec 100 espèces. **Pell (2004)** indique qu'elle renfermerait 82 genres et plus de 700 espèces.
- Genre : *Pistacia L* (pistache) ; Le genre botanique *Pistacia* (les Pistachiers) regroupe 9 espèces d'arbustes, trois espèces sont très connues, *Pistacia lentiscus* (Lentisque pistachier) dont on extrait une résine et qui présente un feuillage persistant, *Pistacia terebinthus* arbre au feuillage caduc dont on extrait l'huile de térébenthine et enfin *Pistacia vera* (Pistachier vrai) arbuste au feuillage caduc dont on consomme les graines grillées (les pistaches) (**Coste, 1937 ; Guignard et Dupont, 2004 ; Pell, 2004**).

II.2.2 Etude botanique

Pistacia lentiscus (Darou), est un arbrisseau de 1 à 3 mètres (figure 7), à odeur résineuse forte.

Selon **More et White (2005)** cette espèce est caractérisée par :

- Ecorce: rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.
- Branches : tortueuses et pressées, forment une masse serrée.
- Feuilles : persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte.
 - Fleurs : unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe, et très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Les fleurs femelles sont vert jaunâtre et les fleurs mâles sont rouge foncé.
- Fruit : est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme, d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité en automne.
- Mastic : L'incision du tronc de cet arbuste fait écouler un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie.



Figure 07: Description botanique de *Pistacia lentiscus* (Arbuste).



Figure 08: Branche, feuilles et fleurs de *Pistacia lentiscus*



Figure 09 : Les fruits de *Pistacia lentiscus*.



Figure 10 : le Mastic de *Pistacia lentiscus*

II.2.3 Aire de répartition de l'espèce *Pistacia lentiscus* L

Les espèces de la famille des *Anacardiaceae* sont rencontrées surtout dans les régions tropicales à subtropicales mais aussi dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, la région méditerranéenne, l'Est de l'Asie et en Amérique (Kokwaro, 1986).

L'espèce *Pistacia lentiscus* L. est particulièrement représentative des milieux les plus chauds du climat méditerranéen, en effet, elle est couramment rencontrée en sites arides d'Asie et des régions méditerranéennes de l'Europe et d'Afrique (Figur 08), jusqu'aux Canaries (Bellakhdar, 2003). *Pistacia lentiscus* pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. On peut le retrouver sur tout type de sol, en association avec l'oléastre (olivier sauvage), la salsepareille et le myrte dans un groupement végétal nommé "l'Oléolentisque", mais également dans les boisements clairs à Pin d'Alep ou d'autres formations de garrigues basses.

En Algérie, cet arbuste est retrouvé sur tout type de sol, des zones subhumides et semi-arides (Smail-Saadoun, 2002), plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2000).

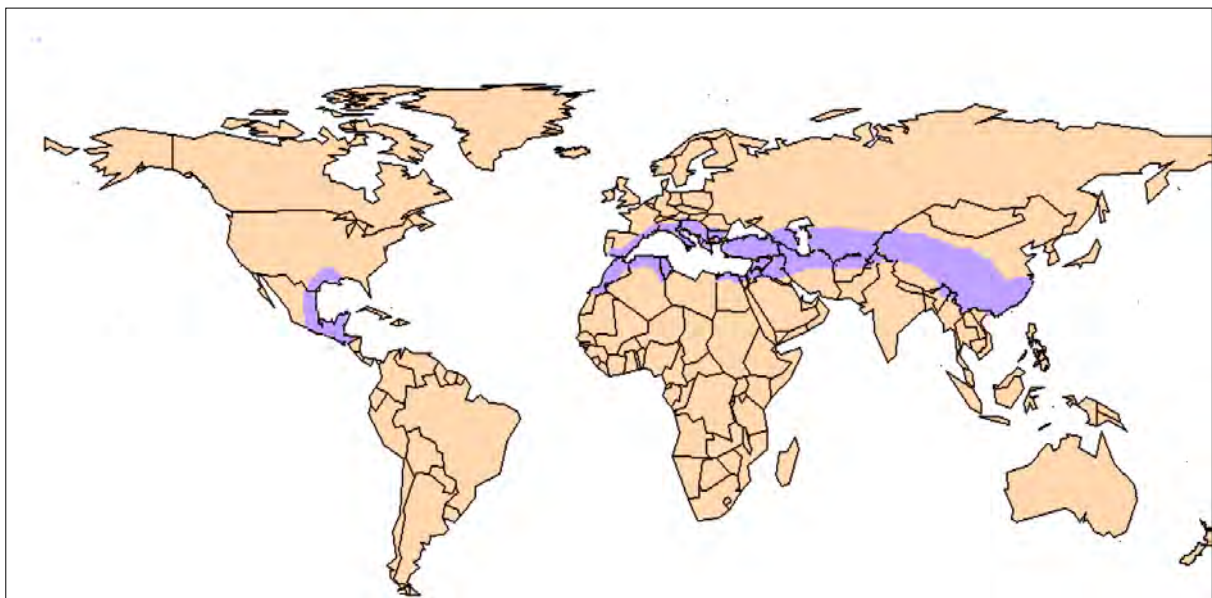


Figure 11: Distribution géographique de genre *Pistacia*.

II.2.4 Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est connue par ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. En effet, la décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Palevitch et Yaniv, 2000). La partie aérienne est traditionnellement utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (Scherrer *et al.*, 2005).

Les feuilles sont pourvues d'activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante (Villar *et al.*, 1987; Magiatis *et al.*, 1999; Janakat et Al-Meir, 2002; Kordali *et al.*, 2003; Paraschos *et al.*, 2007). Elles sont également utilisées dans le traitement l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, asthme et problèmes respiratoires (Villar *et al.*, 1987; Ali-Shtayeh *et al.*, 1998; Ali-Shtayeh *et al.*, 2000; Lev et Amar, 2002). Le mastic est connu par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (Abdel Rahman et Soad, 1975; Magiatis *et al.*, 1999; Dedoussis *et al.*, 2004; Prichard, 2004).

Par conséquent, cliniquement, le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, les diarrhées, les infections bactériennes, les ulcères gastro-dodénaux et comme un agent antiseptique du système respiratoire (Al-Said *et al.*, 1986; Huwez et Al- Habbal, 1986; Yasilada *et al.*, 1991; Marone *et al.*, 2001).

L'huile essentielle du lentisque est connue pour ses vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires (Prichard, 2004). Selon Gardeli et ses collaborateurs (2008), les huiles essentielles révèlent la présence de certaines activités antalgique, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne et cicatrisante (Djerrou *et al.* 2012)

II.2.5. Etude chimique de l'espèce *Pistacia lentiscus*

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. Ces études consacrées essentiellement au mastic ont montré la présence de flavonoïdes,

des huiles essentielles, ainsi que des triterpénoïdes (Marner *et al.*, 1991; Papageorgiou *et al.*, 1997). Cependant, on ne trouve que peu d'études qui se sont intéressées aux composés chimiques des feuilles et des fruits.

II.2.5.1. Fruits

Selon Luigia et ses collaborateurs (2007), les fruits de *Pistacia lentiscus* contiennent 5,4 mg/ml d'anthocyanines, essentiellement: cyanidine 3-O-glucoside (70%), delphinidine 3-O-glucoside (20%) et cyanidine 3-O-arabinoside (10%). Deux polyphénols, l'acide gallique et le pentagallolylucose (Abdelwahed *et al.*, 2006) et l'acide digallique (Bhourri *et al.*, 2011) ont été isolés de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de *Pistacia lentiscus*. L'huile fixe représente 38,8 % du poids des fruits, elle contient 53 % d'acide gras monoinsaturé. Le principal acide gras est l'acide oléique (50 -72%), suivie de l'acide palmitique (23,2%) et l'acide linoléique (21,7%), les autres acides gras sont retrouvés en faibles quantités [acide palmitoléique (1.3%), stéarique (1.1%), linoléique (0.8%), gadoléique (0.2%) et arachidique (trace)].

Quatre stérols ont été trouvés dans l'huile fixe, le β -sitostérol (90%), le camestérol, le cholestérol et le stigmastérol (Trabelsi *et al.*, 2011). L'huile essentielle représente 0,2% du poids des fruits, les monoterpènes à savoir, α -pinène, β -pinène, β -myrcène, limonène, et α -phellandrène sont les composés caractéristiques de cette huile. Quelques sesquiterpènes, esters aliphatiques, cétones, et des composés phénoliques (thymol et carvacrol ont été aussi identifiés (Grant *et al.*, 1990 ; Congiu *et al.*, 2002). Les travaux réalisés par Hamad et ses collaborateurs (2011) ont montré que les protéines représentent 5% du poids des fruits de *Pistacia lentiscus*. La composition minérale de ces fruits montre que la teneur en potassium est la plus élevée (2,67%), alors que celles du sodium, calcium et phosphore sont de : 0,46 ; 0,37 et 0,004 % respectivement.

II.2.5.2. Feuilles

La composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de glycosides de flavonols comme la quercétine, myricétine, lutéoline ainsi que l'isoflavone genisteine (Romani *et al.*, 2002; Stocker *et al.*, 2004; Vaya et Mahmood, 2006). Elle contient 6 à 7% de gallotannins de faible poids moléculaire, à savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3,4,5-O-trigalloyl (Romani *et al.*, 2002). L'huile essentielle représente

0,14- 0,17% du poids des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Les études phytochimiques effectuées sur les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles de lentisque des régions d'Alger, de Tizi-Ouzou et d'Oran ont montré la présence de longifolène, α -pinène, β -pinene, γ -cadinene, trans- β -terpinéol, α -acomeol, γ -muurolene, Sabinene et terpinén-4-ol (tableau 01).

Tableau 01 : Composition des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* des régions d'Alger, Tizi-Ouzou et Oran (Dob *et al.*, 2006)

COMPOSES	Teneur (%)		
	Alger	Tizi-Ouzou	Oran
Longifolène	12,8	16,4	ND
α -pinène	ND	ND	19,0
β -pinene	ND	ND	6,5
γ -cadinene	6,2	ND	ND
Trans- β -terpinéol	5,0	15,6	13,1%
α -acomeol	4,6%	ND	ND
Terpinén-4-ol	ND	7,0	ND
γ -muurolene	ND	5,7	ND
Sabinene	ND	ND	12,6

II.3 *Lawsonia inermis*

II.3.1 Etude systématique

Lawsonia inermis (Henné ou mehendi) appelé également *Lawsonia alba-Lam* ou encore *Rotanthe combretioides* Baker appartient à :

L'Embranchement : *Spermaphytes*

La Sous-embranchement : *Angiospermes*

La Classe des : *Magnoliopsida*

La Sous-classe des : *Magnoliidae*

L'Ordre des : *Myrtales*

La Famille de : *Lythraceae*: qui se compose d'environ 500 espèces

Le Genre : *Lawsonia* qui ne comporte qu'une seule espèce (**Aubreville 1950 ; Berhaut 1971-1979 ; Musa et Gasmelseed 2012 ; Sharma A et Sharma K 2013**).

II.3.2. Etude botanique

Le henné est un arbuste épineux très ramifié, généralement de taille basse (de 1 à 4 m de haut) car elle est fréquemment coupée (figure 12), mais pouvant atteindre 6 à 7 m de haut, possède des feuilles simples, entièrement glabres, opposées, elliptiques ou obovales, pointues aux deux extrémités, de couleur vert foncé, ayant un court pétiole et mesurant jusqu'à 5 cm de longueur sur 5 à 10 mm de large.

Ses cymes de fleurs blanches, jaunâtres ou rouges, de 1 cm de diamètre et ont jusqu'à 20 cm de longueur, sont groupées en panicules terminales, ces fleurs sont à quatre pétales froissées et à quatre sépales persistant autour du fruit qui est globuleux, en forme de capsule cylindrique de 5 mm de diamètre, il est d'abord rouge puis brun et s'ouvrant en quatre loges et est riche de nombreuses graines (**Boullard 2001 ; Ait Youssef, 2006**).



[A] : Arbuste de *L. inermis*



[B] : Partie aérienne avec fruit



[C] : Fleurs



[D] : Fruit



[E] : Feuilles



[F] : Poudre des feuilles séchées

Figure 12: Description botanique de *Lawsonia inermis*

II.3.3 Aire de répartition de l'espèce *Lawsonia inermis*.

Cette plante originaire de l'Inde (Vavilov 1949) ou de l'Afrique de l'Est (De Candolle 1904 ; Leung, 1980), est naturalisée principalement dans les régions tropicales et sub-tropicales de l'Asie, de l'Afrique et de l'Australie, plus rarement dans les régions tempérées (Jones et Luchainger, 1979 ; Musa et Gasmelseed 2012 ; Philippe 2013).

Elle est cultivée sous le nom de Henné en Afrique du Nord, au Moyen- Orient et en Inde occupant une aire partant de l'Afrique de l'Ouest jusqu'en Asie du sud-est. La plante est retrouvée sur tout type de sol cependant elle tolère mal les sols alcalin, elle pousse principalement le long des cours d'eau et dans les régions semi-arides et a besoin de températures élevées pour sa germination, sa croissance et son développement.

Au cours de l'apparition de précipitations hivernales, la plante se développe rapidement, émet de nouvelles pousses, puis la croissance ralentit (Boullard 2001 ; Musa et Gasmelseed 2012). La poudre de ses feuilles, dite également henné, a été largement diffusé en Europe depuis 1890 (El Babili *et al.*, 2013), actuellement elle est l'objet d'un commerce intense entre l'Afrique du nord, le sous-continent indien et l'Europe (Dalal 1986 ; Botineau 2010).

II.3.4. Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *lawsonia inermis*

Le Henné est, à la fois, une plante aromatique, rituelle et médicinale (Boullard 2001). Les médecines ayurvédique et traditionnelle en font grand usage pour soigner aussi bien les personnes que les animaux domestiques, dans toutes sortes de maladies de la peau, les brûlures, mais aussi comme antidiarrhéique, antiépileptique ou abortif (Forestier 1982 ; Botineau 2010). Les propriétés colorantes du Henné sont recherchées depuis l'Antiquité pour teindre les cheveux, colorer les ongles, et chez les Musulmans pour décorer plantes des pieds et paumes des mains (Botineau 2010).

Dès 1973, quatre fractions ayant une activité antibactérienne ont été isolés par chromatographie sur couche mince de l'extrait alcoolique des feuilles de *Lawsonia inermis*. Dont 3 ont été identifiés comme étant l'acide gallique, la lawsone (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) et le 1,4-naphtoquinone (Abd-el-Malek *et al.*, 1973). Rahmoun *et al.*, (2010) confirment l'activité antibactérienne du Lawsone contre quatre souches de bactéries pathogènes, à savoir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , et une souche multirésistante de *Candida*

albicans ATCC 10231. **Malekzadeh (1968)** trouve dans son étude que la substance antimicrobienne dans le henné est très soluble dans l'eau et que son activité inhibitrice contre *Bacillus anthracis*, a été significativement augmentée par l'élévation de température et conclut que c'est probablement la raison pour laquelle la pâte est couramment utilisée avec de l'eau chaude plutôt que froide.

La racine de la plante est traditionnellement utilisée dans le traitement de la blennorrhagie, des bronchites, ou encore comme diurétique ; les feuilles contre le panaris, l'ulcère cutané ou variqueux, l'éléphantiasis, l'hépatite, la ménorragie, la diarrhée ou comme Antihelminthique, cependant la racine, l'écorce et les feuilles sont utilisés comme substance emménagogue ou contre l'épilepsie ou lèpre (**Arbonnier, 2009**). En fin la plante est très appréciée par les moutons et n'est ni toxique ni carcinogène. Son action antitumorale a été constatée in vitro (**Forestier, 1982**).

II.3.5. Etude chimique de l'espèce *lawsonia inermis*

II.3.5.1. Fruits

Les fleurs donnent une huile essentielle. Les graines contiennent 5.6 % d'une huile fixe renfermant 10.5 % de cire et d'insaponifiable, 37.7 % d'acides solides avec une matière colorante. Les acides de cette huile sont les acides béhénique (1.69 %), arachidique (9.6 %), stéarique (15.78 %), palmitique (9.07 %), oléique (34.66 %), et linoléique (29.31 %). La distillation des graines à la vapeur d'eau conduit à l'obtention de 0.01 à 0.02 % d'huile essentielle brune formées à 90 % d'ionone (**Paris et Moïse, 1965**). Des caumarines et des xanthones sont aussi présents (**Bruneton, 1993**).

II.3.5.2. Feuilles

La phytochimie des feuilles de Henné a été largement étudiée. Déjà en 1920 la structure chimique de la Lawsonsone : $C_{10}H_6O_3$ ou 2 hydroxy 1,4 naphthoquinones et son activité tinctoriale ont été découvertes (**El Babili et al., 2013**), la Lawsonsone qui représente le principe actif le plus important des pigments flavoniques, et surtout naphthoquinoniques (196 environ), a la forme d'un glucoside et représente un taux de 0.5 à 1 % de la composition des feuilles (**Goetz et Busser 2007**), elle se forme par hydrolyse enzymatique des glycosides (hennosides A, B et C) et auto-oxydation de l'aglycone libéré.

Cette substance cristallise en aiguilles rouge orangé, sublimables, très peu solubles dans l'eau froide, plus solubles à chaud, solubles dans les solvants organiques, et dans les solutions aqueuses alcalines en donnant une coloration rouge orangé.

Parmi les autres constituants principaux, nous trouvons aussi des acides organiques dont l'acide gallique (Nakhala *et al.*, 1980), des coumarines (Dzhuraev *et al.*, 1982), des polysaccharides (mucilages 11%) dont la B-sitosterol glucoside (Mahmoud *et al.*, 1980), des pigments flavoniques (Afzal, 1980), des quinoides (Nakhala *et al.*, 1980), des dérivés naphthalains (Afzal, 1980), et des xanthones (Bhardwaj *et al.*, 1978). De plus les feuilles de henné renferment 8 à 10 % d'eau, 10 % de matières minérales (Paris et Moyse, 1965), 7 à 8% de tanins, 6 % de lipides, 2 % de résine.

CHAPITRE III

LES SOUCHES ETUDIÉES ET LEURS EFFETS

III.1. Généralités sur la systématique des champignons

Les Champignons encore appelés "Fungi" (du latin) ou Mycètes (du grec mukês, champignon), constituent aujourd'hui le cinquième règne du monde vivant appelé règne Fongique, c'est un large groupe diversifié qui possède des caractéristiques communes avec les plantes inférieures et les animaux inférieurs (**Nikoh N *et al.*, 1994 ; Bouchet P *et al.*, 1999 ; 2005**). Le Règne fongique comprend actuellement environ 70 000 espèces recensées (parmi lesquelles 13 500 sont lichénisées et font l'objet d'une science autonome : la Lichénologie) mais les estimations actuelles, proposées par extrapolation, évaluent le nombre effectif de champignons à la surface de la planète, à plus d'un million d'espèces (**Bouchet *et al.*, 2005**).

Le Règne des *Mycètes* est constitué d'organismes eucaryotes, principalement multinucléés dont les noyaux sont dispersés dans un mycélium avec paroi ; pouvant donner naissance à des spores sexuées ou asexuées (**Hamoir *et al.*, 2001**). Ces mycéliums, sont principalement des organismes terrestres dont les cellules sont organisées en un appareil végétatif primitif, le thalle, chez la majorité des espèces fongiques, le thalle est formé d'un enchevêtrement de filaments. Ce thalle est responsable de la nutrition, des échanges ioniques et aqueux.

Les organismes de ce Règne étudiés jusque-là par les mycologues, peuvent être répartis en trois groupes d'origines phylogénétiques diverses :

1 – Les *Myxostelideae* : classiquement appelés Myxomycètes possèdent un plasmode et assurent leur nutrition par phagocytose (certains parmi eux sont classés de nos jours dans les Protistes, les autres ne peuvent que faire l'objet d'un règne autonome).

2 – Les *Stramenopila* : le groupe monophylétique des *Stramenopila* contient les Oomycètes (comme les mildious), les diatomées, les Algues brunes, etc. Les mycologues étudient depuis toujours les Oomycètes.

3 – Les *Mycota* : correspondent au règne fongique actuel au sens strict. Ces organismes ont une reproduction sexuée et produisent des spores non (ou uni) flagellés. Ils sont classés en quatre grandes divisions :

- les *Chytridiomycota* produisant des spores mobiles uniflagellées ;
- les *Zygomycota* à spores non flagellées et à thalle siphonné (Trichomycètes et Zygomycètes);
- les *Ascomycota* à spores non flagellées, à thalle septé et formant en général 8 ascospores à l'intérieur de chaque asque (méiosporange ou cellule fertile dans laquelle se déroule la caryogamie et le brassage génétique) ;
- les *Basidiomycota* à spores non flagellées, à thalle septé et formant en général 4 basidiospores à l'extérieur de chaque baside (méiosporange).

L'ancienne division des *Deuteromycota* ou « champignons imparfaits » se répartit aujourd'hui sur les *Ascomycota* ou les *Basidiomycota* pour les formes asexuées tandis que les formes sexuées n'ont pas encore une affectation définitive (**Kpemissi, 2007**).

Une deuxième classification pratique et non réellement taxonomique basée sur la morphologie du thalle peut être utilisée, ainsi, on classe les champignons en trois groupes : les champignons filamenteux, les levures et les champignons dimorphiques (**Grillot, 1996**).

III.2. Cas des champignons filamenteux

Pour ces Champignons le thalle est constitué de filaments (cloisonnés ou non) appelés aussi hyphes. L'ensemble des filaments enchevêtrés constitue le mycélium. Il s'agit d'éléments tubulaires, d'un diamètre de deux à dix μm . Ces champignons filamenteux regroupent également un grand nombre de micromycètes médicalement importants. Selon les effets, ils sont divisés en deux groupes : dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*.) et moisissures ou contaminants (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, etc.).

III.2.1. Dermatophytes

Les dermatophytes (du Grec derma = peau et phyton = plantes) (**Bouchet, 2005**) sont des champignons kératinophiles et kératinolytiques, responsables des dermatomycoses c'est-à-dire des mycoses dues à des champignons ne se développant que dans la couche cornée épidermique et les phanères, aux dépens de la kératine (**Boiron, 2005**). Les dermatophytes utilisent comme

substrats naturels des structures kératinisées éliminées dans l'environnement, tandis que les espèces parasites envahissent le *stratum corneum* de l'épiderme ainsi que les phanères (poils ou cheveux, griffes ou ongles).

Les dermatophytes pathogènes restent généralement confinés à ces tissus, et n'atteignent que rarement les couches les plus profondes de la peau et très exceptionnellement les organes internes. On distingue trois groupes de dermatophytes (Tableau 02) : anthropophiles, zoophiles, telluriques (Ouraini *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2006). Les espèces anthropophiles, sont des parasites obligatoires de l'Homme ; ils se transmettent essentiellement par contagion, interhumaine mais peuvent occasionnellement infecter l'animal.

Les dermatophytes zoophiles ont pour réservoir une ou plusieurs espèces animales, cependant ils sont souvent isolés lors de dermatophytoses humaines, et certaines espèces comme *Microsporum canis* et *Trichophyton verrucosum* infectent l'homme très facilement (Brouta *et al.*, 2001). Les dermatophytes géophiles ou telluriques sont quant à eux, des saprophytes vivant dans le sol. Toutefois, ils peuvent accidentellement être à l'origine d'une infection humaine ou animale, par exemple suite au contact entre une peau lésée et un sol contaminé (Feuilhade *et al.*, 2002). Les trois principaux genres de cette classe sont : *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* (figures 13 et 14, 15).

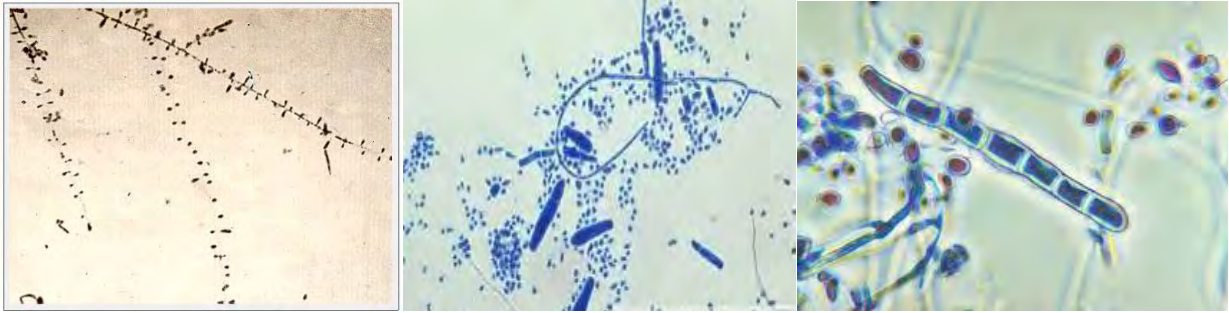


Figure 13: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de *T. rubrum* : Macroconidies en saucisse et microconidies piriformes disposées en « acladium » (Fathallah et Saghrouni, 2008).

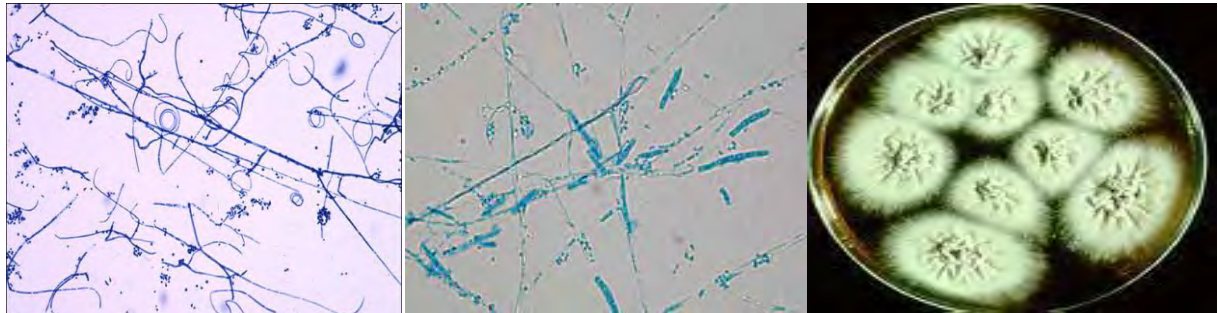


Figure 14: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de *T. mentagrophytes* Filaments épais articulés à angle droit, porteurs de très nombreuses microconidies rondes parfois piriformes en grappe (Fathallah et Saghrouni, 2008).



Figure 15: Aspect microscopique des cultures des souches fongiques de *M. canis* Filaments rayonnant en étoile, macroconidies en quenouille à paroi très épaisse et, pourvues de nombreuses logettes et de deux extrémités pointues (Fathallah et Saghrouni, 2008).

Tableau 02: Les principaux dermatophytes et leur habitat d'origine préférentiel

NATURE	GENRE	ESPECES
Espèces anthropophiles	<i>Microsporium</i>	<i>M. audouinii</i> var. <i>langeronii</i> <i>M. ferrugineum</i>
	<i>Trichophyton</i>	<i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. concentricum</i>
	<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>
Espèces zoophiles	<i>Microsporium</i>	<i>M. canis</i> <i>M. persicolor</i> <i>M. praecox</i> <i>M. equinum</i>
	<i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. erinacei</i> <i>T. equinum</i> <i>T. gallinae</i> <i>T. verrucosum</i>
Espèces telluriques	<i>Microsporium</i>	<i>M. gypseum</i> <i>M. fulvum</i>
	<i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. terrestre</i> <i>T. ajelloi</i>

III.2.2 Contaminants opportunistes ou moisissures

Ce sont des filamenteux normalement, très répandus dans la nature, inoffensifs mais devenant pathogènes lorsqu'il existe des conditions générales (immunodéficience) ou locales (hypersensibilité) permettant leur pénétration et leur prolifération. Ils se nourrissent à partir de substrats azotés ou carbonés. Leur propagation est assurée par des spores, provenant d'une reproduction asexuée ou sexuée. Ce groupe renferme de nombreux champignons opportunistes tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. *Aspergillus flavus* est responsable de l'aspergillose sinusale, aviaire et rarement pulmonaire ; de l'otomycose et de la kératomycose. C'est aussi l'agent de l'aflatoxicose. *Aspergillus fumigatus* est responsable des aspergilloses (mycoses profondes) humaines et aviaires, de l'otomycose, des allergies, des sinusites fongiques, des

mycotoxicoses dues à la sécrétion de toxine (Vanbreuseghem *et al.*, 1978 ; Grigoriu *et al.*, 1986 ; Segretain *et al.*, 1987 ; Bouchet *et al.*, 1989; Bouchet *et al.*, 2005 ; Botton *et al.*, 1990).

III.3 Cas des levures et champignons levuriformes

III.3.1 Les levures

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires de forme sphérique ou ovoïde, elles ont un thalle constitué d'éléments unicellulaires appelés blastospores et mesurent de quatre à dix μm . Ces champignons se reproduisent par un phénomène asexué (bourgeonnement), auquel peut s'associer, selon les espèces, une reproduction sexuée. Les levures sont cosmopolites.

Dans les conditions normales, elles ne sont pas pathogènes, il faut des circonstances particulières pour qu'elles le deviennent : diminution des défenses immunologiques, modification hormonales spontanées ou iatrogènes par administration de contraceptifs oraux, d'antibiotiques, de corticoïdes ou d'immunodépresseurs, altérations préalables de la peau, des muqueuses ou des viscères.

Les levures sont responsables des levuroses qui sont des mycoses (affections cutanées, muqueuses, viscérales et septicémiques) (Vanbreuseghem *et al.*, 1978 ; Grigoriu *et al.*, 1986 ; Segretain *et al.*, 1987 ; Bouchet *et al.*, 1989, 2005) . Dans ce groupe figurent des genres comme *Candida* (figure 11), *Cryptococcus* et *Malassezia* qui sont très importants médicalement.

➤ *Candida albicans*

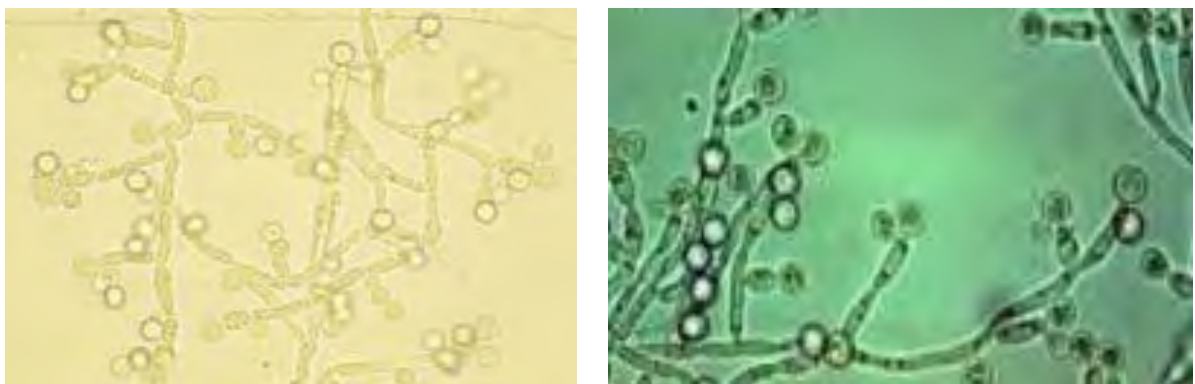


Figure 11: Aspect microscopique de culture de souche de *Candida albicans* : levure non capsulée, non pigmentée (Fathallah et Saghrouni , 2008).

Ce sont des champignons à formes variées. Ils sont le plus souvent globuleux, arrondis ou ovalaires, à bourgeonnement multiple. Couleur blanc cassé à crème, surface cireuse. *Candida albicans* se trouve dans les cavités naturelles de l'homme et de certains animaux. En pathologie, *Candida albicans* est la cause, dans 70 à 80 % des cas de candidoses humaines (**Bouchet et al., 2005**). C'est l'agent des mycoses cutanées (impétigo) et unguéales (intertrigos), des mycoses digestives (muguet et buccal), intestinales, biliaires et génitales, des mycoses broncho-pulmonaires, viscérales (abcès cérébraux).

Très souvent, les candidoses orales sont une manifestation initiale du Sida chez les patients à haut risque (**Klein et al., 1984**). L'extension de la candidose buccale à l'œsophage provoque des oesophagites caractérisées par des brûlures à la déglutition. L'intestin grêle, mais surtout le colon, peuvent être atteints ; la mycose se manifeste alors par des douleurs abdominales, des diarrhées irritantes et abondantes. 15 à 30% de la population sont porteurs sains (**Bouchet et al., 2005**).

III.3.2 Les champignons levuriformes

Ce sont des levures rondes à ovoïdes entourées d'une grosse capsule gélatineuse formée de mucopolysaccharides, non filamenteuses à bourgeonnement multilatéral. On note une absence de mycélium et de pseudomycélium. Les colonies sont blanchâtres ou jaunâtres, elles sont lisses, brillantes, à surface crémeuse ou mucoïde.

➤ ***Cryptococcus neoformans*** : (San Felice) Vuillemin

Habituellement saprophyte, *Cryptococcus neoformans* ne devient pathogène que lorsque les résistances de l'hôte sont affaiblies. Il est aussi pathogène expérimentalement. C'est l'agent responsable de la cryptococcose (mycose systémique profonde, cosmopolite subaiguë ou chronique du système nerveux central et des méninges dont la porte d'entrée est en général pulmonaire ; des lésions cutanées secondaires peuvent se manifester sous forme d'acné, de nodules ou d'ulcération cutanées).

La cryptococcose peut atteindre aussi les viscères, les os, la peau et les muqueuses. L'infection généralisée par *Cryptococcus neoformans* peut entraîner la mort. Chez les malades du SIDA, il attaque le cerveau, les méninges ainsi que les poumons (**Bossche et al., 1990**). La principale

espèce pathogène : *Cryptococcus neoformans*, comporte trois variétés : *C. neoformans var. neoformans*, *C. neoformans var. gattii* et *C. neoformans var. grubii*. La première se retrouve communément en Amérique et en Europe, dans les fientes d'oiseaux. Elle représente l'espèce presque toujours en cause lors de cryptococcose chez les patients atteints de SIDA (**Dupont, 1992**). La seconde est liée aux arbres d'*Eucalyptus*, qui constituent leurs biotopes.

III.4. Effets des champignons sur l'homme et les animaux

La plupart des Mycètes sont saprophytes, excepté les Champignons parasites responsables de certaines maladies et qui peuvent infecter les plantes et les animaux. Toutefois les agents des teignes, les dermatophytes, sont pour leur grande majorité des champignons strictement parasites. Le développement d'une pathologie fongique chez l'humain et l'animal dépend souvent de facteurs prédisposant comme l'existence de pathologies concomitantes, d'évènements associés (chirurgie, traitements antibiotiques) ou de facteurs environnementaux (conditions d'élevage favorisant les contacts rapprochés....) (**Hamoir et al., 2001**).

L'homme et les autres animaux peuvent subir plusieurs effets des champignons filamenteux et levuriformes ; les infections fongiques restent les plus graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives (**Hulin et al., 2005**) de plus plusieurs de ces champignons sont doués de redoutables facultés d'adaptation et il faut sans cesse trouver de nouveaux médicaments ou de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour lutter contre l'émergence d'espèces résistantes d'où l'importance du développement de la phytothérapie comme alternative thérapeutique efficace (**Delahousse, 2003**).

Tableau 03 : Habitat, groupe et répartition, et maladies causées par les souches fongiques étudiées (Kpemissi, 2007)

SOUCHES FONGIQUES	HABITAT	GROUPE ET RÉPARTITION	MALADIES CAUSEES
<i>Candida albicans</i>	Muqueuses de l'homme et des animaux	Endo- saprotrophe Cosmopolite	Candidoses Onychomycoses
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Cheval, souris, chien, chat et sol	Dermatophyte Cosmopolite	Dermatophytose Lésions inflammatoires de la peau glabre
<i>Trichophyton rubrum</i>	Homme	Dermatophyte Cosmopolite	Dermatophytose Lésions interdigito plantaires et des onyxis
<i>Microsporum Canis</i>	Animaux	Dermatophyte	Dermatophytose Teignes tondantes

Les affections à dermatophytes sont cosmopolites fréquemment rencontrées tant chez l'Homme que chez l'animal, contrairement à la plupart des autres champignons pathogènes, les dermatophytes sont des parasites obligatoires infectant des individus en bonne santé, et les infections dont ils sont responsables sont contagieuses (**Brouta et al., 2001 ; Feuilhade et al., 2002 ; Wang et al., 2006**). On distingue trois types de mycoses :

- *Mycoses exclusivement superficielles* : elles comportent deux catégories : les dermatophyties qui sont des lésions de la peau et des phanères provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles, capables d'envahir les cheveux, les poils, les ongles et les couches superficielles de l'épiderme et le pityriasis versicolor qui se manifeste par l'apparition de taches pigmentées et squameuses, principalement sur le torse et la racine des membres ; l'infection superficielle à dermatophyte est l'une des maladies dermatologiques les plus communes (**Brouta et al., 2001 ; Feuilhade et al., 2002**).
- *Mycoses cutané-muqueuses* : ce sont principalement des candidoses. On distingue les candidoses digestives, les candidoses génitales et les candidoses cutanées ; elles ont toujours un caractère opportuniste ;

- *mycoses profondes* : c'est aussi des candidoses dites disséminées ou invasives ou systémiques (pour désigner la dissémination dans l'organisme par voie hématogène d'une levure habituellement saprophyte), les aspergilloses (l'aspergillose est la plus répandue des mycoses pulmonaires ; l'*Aspergillus* se comporte comme parasite ou allergène avec les manifestations correspondantes) et les cryptococcoses [(la cryptococcose neuro-méningée représente aujourd'hui 10% des infections observées chez les malades atteints du sida. Sans thérapeutique, elle est mortelle dans 100% des cas) (Perrier *et al.*, 1988)]. Selon une étude de ce même auteur, les infections de tous genres dont on observe la régulière augmentation de fréquence ces dernières années concernent surtout les mycoses profondes et les infections « opportunistes » de telle sorte que les antifongiques prennent actuellement une place croissante au sein de l'arsenal anti-infectieux.

TRAVAUX
PERSONNELS

CHAPITRE I MATERIELS ET METHODES

I.1 Matériels

I.1.1 Choix et identification du matériel végétal

Pour cette étude, le matériel végétal a été récolté dans plusieurs localités et acheminé sur Constantine (Tableau 4). Les études phytochimiques et les activités biologiques ont été réalisées d'une part, au laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) de la faculté des sciences exactes ainsi qu'au Laboratoire de Biochimie Micro-Moléculaire et Phytochimie du département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Constantine et d'autre part, au laboratoire de parasitologie et microbiologie du CHU de Constantine.

I.1.2 Espèces végétales étudiées

Sur la base des données de la littérature et des données ethnobotaniques recueillies auprès des tradithérapeutes, guérisseurs et les revendeurs de plantes médicinales, nous avons retenu trois espèces pour nos tests antifongiques (Tableau 4). La sélection de ces trois espèces fait suite également à un travail de criblage préliminaire réalisé dans notre laboratoire (**Hammimed, 2009**), recherchant les extraits végétaux potentiellement antifongiques.

En effet, ces espèces sont souvent utilisées localement dans le traitement de diverses affections dont celles de la peau. La recherche des produits naturels utilisés contre les dermatophyties et les mycoses cutanéo-digestives, à partir des pratiques de la médecine traditionnelle, a également orienté notre choix.

I.1.2.1 Collecte et conservation du matériel végétal

Le matériel végétal a été obtenu à partir de plantes se développant dans leur habitat naturel ou auprès d'herboristes. Leur identification a été réalisée par un taxonomiste confirmé, et les vouchers spécimens (N°AB04-xx) déposés dans l'herbier du laboratoire de Botanique Médicale et de pharmacognosie du département de pharmacie de la faculté de médecine, Université Constantine 3.

Tableau 4 : Espèces utilisées pour le criblage phytochimique et les tests antifongiques

Espèces végétales (Famille)	Code	Nom commun et vernaculaire	Lieu de récolte	Voucher spécimen N°
<i>Lawsonia inermis L.</i> (<i>Lythraceae</i>) Feuilles	LIN	Henné "hanna"	Herboriste – Souk de Ain Smara (Constantine)	AB04 – 111
<i>Pistacia lentiscus L.</i> (<i>Anacardiaceae</i>) Feuilles	PLE	Lentisque "derw"	Côte montagneuse de Chetaibi (Annaba)	AB04 – 116
<i>Juglans regia L.</i> (<i>Juglandaceae</i>) Ecorce	JRE	Noyer "swak"	Campus universitaire de Chihani-Bachir (Constantine)	AB04 – 109

I.2 Méthodes et techniques

I.2.1 Méthode d'obtention des extraits totaux

I.2.1.1 Préparation de l'échantillon végétal

Les plantes séchées ont été pulvérisées tout juste avant l'extraction en utilisant un broyeur à couteaux. L'extraction des poudres obtenues (30g) s'est faite par macération à froid dans une solution hydroalcoolique à 70% d'éthanol (1:5 ; v/v), agitée sur une plaque magnétique (700 tr/mn pendant 30mn). Les solutions sont ensuite clarifiées par filtration sur papier wattman, concentrées par évaporation d'alcool sous vide, puis lyophilisées pour fournir un extrait brut sec à consistance sec plus ou moins pulvérulent. Ces derniers sont conservés jusqu'à l'analyse à basse température (-10°C).

Pour l'analyse phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique *In vitro* des espèces étudiées, une extraction des principes totaux comportant les grands groupes chimiques a été nécessaire. L'extraction a été faite dans le Laboratoire de Botanique Médicale et de pharmacognosie, département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université de Constantine 3.

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles de *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* et d'écorce de la plante *Juglans regia*. Les matières végétales récoltées et séchées à la température ambiante du laboratoire ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique à couteau. L'extrait a été préparé selon la méthode décrite par Zirihi et al. (2007) et Bagre et al. (2007).

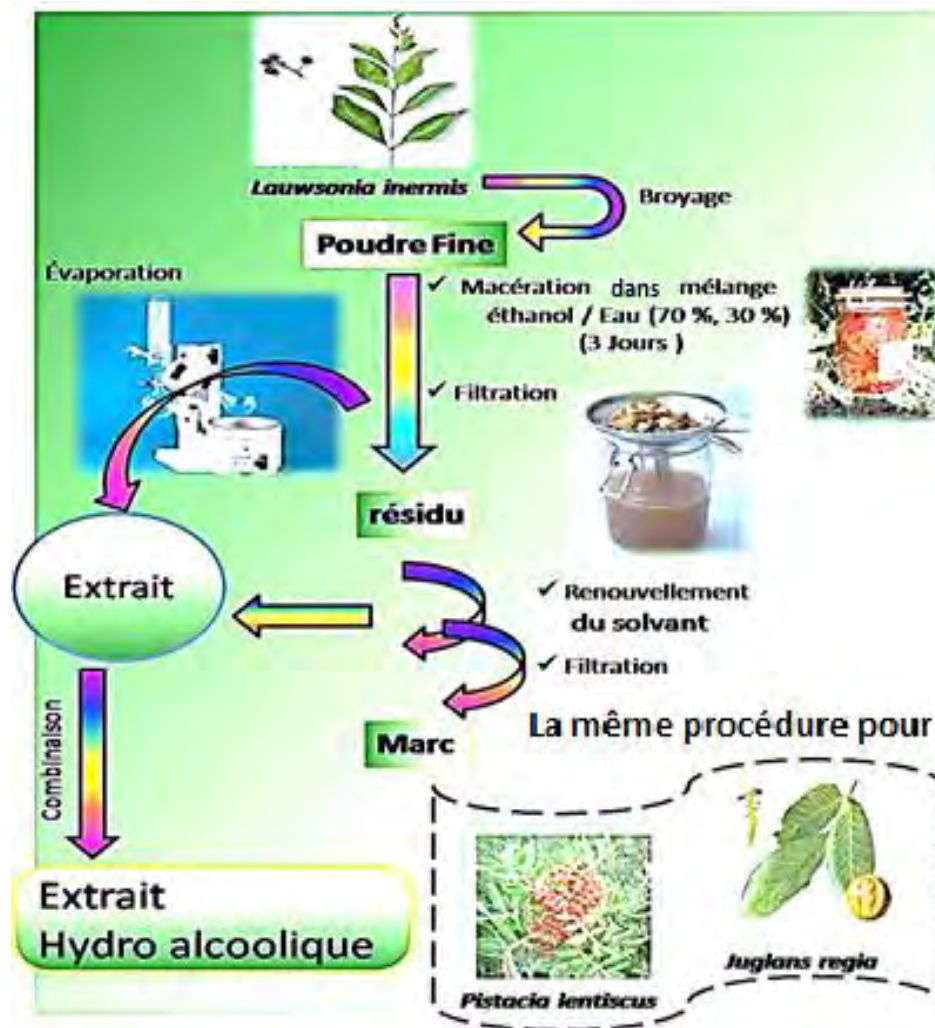


Figure 17 : Extraction des plantes étudiées

I.2.2 METHODES D'ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS

La découverte des ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans la plante. Ces dernières peuvent servir, non seulement à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matériaux économiques (**Bruneton, 1999**).

I.2.2.1 Réactions de caractérisation

L'analyse phytochimique sommaire est réalisée sur la base des tests de solubilité, de précipitations et de réactions de colorations caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. La plupart des tests sont effectués selon la technique de **Harbone (1973) et (Bruneton, 1993)**.

Les réactions de caractérisation ont porté sur la recherche, dans les poudres des plantes, des principaux groupes chimiques. Ces tests permettent d'avoir des informations sur la composition chimique des plantes. Les groupes chimiques présents dans nos échantillons ont été caractérisés par des réactions en tubes. Les résultats sont classés selon :

- Réaction franchement positive : + + + +
- Réaction positive : + + +
- Réaction moyennement positive : + +
- Réaction louche : +
- Réaction négative : -

I.2.2.1.1 Détection des polyphénols

Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié des groupements hydroxyles (**Hennebelle et al., 2004**).

- Détection des tanins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles. On distingue des tanins galliques ou éllagiques qui sont des esters de l'acide gallique et du glucose. Ce sont des composés hydrolysables

et des tanins catéchiqques ou tanins condensés non hydrolysables. L'importance des drogues à tanins est liée à leur propriété tannante (Bruneton, 1993 ; Diallo 2005).

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl₃ (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqques (Figure 18) (Karumi et al., 2004 ; Gacem, 2011).

- Détection des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très répandus chez les végétaux. Ils sont responsables de la coloration jaune de certaines fleurs et de certains fruits. Ils se trouvent le plus souvent sous la forme d'hétérosides ou de flavonosides (Paris et Hurabielle, 1981). Leur présence ou leur absence dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé " réaction de Shinoda" (Lock et al., 2006). Le test consiste à ajouter à 2ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur (rose, orange ou rouge) (Malec et Pamilio, 2003).

- Détection des coumarines

Les coumarines viennent du mot « coumarou » non vernaculaire de la fève de Tonka (*Coumarouna odorata* Légumineuse). Ce sont des dérivés de la benzo α -pyrone ou de la lactone de l'acide O hydroxy-cinnamiques. Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone insaturée notamment l'ouverture de l'anneau lactonique en milieu alcalin (Bruneton, 1993).

Les coumarines sont révélés à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est ajouté à 1ml d'eau chaude. Après agitation, le volume total est divisé en deux volumes, l'un sert de témoin et l'autre est ajouté à 0.5 ml de NH₄OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (Bruneton, 1999).

I.2.2.1.2 Détection des alcaloïdes (Dohou et al., 2003).

La majorité des principes actifs des plantes médicinales est issue des alcaloïdes et des hétérosides. Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, qui se comportent comme des bases donnant des réactions de précipitations avec certains réactifs (Paris et Hurabielle, 1981).

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,2ml, sur lequel 1,5 ml de HCl à (2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer ou Wagner sont

ajouté. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Figure 20) (Mojab et al., 2003).

I.2.2.1.3 Détection des terpènes

La structure des terpènes est formée dans la majorité des cas de l'union de deux ou de plusieurs molécules d'isoprènes C_5H_8 . Ce sont des constituants odorants des essences végétales (**Paris et Moyses, 1976**).

La mise en évidence des stérols et triterpènes est fondée sur la réaction de Lieberman-Burchard. Les extraits des trois variétés sont additionnés chacun de 0.5ml d'anhydride acétique puis de 0.5ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 1ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de stérols et de triterpènes (**Bruneton, 1999**).

I.2.2.1.4 Détection des saponosides

Ce sont des hétérosides de stérols et de triterpènes très répandus chez les végétaux. Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives (abaisse la tension superficielle). Ils se dissolvent dans l'eau en formant une solution moussante (aphrogènes) (**Bruneton, 1993**).

Pour la détection des saponosides, 10 ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Malec et Pamilio, 2003 ; Mojab et al., 2003 ; Koffi et al., 2009**).

Toutes les expériences sont réalisées en triplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats. Les figures (18, 19 et 20) résument les différentes étapes de détermination de ces composés phytochimiques

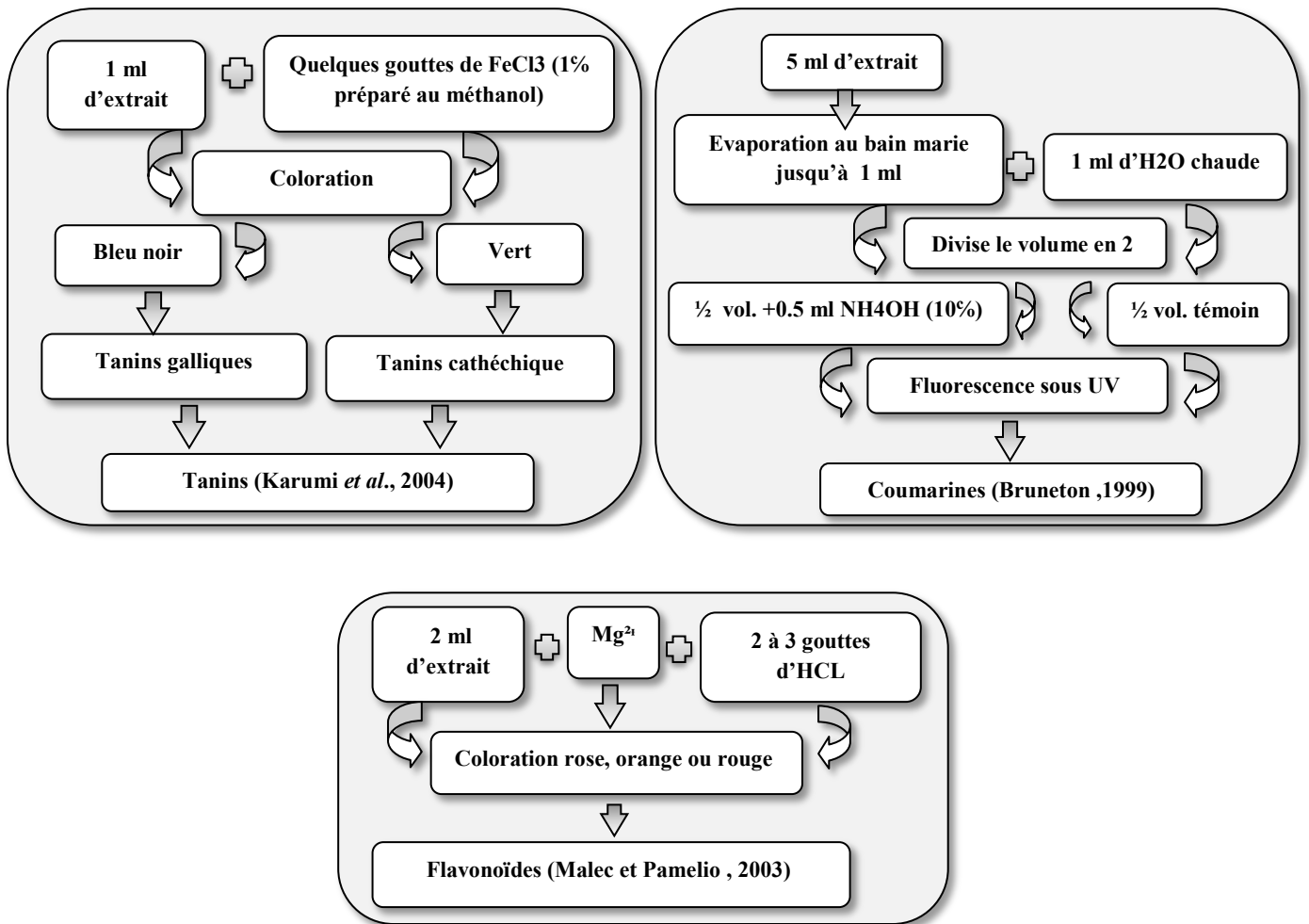


Figure 18 : Schémas des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols

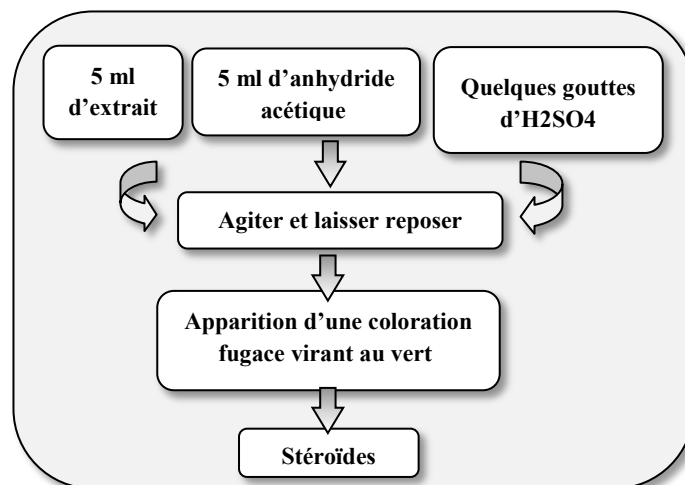


Figure 19 : Schéma du test phytochimique pour la détection des stéroïdes (Bruneton, 1999)

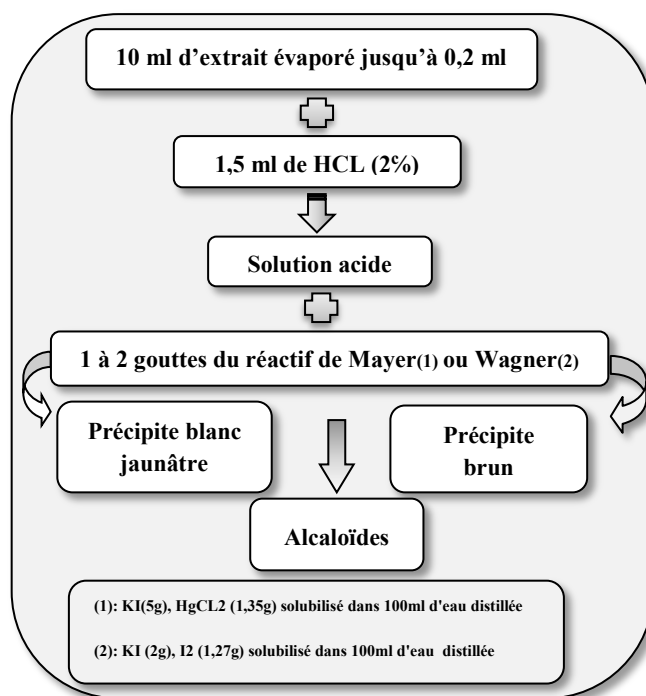


Figure 20 : Schéma du test phytochimique pour la détection des alcaloïdes (Mojab *et al.*, 2003).

I.2.2.2 Préparation des extraits pour l'affrontement (partitions entre solvants)

Les feuilles de *Lawsonia inermis* et *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Juglans regia* ont été soumis aux tests phytochimiques. Au cours de ces tests, cinq solvants de polarité différente (éther de pétrole (EP), éther diéthylique (ED), acétate d'éthyle (AC), 1 butanol (1B) et méthyle éthyle cétone (MEC)) ont été utilisés pour l'extraction des différentes familles de composés chimiques. A partir de nos extraits à tester, 2g ont été dilués dans 100ml d'eau distillée dans un bain marie. Cette phase aqueuse contenant les phytoconstituants totaux est laissée au repos une nuit dans une éprouvette graduée (décantation des impuretés et poussières) (Merghem *et al.*, 1995). Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation ; en les affrontant avec plusieurs solvants spécifiques allant du moins polaire au plus polaire.

- **Etape 1 : Extraction à l'éther de pétrole**

Dans une ampoule à décanter, on introduit 100ml de la solution aqueuse et on ajoute 100ml d'éther de pétrole. On remue énergiquement avec précaution. L'éther de pétrole solubilise tous les constituants lipophiles, la chlorophylle ainsi que les composés indésirables. La phase éther de pétrole (phase supérieure de l'ampoule à décanter) est éliminée. La phase eau (phase inférieure

de l'ampoule à décanter) est récupérée dans un bécher propre. Cette phase sera soumise à une extraction sélective par l'éther diéthylique (ED) puis par l'acétate d'éthyle (AC) ensuite par le méthyle éthyle cétone (MEC). Ces trois solvants organiques sont spécifiques des composés phénoliques et des flavonoïdes.

- **Etape 2 : Extraction à l'éther diéthylique**

Dans une ampoule à décanter, 100ml de la phase eau sont mélangés à 100ml d'éther diéthylique, on agite énergiquement avec précaution en laissant sortir à chaque fois les gaz produits et on laisse reposer jusqu'à la formation de 2 phases : une supérieure appelée phase éther et une inférieure appelée phase eau, cette dernière est récupérée dans un bécher et la phase éther est laissée à l'air libre sur une source chaude afin d'accélérer l'évaporation. Les molécules sont ensuite récupérées dans 3ml de méthanol dans des tubes en verre. L'affrontement avec l'éther diéthylique permet, pour les extraits éthanoliques, d'isoler (de soutirer) les composés phénoliques simples tels que les acides phénols et les flavones lipophiles. Pour les extraits acétoniques, cette phase soutire les tannins monomériques

- **Etape 3 : Extraction à l'acétate d'éthyle**

L'affrontement avec l'acétate d'éthyle entraîne les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits éthanoliques et les tannins dimériques des extraits acétoniques.

- **Etape 4 : Affrontement avec le butanone (Méthyl-Ethyle-Cétone (MEC)) et le 1butanol**

Cette étape n'est faite que pour les extraits acétoniques, permettant ainsi d'entraîner les tannins trimériques, oligomériques et une partie des polymériques.

Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux à trois fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés. La figure 21 ci-dessous résume les différentes étapes d'affrontements de nos extraits.

Les phases éther de pétrole ne renfermant pas de composés phénoliques sont rejetées. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif et reprises dans 4 à 5 ml de méthanol pour le diagnostic chromatographique.

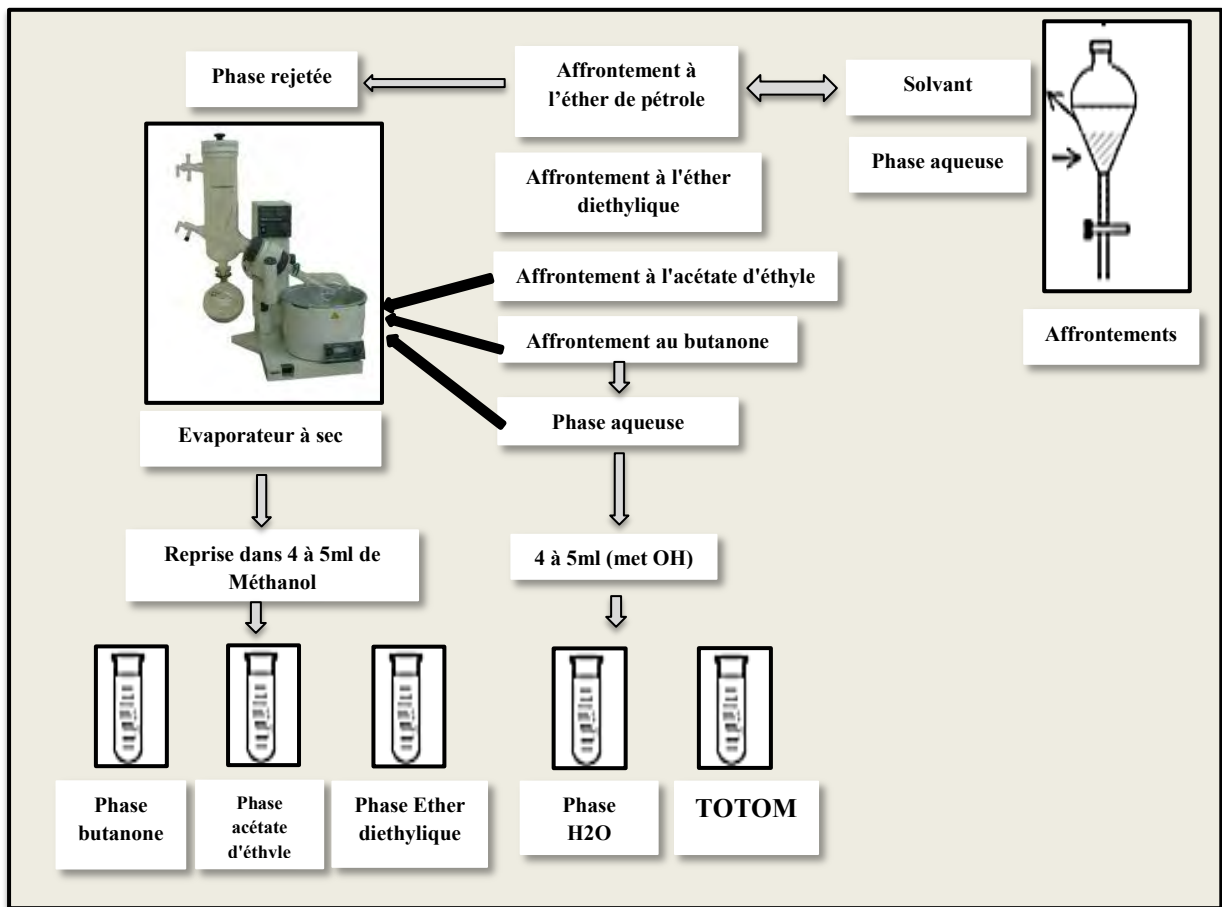


Figure 21 : Protocole d'extraction (Merghem et al., 1995)

I.2.2.3 La chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

La CCM ou TLC (Thin Layer Chromatography) est une méthode très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification. Elle se sert de diverses phases stationnaires et de systèmes d'éluents solvants appropriés

Cette méthode qui repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (Ekoumou, 2003) qui est en général un mélange de solvant; adapté au type de séparation recherchée (Ferrari, 2002), et à leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et flavonoïque de l'extrait. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très

reproductibles (Bataille, 2000 ; Marston et Hostemann, 2006). Aussi, permet-elle de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant (Delmeyda, 2001 ; Knezevic et al, 2012). Elle consiste à la séparation et la caractérisation des solutés entre deux phases non miscibles. La séparation des solutés entre les phases stationnaires et mobiles se fait selon leur différence de solubilité.

Pour la séparation de nos composés nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince sur plaque de verre de polyamide et sur plaque en aluminium pré-étalée de gel de silice (silicagel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm d'épaisseur).

I.2.2.3.1 Principe

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants et une phase stationnaire (gel de polyamide, gel de silice, alumine) qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage.

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil (dans notre cas : le méthanol). Le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire.

Les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque (Delmeyda, 2001). Cette méthode utilisée de manière analytique donne une idée sur la composition de l'extrait à étudier. De manière préparatoire, elle permet des séparations correctes suivies de purifications.

I.2.2.3.2 Mode opératoire

- **Préparation des plaques**

Pour la CCM des flavonoïdes, on utilise un gel de polyamide DC6 (Macherey Na gel, 516 Duren) sur des plaques en verres (20x20 cm). Le gel est préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 50ml d'éthanol. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation.

- **Choix de la phase mobile**

Lors du choix de la phase mobile pour le développement des plaques de CCM, il est important de s'assurer que le solvant ne réagit pas chimiquement avec les substances du mélange à analyser (Mendham et al., 2006).

Après plusieurs essais, le système solvant qui donne les meilleures séparations ou migrations des molécules est choisi :

- Pour le support de polyamide, le système utilisé est MEC/Méthanol/Ethanol/Ether de pétrole dans les proportions (40/30/30/10 ; v/v/v/v).
- Pour la CCM sur plaque d'aluminium pré-étalée de gel de silice nous avons choisi comme système Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau dans les proportions (10/1/0,5 ; v/v/v)

- **Les extraits**

Les extraits testés sont la phase éther diéthylique, acétate d'éthyle et la phase 1butanol des feuilles de *lawsonia inermis* et de *Pistacia lentiscus* et de l'écorce de *juglans regia*.

- **Dépôts**

Le dépôt se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire à usage unique (un capillaire pour chaque phase) (Figure 22). Le capillaire doit être posé perpendiculairement et prudemment sur la plaque pour ne pas gratter le gel. On fait plusieurs dépôts du même échantillon au même endroit pour obtenir les produits séparés en grande quantité. Il faut sécher après chaque dépôt.

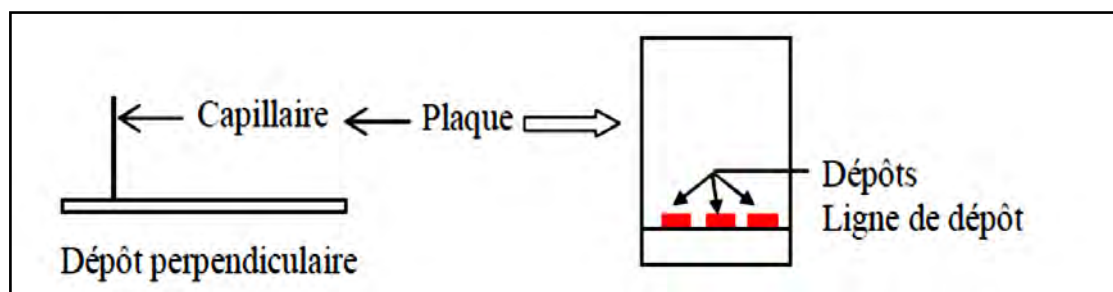


Figure 22 : Méthode de dépôts lors d'une CCM analytique.

- **Développement des plaques**

Les plaques sont placées dans la cuve de CCM. Quand cette dernière est saturée en vapeur de solvant d'éluion, le bord de la plaque où a été effectué le dépôt est trempé dans un fond du solvant approprié, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de l'échantillon et le mélange de solvant. Celui-ci monte par capillarité. Les différents constituants de l'échantillon déposés migrent avec des vitesses différentes (figure23).

Lorsqu'il arrive presque en haut de la plaque, on sort celle-ci de la cuve et on laisse l'éluant s'évaporer. La durée de développement dépend de la phase mobile, de la taille de la plaque et de la température.

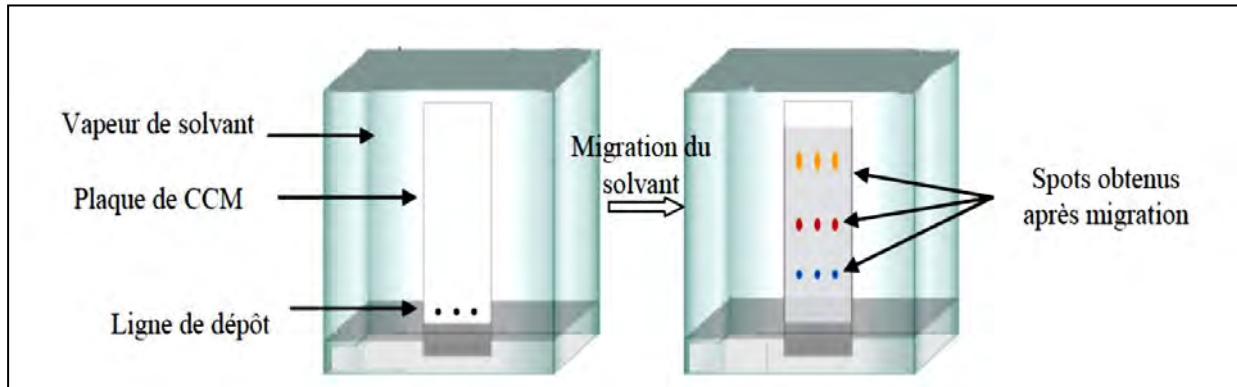


Figure23: Migration des constituants de l'extrait lors d'une CCM analytique

I.2.2.3.3 Révélation (visualisation des tâches)

Après développement et évaporation du solvant de migration, les tâches sont visualisées :

- A l'œil nu ;
- sous UV à 254nm et à 365nm (Merghem, 1995) ;
- Avec un réactif spécifique de coloration.

La révélation se fait sous contrôle UV ou à la suite de pulvérisation de réactifs spécifiques pour les composés recherchés

Dans notre travail, la visualisation des tâches (spots) se fait sous UV à 254nm et/ou 365nm dans une chambre noire. La révélation des spots s'est effectuée par le réactif de Neu, le réactif de Libermann et le réactif $FeCl_3$.

- **Réactif de Neu**

Le réactif de Neu ($C_{14}H_{16}BNO$) ou 2-aminoéthyl diphényl borate (Naturstoff reagent A) est un colorant fluorescent utilisé en chromatographie sur couche mince pour améliorer et amplifier l'auto- fluorescence des polyphénols et particulièrement ceux des flavonoïdes (Grünz G. et al., 2010). En fonction de la substitution avec des groupes hydroxyle sur le cycle B et C, les flavonoïdes et de réactif Naturstoff forment un chélate avec une fluorescence caractéristique.

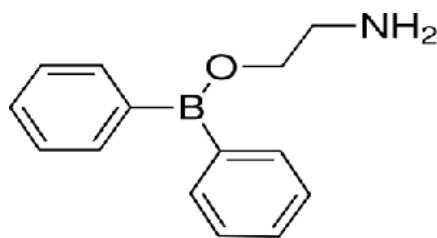


Figure 24: Structure de 2-aminoéthyl diphenyl borate (réactif de Neu)
(Grünz G. et al., 2010)

- **Le réactif de Liebermann Burchard**

Trois solvants sont utilisés dans la préparation du réactif et la réalisation de ce test. Il s'agit de l'éthanol, de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. Pour réaliser ce test, on prépare une première solution composée d'un mélange à volume égal (5ml) d'acide sulfurique et d'anhydride acétique. A cette solution, on rajoute 50 ml d'éthanol absolu. La préparation est effectuée à froid dans de la glace. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100°C pendant une dizaine de minutes. Ce test permet la mise en évidence des triterpènes ainsi que les stéroïdes. Selon le type de composé testé, on observe des taches de colorations diverses à la lumière UV et à 365nm.

- Coloration rouge pour les triterpènes de type oléanane et ursane ;
- Coloration jaune orangée pour les triterpènes de type lupane ;
- Coloration jaune /jaune-vert pour les stéroïdes (Burke et al., 1974 ; Lagnika, 2005).

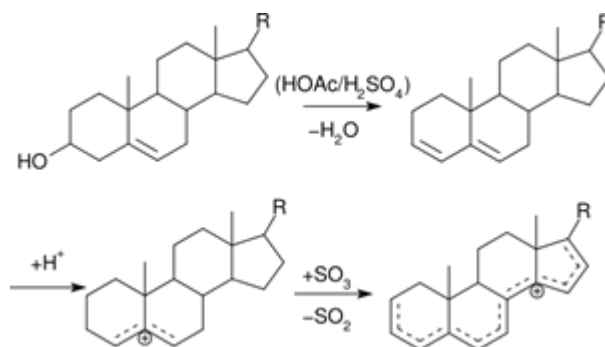


Figure 25 : Structure de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique
réactif de Liebermann Burchard (Burke et al., 1974)

- **Le réactif FeCl₃**

Le chlorure de fer III est utilisé pour identifier la fonction phénol. Il se forme un complexe violet. La solution jaune de FeCl₃, en présence de la fonction phénol, devient violette et donc révélera la présence des tanins hydrolysables.

Après séchage, le chromatogramme sera directement observé dans le visible. Les échantillons flavonoïques sont colorés en jaune. Vaporiser une solution méthanolique du réactif de Neu 1% sur les plaques de CCM. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de tâches fluorescentes. Selon la couleur obtenue nous pouvons identifier le type de flavonoïde (**Stahl, 1969**) :

- **Les dérivés d'apéginine** présentent une couleur fluorescente sous UV **jaune-verdâtre** et après 24 heures, leurs couleurs à la lumière visible virent au **rouge-brun**.
- **Les dérivés de lutéoline** présentent une couleur fluorescente sous UV **jaune**.
- **Les dérivés de kaempférol** présentent une fluorescence sous UV **jaune verdâtre plus intense** que celles des dérivés d'apéginine.
- **Les dérivés de quercétol** présentent une couleur fluorescente sous UV **orange intense**.

Pour les tannins, on fait aussi une révélation des plaques analytiques avec du FeCl₃ et un chauffage à 80°C pendant quelques minutes. La fluorescence sous lumière UV ainsi que la valeur du R_f (rapport frontal) accessible immédiatement à l'examen du chromatogramme apportent des informations sur la structure du composé.

I.2.2.3.4 Relation fluorescence-structure

L'examen sous lumière UV est certainement le procédé le plus utilisé pour la détermination de la structure, il fournit des informations très importantes sur la configuration structurale mais aussi sur les substituants sur les squelettes des molécules isolées (**Lahouel, 2005**). Il est connu qu'il existe une relation entre la fluorescence et la nature ainsi que les substitutions du composé flavonoïque chromatographié (**Triki et al., 2009**).

Le tableau ci-dessous démontre les relations existantes entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence (couleur) sous UV.

Tableau 5 : Détermination de la structure des flavonoïdes par l'interprétation de leurs fluorescences (Lahouel, 2005).

Spot coloré	Type de flavonoides
Noir	Flavonols 5,6,7 tri- OH libres Flavonols 5,7,8 tri- OH libres
Brun-noir	3-OH absent ou 3- OH substitué
Violet	Flavones 5- OH et 4'- OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones 6- ou 8-OH Chalcones, isoflavone, dihydroflavonols, flavanones
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libres Flavonols sans 5-OH libre avec 3- OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5- OH libre
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre, aurone, chalcone, flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

I.2.2.3.5 Relation structure - Rapport frontal ou facteur de rétention (Rf)

L'identification des flavonoïdes est réalisée par le rapport frontal (Rf : rapport de la distance parcourue par le soluté et celle de la phase mobile c'est-à-dire le front du solvant). Selon cette distance de migration qui dépend essentiellement de la polarité des substances, la structure des flavonoïdes de nos extraits est déduite (Lahouel, 2005).

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25cm).
- Les oligohydroxy et oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3- 0,5cm).
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont des valeurs les plus élevées de Rf (0,5- 0,7cm).

Le facteur de rétention (Rf) apporte aussi des informations sur la structure des polyphénols. Il est calculé d'après la relation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance entre la ligne de base et la tâche du produit}}{\text{Distance entre la ligne de base et le front du solvant}}$$

La valeur du Rf n'est pas une constante physique du corps, car elle est influencée par plusieurs facteurs ; tels que la nature du solvant, la technique employée, la température ainsi que les différents substituants et leurs positions sur le squelette flavonoïque.

- Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support donné « phase stationnaire ».
- Le Rf est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange.

Cette valeur varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi qu'avec la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique (**Markham, 1982 ; Berthillier, 1972**) Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du Rf.

Tableau 06: Relation entre Rf- Structure flavonique (Bandyukova et Shinkarenko, 1973 ; Akroum, 2011)

Structure flavonique	Rf
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueue Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthylés	Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3- OH libre	Rf nul dans l'eau

I.2.2.4 Analyse spectrale (spectrophotométrie UV- Visible)

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette substance est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. Les techniques de spectroscopie UV-Vis sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés structurales et les caractéristiques optiques des composés.

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales, la bande I et la bande II (Jurd et Horowitz, 1962).

- **Notions de base**

Les molécules qui présentent un spectre d'absorption UV/Visible sont celles qui absorbent des photons dont l'énergie correspond à des longueurs d'ondes se situant dans le domaine 190nm à 800nm. Cette absorption correspond à une interaction des photons avec les électrons des couches externes des atomes ou des molécules ; les électrons passent alors d'un état fondamental à un état excité (Gavrilovic et al., 1996).

- **Les paramètres importants d'un spectre UV/Visible**

Deux types de paramètres sont importants en spectroscopie UV/Visible : les longueurs d'ondes des maxima d'absorption (λ_{max}), les épaulements et l'intensité de leurs absorptions mesurées le plus souvent par la valeur de leur coefficient d'extinction molaire accessible par la mesure de l'absorbance (loi de Beer Lambert) (Burgot et Burgot, 2006).

En analyse structurale, l'ensemble du spectre est étudié et les deux types de paramètres ci-dessus sont utilisés pour identifier des groupements d'atomes voire d'identifier dans les cas les plus favorables la molécule.

Certaines substances ayant une structure insaturée absorbent sélectivement dans le visible et apparaissent alors colorées (Gavrilovic et al., 1996). La couleur perçue est toujours complémentaire de radiation absorbée. L'œil humain voit la couleur complémentaire de celle qui est absorbée (Figure 26).

Par exemple, si une substance en solution absorbe à $\lambda = 540\text{nm}$, cela signifie que la seule couleur absorbée est le vert et l'œil voit la solution rouge pourpre.

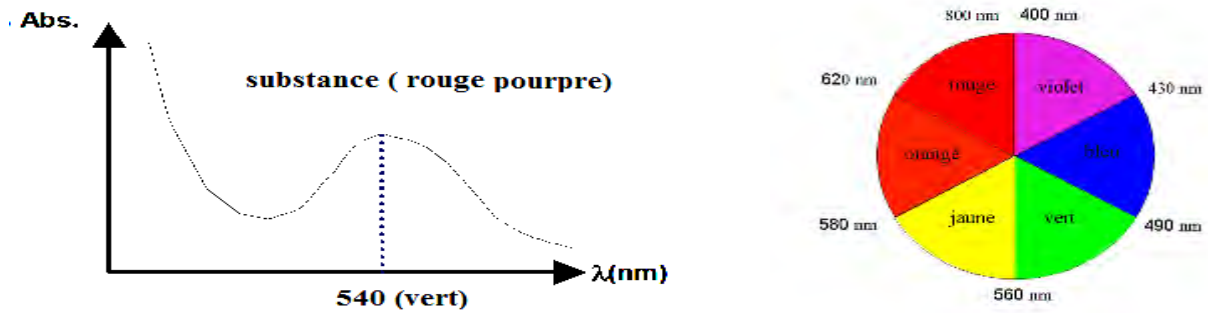


Figure 26 : Relation entre la radiation absorbée et la couleur perçue d'une substance

- Applications qualitatives de la spectrophotométrie sur les composés phénoliques

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV. Dans le méthanol neutre, les composés flavonoïdiques absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet entre 300 et 385 (Bande I), et entre 250 et 280 (Bande II) (Figure 27).

La Bande I correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.

La bande II est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A, cette bande permet de connaître le nombre de substituant du noyau A (Markham et Mabry, 1968 ; Lahouel *et al.*, 2004).

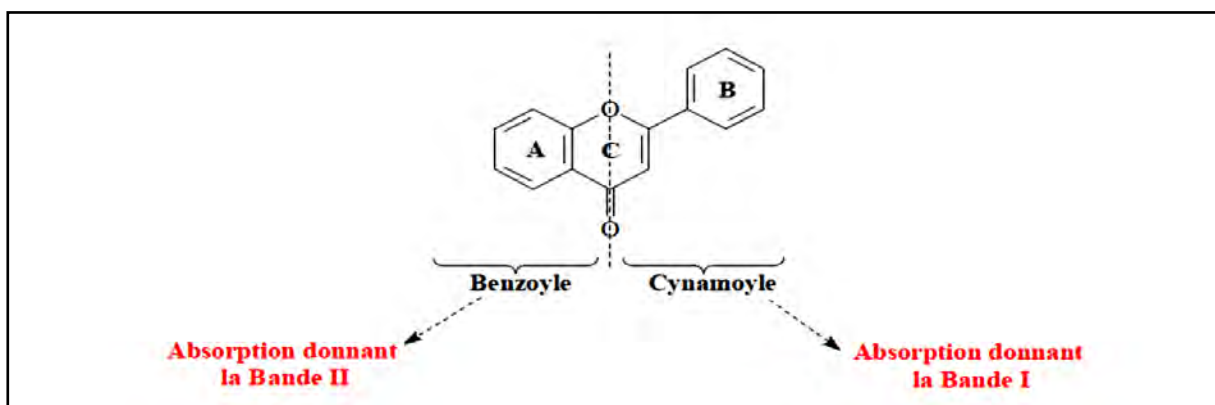


Figure 27 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde

Suivant le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes, ces bandes seront plus ou moins intenses. Il est ainsi facile de faire la différence entre des molécules aglycone à cycle C ouvert (chalcone, aurone) qui ont une bande II très réduite et les autres flavonoïdes à cycle C fermé qui possèdent une bande II beaucoup plus intense. Par contre, les isoflavones et les flavanones possèdent une bande I qui est généralement réduite à un épaulement. Le tableau ci-dessous démontre les principales classes de flavonoïdes et leurs spectres d'absorption UV-visible.

Tableau 07 : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes (Markham, 1982)

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250-280	304-350	Flavones
250-280	352-385	Flavonols
250-280	328-357	Flavonols substitué en 3
275-295	300-330	Flavanones et dihydroflavanol
270-280		Flavanols
230-270	340-390	Chalcone
230-270	380-430	Aurone
270-280	465-560	Anthocyane
245-275	310-330	Isoflavone

Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs (Tableau08).

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet.

Tableau 8 : Relation entre l'arrangement des groupements hydroxyles et le maximum d'absorption (Rice-Evans et al., 1996)

Flavonoïdes	Arrangement du OH	Position des bandes
Flavonols		
Kaempferol	3, 5, 7, 4'	367 nm
Quercétine	3, 5, 7, 3', 4'	371 nm
Myricétine	3, 5, 7, 3', 4', 5'	374nm
Flavones		
Chrysin	5, 7	313nm
Apéginine	5, 7, 4'	337nm
Flavanones		
Naringinine	5, 7, 4'	289 (326sh) nm
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'	290 (327sh) nm

I.2.2.5 Analyse qualitative par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est, de très loin, la technique la plus performante pour l'analyse des composés phénoliques que soit à des fins qualitatifs ou quantitatifs (Macheix et al., 2006). Depuis leur introduction en 1971, CLHP est utilisée pour la séparation de toutes les classes de composés phénoliques et des centaines d'applications ont été publiées. L'amélioration de l'instrumentation, les matériaux d'emballage, et technologie des colonnes sont toujours mises en place, ce qui rend la technique de plus en plus attrayante (Marston et Hostemann, 2006). L'immense avantage de la CLHP par rapport à la chromatographie sur couches minces réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé (Ferrari, 2002). L'analyse est réalisée par un HPLC (VP SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH) au niveau du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST).

- **Principe :**

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés. Le degré initial de purification de l'extrait végétal, les conditions chromatographiques elles-mêmes et le type de détection utilisé en sortie de la colonne orientent fréquemment une analyse CLHP vers une classe de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonols, anthocyanes, coumarines...). La figure 28 présente le système d'appareillage de CLHP essentiel.

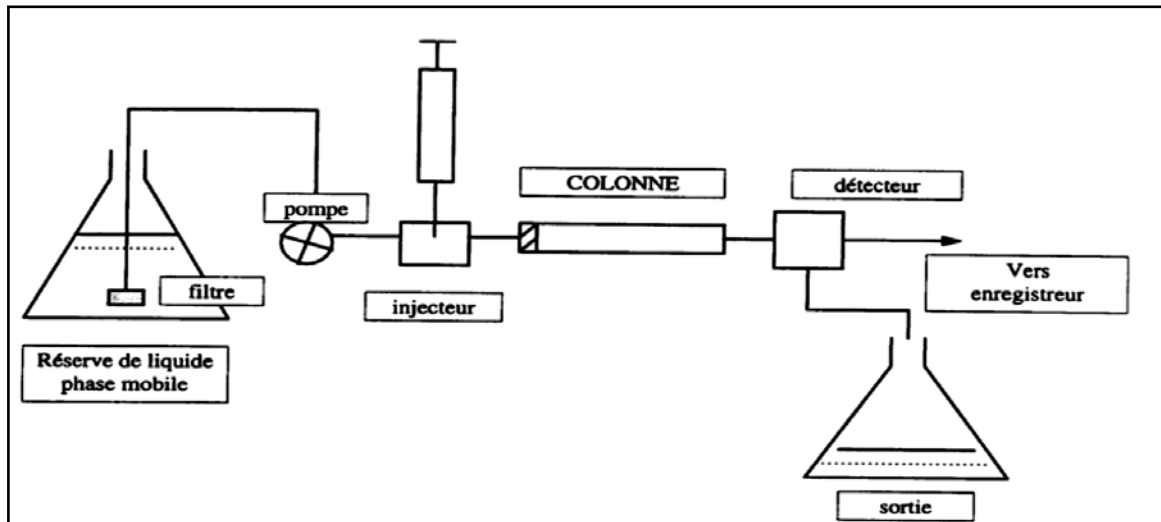


Figure 28 : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC

- **Mode opératoire**

La séparation est faite par un HPLC (VP SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH). 20 μ l de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18 ODS. La phase mobile est constituée de deux éluants : Méthanol et Eau (3.5:6.5 ; V/V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique. Le débit est de 0.7 ml / min (Amarowicz *et al.*, 2005).

Après programmation des paramètres d'acquisition, d'intégration et de calculs, un logiciel gère l'acquisition de chromatogrammes, détecte et intègre les pics, effectue des calculs et sort pour chaque chromatogramme un rapport d'analyse comprenant le numéro et le temps de rétention.

I.2.3 Activité biologique

I.2.3.1 Test de l'activité antifongique des extraits totaux

De nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et les plantes sont causées par des champignons qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants. Certains de ces champignons comme le genre *Trichophyton* et *Candida* ont une fréquence élevée en pathologie animale notamment dans les mycoses. Ces souches sont sensibles aux antifongiques actuels ; ce qui permet donc de juger de l'efficacité des essais.

Nos tests antifongiques ont été réalisés aux laboratoires de Microbiologie du CHU de Constantine et de Génie Microbiologique et Applications, ils ont porté d'une part sur les extraits totaux (Totum) des feuilles de *Lawsonia inermis L.* (*Lythraceae*) et de *Pistacia lentiscus L.* (*Anacardiaceae*) et de l'écorce de *Juglans regia L.* (*Juglandaceae*). D'autre part, ces essais ont porté sur leurs phases (éther diéthylique (ED), acétate d'éthyle (AC) et 1butanol (1B)) obtenus par épuisements successifs par des solvants à polarité croissante.

- **Souches testées**

Ces tests biologiques sont réalisés sur quatre souches fongiques (trois dermatophytes et une levure) issues d'isolats cliniques qui nous ont été fournies par le laboratoire du service de parasitologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine (Tableau 9). Ces souches ont été déjà au préalable confirmées par le service du CHU, après la vérification de leur pureté.

Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient, à partir des présents travaux, d'ouvrir d'autres pistes à la recherche.

Tableau 9: Souches fongiques testées.

Nom des espèces	Origine des souches
<i>Trichophyton rubrum</i>	Dermatophyte anthropile isolé à partir d'une onychomycose chez une femme âgée de 25ans
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Dermatophyte isolé à partir d'une lésion interdigitée et plantaire chez un homme de 48ans
<i>Microsporum canis</i>	Dermatophyte zoophile isolé d'une teigne microscopique chez un enfant de 8ans
<i>Candida albicans</i>	Champignon levuriforme isolé à partir d'un perionyxis chez une femme diabétique de 45ans

Dans le cadre de cette étude, la méthode de diffusion en milieu solide et celle de dilution en milieu liquide ont été utilisées.

I.2.3.1.1 Méthode de diffusion sur milieu solide

- **Le principe**

Cette méthode très utilisée en microbiologie (antibiogrammes et antifongigrammes) repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction du diamètre d'inhibition, ainsi la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Broadasky et al., 1976**)

Le protocole expérimental de cette méthode appliquée aux produits naturels (**Rios et al., 1988**) peut être résumé de la manière suivante :

- une culture du microorganisme, diluée à une concentration donnée, est mise en route ;
- le milieu de culture est inoculé de microorganismes soit à l'aide d'un écouvillon, soit à l'aide d'un râteau ;

- le milieu ainsiensemencé est gardé de manière à ce qu'aucune croissance notable ne commence jusqu'à ce que les produits à tester soient déposés dans la boîte de Pétri ;
- les produits à tester sont préparés dans des excipients adéquats (le solvant étant choisi de manière à ce que lui-même n'ait pas d'activité) et mis en contact avec le microorganisme par l'imprégnation de disque ou par emplissage de puits ou de cylindres stériles faits avec un matériau approprié ;
- les boîtes sont alors incubées à la température appropriée (selon le microorganisme), les zones d'inhibition sont alors mesurées.

- **Mode opératoire**

Des disques de papier de 6 mm de diamètre imbibés de 25µl d'extrait à tester, à la surface du milieu gélosé Sabouraud chloramphénicol actidionne , coulé sur boîte de pétri, préalablementensemencées par inondation d'une suspension de microorganismes de 10⁶ unités/ml cultivé dans de l'eau physiologique pour les dermatophytes et dans le bouillon nutritif YPG (Yeast / Peptone / Glucose) pour *Candida albicans* (Collins et al., 1995).

L'incubation des boîtes de pétri se fait pendant 18 à 24h à 37°C pour les levures et dure 7 jours pour les dermatophytes. L'antifongique témoin, Griséofulvine, est mis en solution par dissolution de la quantité requise dans l'eau distillée. La griséofulvine est additionnée à une concentration de 0,6 µg/ml, correspondant à la CMI vis-à-vis de la souche fongique de *Microsporum canis* (Larpen et al., 1989).

Le contrôle est constitué par addition d'une solution alcoolique à 70% d'eau distillée. L'activité antidermatophyte est ainsi déterminée en mesurant le diamètre du halo d'inhibition qui apparaît clair autour de chaque disque (Vander et Vlietink, 1991; Doughari et al., 2007).

I.2.3.1.2 Méthode de dilution sur milieu liquide

- **Principe**

Cette technique consiste à réaliser des dilutions successives, dans le milieu de culture, à partir d'une solution mère du produit à tester et dont la concentration est connue. A ces dilutions, on ajoute une suspension de microorganismes microbiens. Après cet ensemencement l'ensemble est incubé pendant un temps et à une température donnés en fonction du microorganisme. On peut définir la valeur la plus faible à laquelle on n'observe pas de croissance des microorganismes et donc une inhibition de la croissance: c'est la concentration minimale d'inhibition (CMI) (Alcamo

et al., 1984). Cette méthode permet donc d'évaluer qualitativement et surtout quantitativement l'activité d'une substance.

La lecture des résultats se fait visuellement ou par mesure de la turbidité au spectrophotomètre.

NB : Bien que la méthode de dilution soit la plus appropriée pour les évaluations quantitatives d'activité (CMI), elle reste toutefois assez fastidieuse et longue avec les procédures de dilutions en série à faire.

- **Mode opératoire**

Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de nos extraits, 200µl de méthanol sont distribués dans une série de tubes auxquels on ajoute 100µl de différentes dilutions de demi en demi d'extrait de plantes, gamme de concentration s'étalant comme suit : 35 ; 17,5 ; 8,75 ; 4,38 ; 2,19 ; 1,09 ; 0,54 ; 0,27 ; 0,14, **0,068** ; **0,034** et **0,017** mg / ml) à l'exception du premier qui servira de témoin négatif.

On prélève, ensuite, 100µl du mélange que l'on ajoute à 5ml de bouillon nutritif et 200µl de suspension mycélienne, on incube et la lecture se fait visuellement (**Kamagate Kone et al.**, 2001). La CMI d'un extrait vis à vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (**NCCLS**, 1999).

I.2.3.2 Test de l'activité antifongique des phases

Une fois les extractions et les partitions entre solvants réalisées, les phases obtenues ED, AC et 1B sont évaporées à sec puis reprises dans 4 à 5 ml de méthanol pour déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des dermatophytes.

L'activité antifongique des extraits méthanoliques a été testé *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (**Osato 2009 ; Liao et al. 2010**) en utilisant quatre souches : une levure *Candida albicans* et trois dermatophytes *Trichophyton rubrum* *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*.

Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de culture ensemencés de microorganismes.

Les extraits des fractions enrichies secs ont été reconstitués en solution en utilisant du méthanol additionnée de DMSO à 1%. L'activité antifongique, quand elle est présente, se manifeste alors par des zones d'inhibition autour des disques.

Des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavés à 120°C pendant 20 min.

Les microorganismes apportés sous forme de suspensions ont été normalisés à 10⁶ UFC / ml. Ceci en mettant 0,2 ml de chaque suspension apportée dans 20 ml de bouillon nutritif. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 24h pour la levure et 7 jours pour les dermatophytes.

Les microorganismes ont étéensemencés par étalement sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Sabouraud. Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 20 µl de principe actif (extrait dilué) et déposés sur la surface des géloses. Comme témoin, nous avons utilisé des disques imprégnés de griséofulvine à concentration de 0,6 µg/ml/ disque l'incubation s'est faite à pour les levures, à 28°C pendant 48 h (**Osato, 2009**).

L'antifongique témoin, Griséofulvine, est mis en solution par dissolution de la quantité requise dans l'eau distillée contenant 1% de DMSO. La griséofulvine est additionnée à une concentration de 0,6 µg/ml, correspondant à la CMI vis-à-vis de la souche fongique de *Microsporium canis* (**Larpen et al., 1989**).

- **Contrôle**

Le contrôle est constitué par addition d'une solution alcoolique à 70% d'eau distillée, additionnée de 1% de DMSO.

- **Préparation de l'inoculum fongique**

L'inoculation des cultures est réalisée sous hotte, à partir de matériel fongique jeune, à croissance rapide contenant du mycélium. Un disque du mycélium prélevé sur le pourtour d'une culture fongique âgée de 5-8 jours est trituré dans un volume suffisant d'eau stérile utilisant un agitateur vortex pour libérer le maximum de mycélium dans le milieu. La qualité (densité et homogénéité) de la solution d'inoculation est appréciée par examen sous microscope avant chaque série d'inoculation. Celle-ci est réalisée sous des conditions d'asepsie, par l'addition d'un volume déterminé de l'inoculum fongique au milieu de culture. Les cultures sont maintenues à 37° C pendant 5 à 8 jours, jusqu'à une croissance appropriée du matériel fongique.

- **Mesure de l'activité antifongique :**

L'activité antifongique est réalisée par comparaison du diamètre de croissance des souches, en présence et en absence des préparations végétales testées, du contrôle et de l'antifongique témoin (Griséofulvine). Le diamètre de la croissance des colonies est ainsi mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

I.3 Traitements statistiques des données :

Les résultats obtenus au cours de l'évaluation de l'activité antifongique des extraits totaux sont exprimés sous forme de moyenne de trois répétitions avec l'écart type (Moy±SD), ils ont été analysés par le logiciel Origine, version 6.0, en appliquant le test de Student pour comparer les populations. Le seuil de signification a été retenu à $P < 0.05$.

CHAPITRE II RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Extraction et affrontement

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques (Ignat *et al.*, 2011). Elle est essentielle avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite.

Les méthodes d'extraction dépendent aussi bien du matériel végétal que des molécules recherchées. L'extraction est influencée par la méthode choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure.

Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles.

L'optimisation d'une procédure d'extraction des métabolites d'un organe donné est une démarche fondamentale. En effet, si un composé n'est pas extrait de l'échantillon, il ne pourra bien évidemment pas être identifié et dosé.

L'extraction par les solvants spécifiques à la température ambiante (macération) est la méthode la plus perfectionnée au niveau de notre laboratoire. Le choix du système solvant est en fonction de la polarité des composés d'intérêts, du cout global et de la sécurité (Wang, 2008).

Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques, l'extraction liquide -liquide est la procédure utilisée.

Après les extractions et les partitions entre solvants, les phases éther diéthylique, acétate d'éthyle, méthyléthylcétone, butanol et eau sont évaporées à sec et reprises dans 5ml de méthanol. Une partie de ces échantillons est consacrée aux épreuves chromatographiques (CCM et HPLC) et à l'étude spectrale. L'autre partie est consacrée aux tests biologiques (activité antifongique).

Le fractionnement, qui a pour but de simplifier un extrait brut en séparant les molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimique, est l'une des étapes clés qui va permettre de

réduire la complexité du matériel de départ et donc faciliter l'identification des molécules actives.

A la fin, un extrait brut (EB) et quatre fractions successivement : éther diéthylique (ED), acétate d'éthyle (AC), méthyle éthyle cétone (MEC) et eau résiduelle (H₂O) ont été collecté pour chaque plante (*Lawsonia inermis* (LIN), *Pistatacia lentiscus* (PLE) et *Juglans regia* (JRE)) et vont subir les différents tests phytochimiques.

II.2 Caractérisation qualitative en tube

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques, réalisée sur les extraits reconstitués à partir de la poudre lyophilisée de chaque échantillon végétal, génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits. Ces tests permettent de déterminer à quelle famille chimique appartiennent les composés isolés, facilitant ainsi la détermination future de leurs structures.

Le criblage phytochimique est consigné dans le tableau 10, il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire.

Tableau 10 : Criblage phytochimique des extraits méthanoliques bruts des différentes espèces végétales (LIN, PLE et JRE)

	Tanins	Stérols et Terpenoïdes	Coumarines	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Saponines
<i>Lawsonia Inermis</i> LIN (Feuilles)	+++	+++	---	+++	---	+++
<i>Pistatacia lentiscus</i> PLE (Feuilles)	++++	++++	---	+++	---	++++
<i>Juglans regia</i> JRE (écorce)	++++	+++	---	+++	---	++++

Réaction franchement positive : + + + +

Réaction positive : + + +

Réaction moyennement positive : + +

Réaction louche : +

Réaction négative : -

Ce test de recherche des métabolites dans les différents extraits de LIN, PLE et JRE a donné des réactions positives. L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes:

- les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les stérols et terpenoïdes sont présents dans toutes les plantes étudiées en quantité variable.
- la présence des stérols, des stéroïdes et des tanins en quantité importante a été confirmée respectivement par une réaction fortement positive avec le réactif de Liebermann Burchardt en donnant une coloration violette et avec la solution diluée de chlorure ferrique (FeCl_3 à 2%) en donnant une coloration bleue.

Effectivement, quatre groupes de composés bioactifs sont identifiés: stérols et triterpènes, flavonoïdes, tannins et saponines sont franchement présents dans nos extraits bruts méthanoliques des feuilles de *Lawsonia inermis* (Gagandeep et al., 2010) et de *Pistacia lentiscus* (Benhammou et al., 2008 ; Rodríguez-Pérez et al. 2013) ainsi que dans l'écorce de *Juglans regia* (NirmlaDevi et al., 2011 ; Kshitij et al., 2013). En revanche les composés alcaloïdes et coumarines ne sont révélés dans aucun extrait des trois plantes étudiées. Ce qui n'est pas en accord avec les travaux de certains auteurs. Cette non concordance des résultats serait due au choix du solvant et au mode d'extraction comme l'a affirmé Mamyrbekova-Bekro et al., (2013).

Pour *Pistacia L.* la chimie de la plante est relativement peu étudiée. Cette dernière est connue pour contenir des tanins condensés et hydrolysables (Abbas et Boudriche, 2007), des glycosides flavonoïques (Vaya et Mahmood, 2006), des anthocyanes (Longo et al., 2007), une résine «mastic de Chio» (Leonti et al., 2001), et des triterpènes (Atmani et al., 2002). Des feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été isolés des tanins proanthocyanidiques et galliques, des glycosides flavonoïdes et des anthocyanes, et des dérivés à noyau gallique et quinique (Longo et al., 2007). Ces différents travaux sont en accord avec nos résultats.

Selon Kpemissi (2007), les saponines ont été révélées dans toutes les espèces d'*Anacardiaceae* parmi elles *Pistacia lentiscus*. Bouchet et al. (1986) ont fait l'extraction de 12 saponines de 12 plantes récoltées au Zaïre puis ont étudié les activités antidermatophytes vis-à-vis de *Trichoderma viridae*; champignon classique pour la détection et le dosage des saponines végétales.

Dans une étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *Anacardium occidentale*, Akinpelu (2001) a trouvé qu'il contient des tanins et des alcaloïdes ; Konan et al., (2007) ont mis en évidence dans l'extrait de l'écorce de tige de *Anacardium occidentale* trois

grands groupes chimiques : les tanins, les flavonoïdes et les saponines. Dans les extraits de feuilles, **Arya et al. (1989)** ont détecté la présence des tanins et des flavonoïdes et la quasi absence des alcaloïdes. Ces travaux confirment la présence des différents composés chimiques retrouvés dans nos extraits totaux de *Pistacia lentiscus*.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kshitij et al., (2013)**, qui dans une évaluation phytochimique des différents extraits des écorces de *Juglans regia*, ont révélé la présence de flavonoïdes, des glucosides, des saponines, des stéroïdes, des tanins et des polyphénols.

Les résultats de notre évaluation chimique concordent avec de nombreux travaux publiés ; Selon **Musa et Gasmelseed, (2012)**, l'analyse phytochimique des constituants polyphénoliques des extraits de feuilles de *Lawsonia inermis* a permis l'isolement et l'identification des tanins condensés dans les proportions de (11,12%). Pour **Raja et al. (2013)**, le criblage phytochimique des extraits de feuilles de *Lawsonia* a montré la présence de glycosides, phytostérols, des stéroïdes, des saponines, des tanins et les flavonoïdes. Ce constat est affirmé par **Trigui et al., (2013)** qui a mis en évidence des flavonoïdes, des quinones, des tanins et des terpènes lors de son analyse chimique sur les feuilles de *Lawsonia inermis*.

Le criblage phytochimique réalisé par **NirmalaDevi et al., (2011)** a révélé la présence de sucres réducteurs; alcaloïdes; tanins et phénols; des stéroïdes et des saponines dans la poudre d'écorce du noyer (*Juglans regia*).

Pour confirmer nos essais de caractérisation en tube, nous avons eu recours à l'analyse chromatographique qualitative sur couche mince, au dosage colorimétrique par spectrophotomètre et à l'HPLC.

II.3 Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est l'une des méthodes de séparation et d'identification rapide des constituants d'un extrait végétal donné avant l'analyse détaillée par d'autres techniques instrumentales. Cette technique informe sur le contenu en polyphénols et en particulier en flavonoïdes des phases analysées. Elle a été réalisée suivant la méthode de **Merghem et al. (1995)** et de **Biallo et al. (2004)**

Les chromatographies préliminaires ont été menées sur les fractions d'éther diéthylique (ED), d'acétate d'éthyle (AC) et butanolique (1B) des trois plantes *Lawsonia inermis*, *Juglans regia* et

Pistacia lentiscus (LIN, JRE et PLE) pour avoir un aperçu de la nature des constituants rencontrés chez ces espèces.

Pour cela, une partie des fractions ou des phases ont été solubilisés dans le solvant approprié (méthanol) et déposés sur plaques de CCM qui ont ensuite été éluées dans les systèmes de solvants pour le support de gel de silice le système ACETATE D'ETHYLE/METHANOL/EAU dans les proportions (10/1/0,5 : v/v/v) et pour le support de polyamide DC6 ; le système MEC/MEOH/ETOH/ETHER DE PETROLE dans les proportions (40/30/30/10 : v/v/v/v).

II.3.2 CCM analytique sur plaque de gel de silice

Les plaques de CCM sur gel de silice sont révélées avec divers réactifs pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans nos échantillons à analyser.

Le système solvant a permis d'avoir une bonne séparation des constituants du dépôt et une visibilité acceptable des spots sous lampe UV à 365nm avant et après la pulvérisation des réactifs de Neu, de Libermann- Burchard et de FeCl₃. Chaque constituant est caractérisé par son facteur de rétention (Rf). Il est connu qu'il existe une relation entre la fluorescence et la nature ainsi que les substitutions du composé flavonoïque chromatographié. Les Rf différents sont dus à la polarité des composés vis-à-vis du système solvant de migration et la phase stationnaire. Celle-ci s'installe suite à une différence au niveau du squelette moléculaire, dont les molécules méthylées ont un Rf plus élevé que celles glycosylées (Treki, 2002 ; Madi, 2010)

Les tableaux suivants rapportent les informations sur la caractérisation des différentes fractions des trois plantes étudiées et les facteurs de rétention (Rf) des taches sur CCM après la révélation par les trois réactifs Neu, Libermann-Burchard et FeCl₃. Les spots sont visualisés par la lumière UV sous deux longueurs d'onde 254 nm, puis 365 nm. Cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes que la première longueur d'onde. Les données recueillies ont ensuite été confrontées aux données bibliographiques collectées.

II.3.1.1 Révélation au réactif de Neu :

Les tableaux ci-dessous montrent la richesse en composés phénoliques des différentes fractions éther di éthylique (ED), acétate d'éthyle (AC) et 1 butanol (1B) des trois plantes *Lawsonia Inermis* (LIN), *Juglans regia* (JRE) et *Pistatacia lentiscus* (PLE). La révélation au réactif de Neu visualise les différents spots sur les chromatogrammes des extraits testés.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11. L'interprétation de l'intensité des taches est la suivante : (+) présent en petite quantité, (++) en quantité intermédiaire, (+++) en grande quantité, (-) absence ou présence en dessous du seuil de détection.

**Tableau 11 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes
(révélation au réactif de Neu)**

Plantes Phases	LIN	JRE	PLE
ED	++	+	+++
AC	+++	+	+++
1B	+	-	+++

+++ : positif (très riches : plus de 3 spots)
 ++ : moyennement positif (riches : 3 spots)
 + : faiblement positif (pauvres : 1 ou 2 spots)
 - : test négatif (absence)

**Tableau 12: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM révélées
au réactif de Neu de *Lawsonia inermis***

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.47	1	0.28	1	0.28
2	0.71	2	0.47	2	0.49
3	0.85	3	0.52	3	-
4	-	4	0.71	4	-
5	-	5	0.85	5	-

**Tableau 13 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM révélées
au réactif de Neu de *Juglans regia***

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.85	1	0.85	1	-

Tableau 14 : facteur de rétention (Rf en cm) des taches sur CCM révélées au réactif de Neu de *Pistacia lentiscus*

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.19	1	0.19	1	0.19
2	0.33	2	0.33	2	0.33
3	0.47	3	0.47	3	0.47
4	0.52	4	0.52	4	0.52
5	0.62	5	0.76	5	0.62
6	0.76	6	-	6	-
7	0.85	7	-	7	-

La révélation des plaques CCM au réactif de Neu a montré la richesse en flavonoïdes des trois phases de *Pistacia lentiscus* avec 7 spots pour la phase éther diéthylique et 5 spots pour les deux autres phases. Cette richesse s'exprime également au niveau des différentes fractions de *Lawsonia inermis*, où nous remarquons 5 spots dans la phase acétate d'éthyle, 3 spots dans la phase éther diéthylique et 2 spots dans de la phase 1butanol. Contrairement à *Juglans regia*, où la constitution flavonique est la plus faible avec 1 spot observé au niveau des phases éther diéthylique et acétate d'éthyle et absence totale de spots dans la phase butanolique.

La caractérisation des composés phénoliques dans les différents extraits a montré que ceux-ci sont fortement présents dans les plantes médicinales sélectionnées. Ce constat est perçu en observant les chromatogrammes. Les figures 31, 32, 34 et 36 illustrent les différentes séparations obtenues sur les chromatogrammes CCM et les Rf dans le cas de gel de silice.

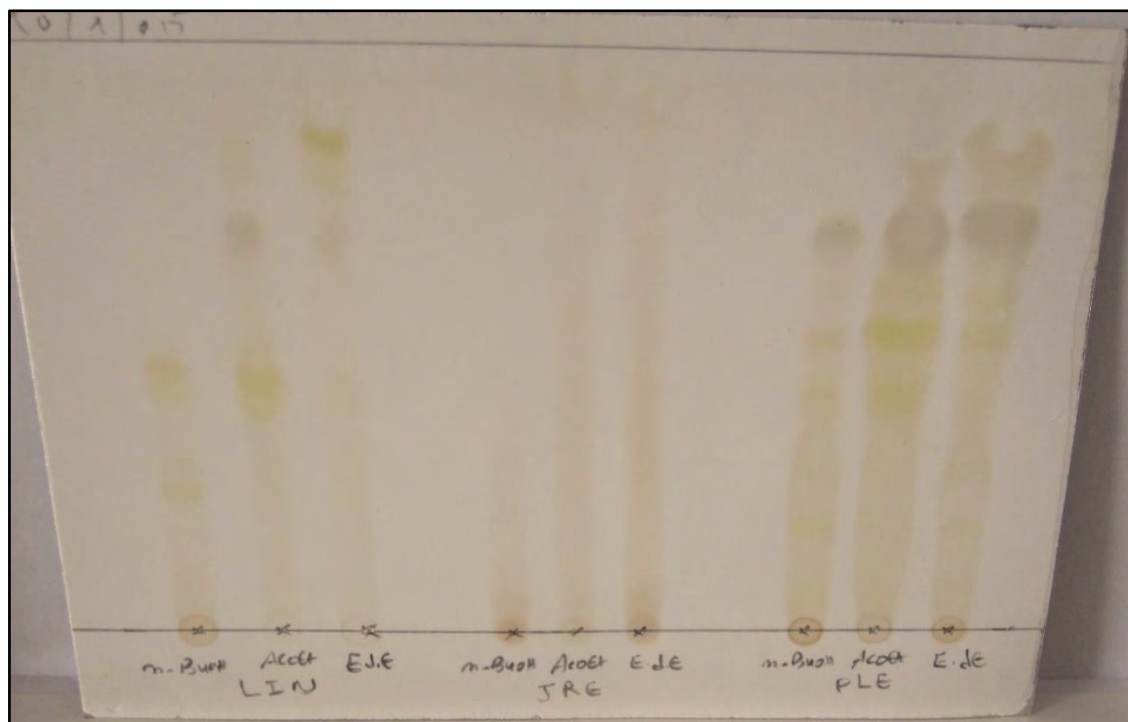


Figure 29 : CCM analytiques des extraits de *Lawsonia inermis*, *Juglans regia* et de *Pistacia lentiscus* sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant Acetate d'éthyle/Methanol/Eau (10/1/0,5) (visible à œil nu)

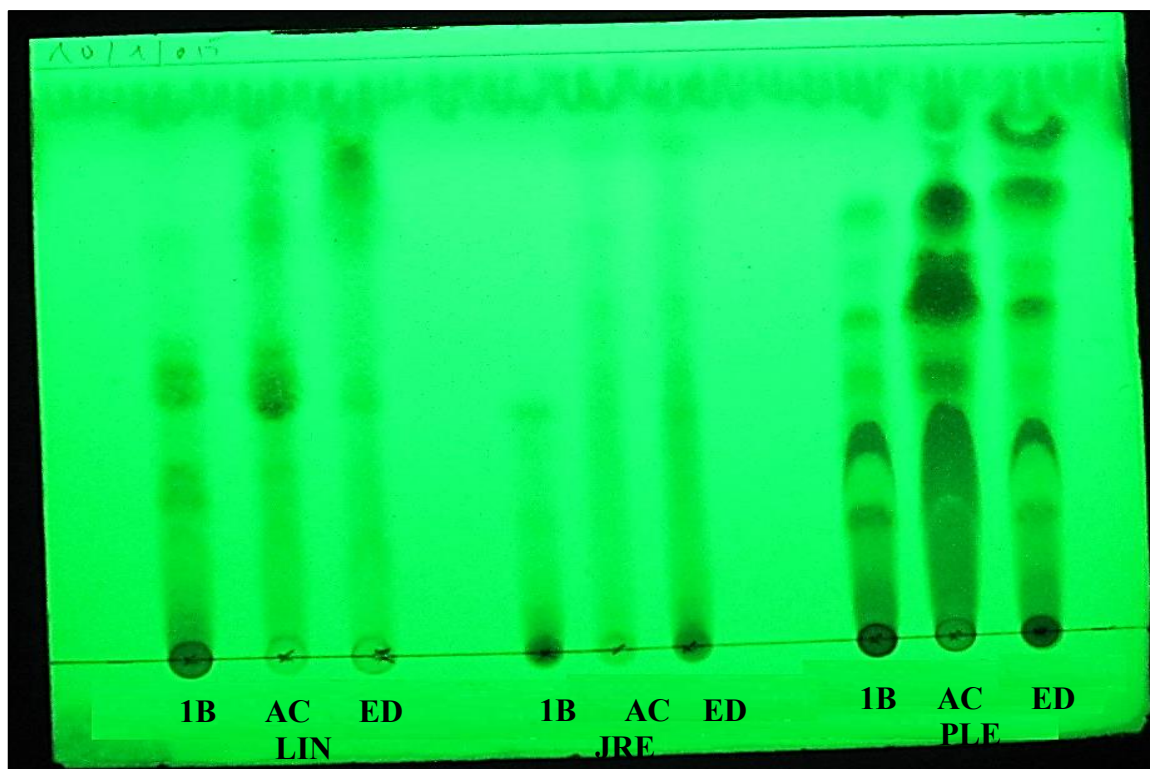


Figure 30 : CCM analytiques des extraits de *Lawsonia inermis*, *Juglans regia* et de *Pistacia lentiscus* sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant Acetate d'éthyle/Methanol/Eau (10/1/0,5) (sous UV à 254nm)

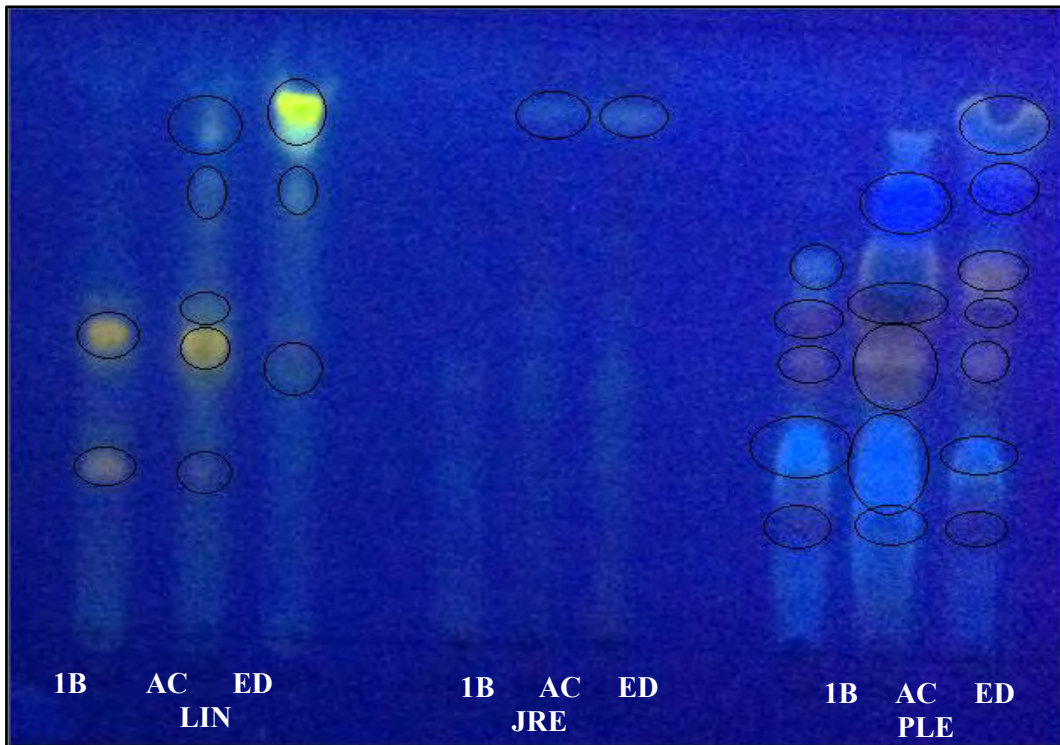


Figure 31 : CCM analytiques des flavonoïdes de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant (révélation au réactif de Neu à 365nm)

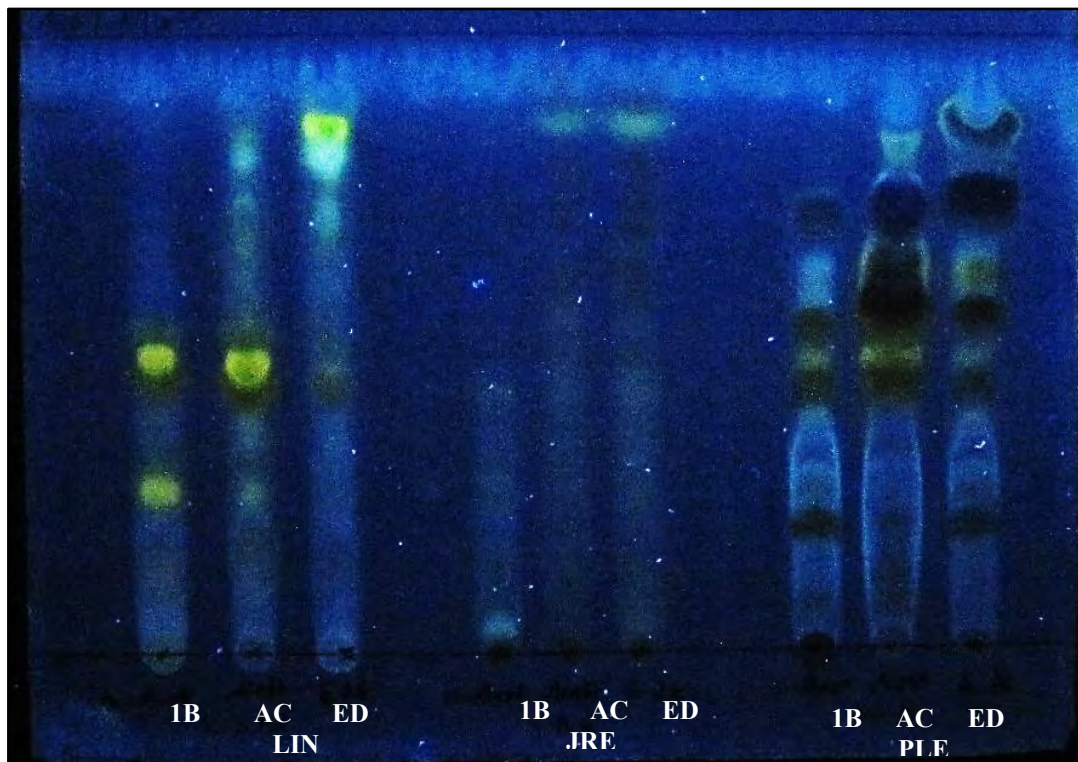


Figure 32 : CCM analytiques des flavonoïdes de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice développées dans le système solvant (révélation au réactif de Neu à 365nm)

Les flavonoïdes, les tanins, les stérols et les terpènes réputés être doués de propriétés antifongiques ont été recherchés dans les fractions ED, AC et 1B des trois plantes LIN, PLE et JRE. Le tableau 11 montre la richesse en métabolites secondaires qui sont contenus dans ces différentes phases.

Lorsque les flavonoïdes sont en contact du réactif de Neu, ils apparaissent sur le chromatogramme en jaune, orange et marron dans le visible et sous diverses colorations sous UV/365 nm (Merck, 1975 ; Wagner et al., 1996 ; Benhammou et al., 2008 ; Benamor et al., 2010)

La CCM a permis l'identification des flavonoïdes dans les plantes (PLE, JRE, LIN), qui apparaissent colorés en jaune et brun ou incolores, en plus de la présence des acides phénoliques qui apparaissent avec une fluorescence bleutée.

Sur cette base et comme le montre la figure 31, les spots jaunes ont été détecté surtout dans les trois phases de la plante *Lawsonia inermis* avec des rapports frontaux de 0.85 pour ED, 0.45 pour AC et (0.28 ; 0.49) pour 1B. Les spots oranges identifiés sur les chromatogrammes dans la phase AC de LIN (Rf=0.52) et dans la phase 1B de la plante PLE (Rf=0.47) sont des flavonoïdes. Ces mêmes composés apparaissent sous forme de spots marron au niveau des trois fractions de la plante PLE (Rf=0,47 ; 0,52 ; 0,62) pour ED, (Rf=0,52) pour AC et (Rf=0,19 ; 0,52) pour 1B (Lagnika, 2005 ; Benamor et al., 2010 ; Mamyrbekova-Bekro et al., 2013 ; Trigui et al., 2013).

Par ailleurs, les taches bleues affirment la présence des flavonoïdes dans les trois plantes étudiées où les valeurs des Rf s'expriment dans la phase ED de LIN, de PLE et de JRE avec respectivement (Rf= 0,71), (Rf=0,33 ; 0,76) et (Rf=0,85). Pour la phase AC, ces spots bleus (Rf=0,85) pour LIN, (Rf=0,33 ; 0,76) pour PLE et (Rf=0,85) pour JRE sont révélés par la réactif de Neu (Georgivskii et al., 1990).

Benhammou et al., (2008), lors de l'analyse par CCM, ont identifié dans les extraits des feuilles de *Pistacia vera*, *P. lentiscus* et *P. terebinthus*, les flavonols (couleurs jaunes), les acides phénoliques (bleu fluorescent), flavones (de châtaigniers violet), les anthocyanes (couleur rouge) et l'acide gallique et l'acide para-coumarique.

La CCM nous a permis alors de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a donné des informations utiles sur les éléments constitutants de nos extraits (couleur, facteur de rétention, fluorescence...).

II.3.1.2 Révélation au réactif de Liebermann-Burchard

Les tableaux ci-dessous montrent la richesse en composés phénoliques des différentes fractions ether di éthylique (ED), acetate d'éthyle (AC) et 1 butanol (1B) des trois plantes *Lawsonia Inermis* (LIN), *Juglans regia* (JRE) et *Pistatacia lentiscus* (PLE). La révélation au réactif de Liebermann-Burchard visualise les différents spots sur les chromatogrammes des extraits testés.

Tableau 15 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes révélées au réactif de Liebermann-Burchard

Plante / Phases	LIN	JRE	PLE
ED	+++	+	+++
AC	+++	++	+++
1B	+++	++	+++

+++ : positif (très riches : plus de 3 spots)
 ++ : moyennement positif (riches : 3 spots)
 + : faiblement positif (pauvres : 1 ou 2 spots)
 - : test négatif (absence)

Tableau 16 : Facteur de rétention (Rf en cm) des taches sur CCM de LIN révélées au réactif de Liebermann-Burchard

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.26	1	0.29	1	0.13
2	0.40	2	0.33	2	0.20
3	0.73	3	0.42	3	0.29
4	0.80	4	0.60	4	0.42
5	-	5	-	5	0.62
6	-	6	-	6	0.60

**Tableau 17 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de JRE
révélées au réactif de Liebermann-Burchard**

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.28	1	0.33	1	0.13
2	0.37	2	0.4	2	0.26
3	-	3	0.48	3	0.80

**Tableau 18 : Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de PLE
révélées au réactif de Liebermann-Burchard**

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.32	1	0.13	1	0.12
2	0.4	2	0.20	2	0.25
3	0.42	3	0.32	3	0.40
4	0.62	4	0.36	4	0.60
5	0.8	5	0.40	5	0.73

Le réactif de Liebermann-Burchard met en évidence la présence des tri-terpènes et des stéroïdes dans les trois extraits 1B, AC et ED chez les plantes LIN et PLE avec respectivement 6, 4 et 4 taches pour LIN et 5 taches observées au niveau de trois fractions de PLE. Il est à noter la présence également des composés terpenoides dans les extraits de la plante JRE (Tableau15) ce qui est en accord avec les travaux de **Benamor et al. (2010)**.

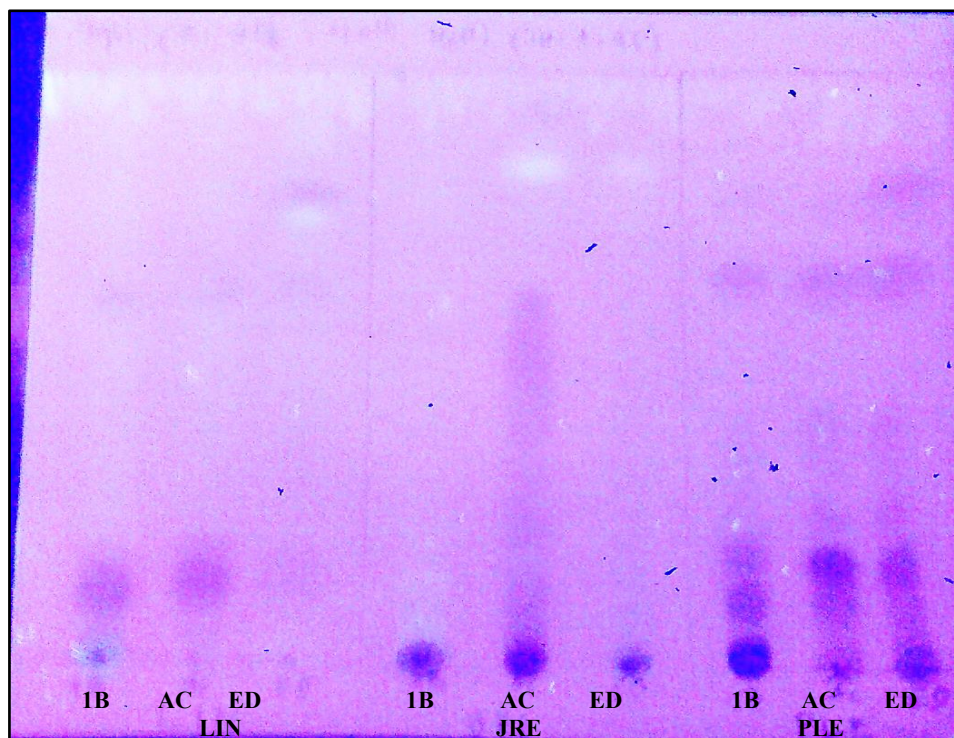


Figure 33 : CCM analytiques des phases des extraits de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice avant révélation

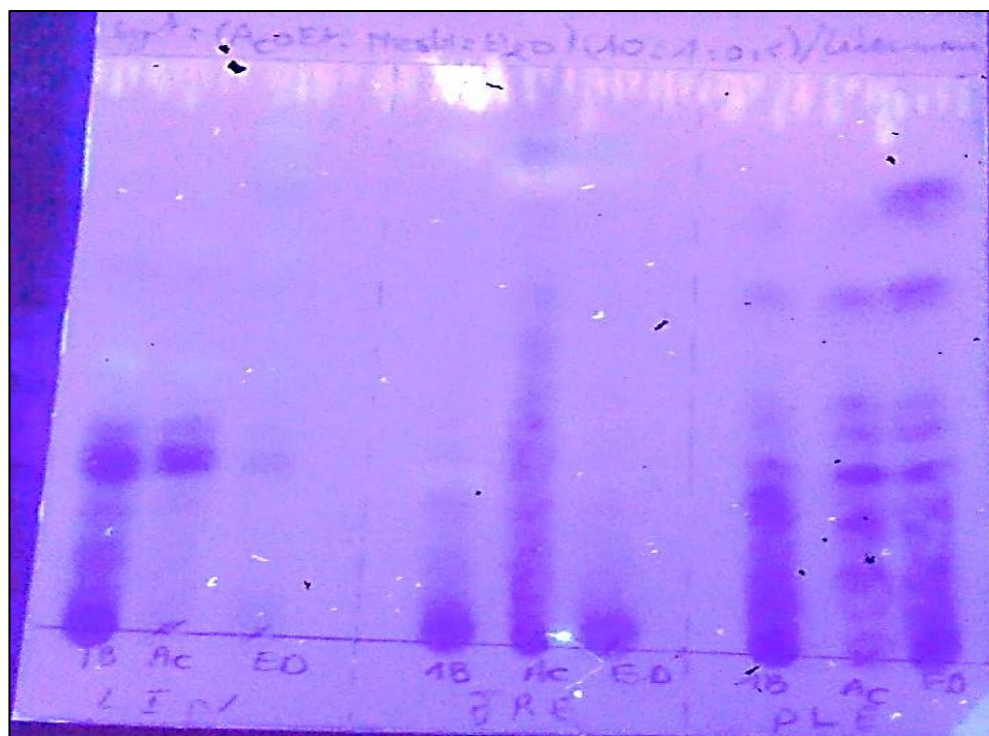


Figure 34: CCM analytiques des phases des extraits de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice après révélation au réactif de Libermann- Burchard

Selon le type de composé testé, on observe des taches de colorations diverses à la lumière UV à 365 nm :

- Coloration rouge pour les triterpènes de type oléanane et ursane
- Coloration jaune orangée pour les triterpènes de type lupane
- Coloration jaune /jaune-vert pour les stéroïdes (Ladiguina et al., 1983)

II.3.1.3 Révélation au réactif FeCl₃

Le tableau 19 montre la richesse en composés phénoliques (tanins) des différentes fractions éther diéthylique (ED), acétate d'éthyle (AC) et 1 butanol (1B) des trois plantes *Lawsonia Inermis* (LIN), *Juglans regia* (JRE) et *Pistatacia lentiscus* (PLE). La révélation au réactif de FeCl₃ visualise les différents spots sur les chromatogrammes des extraits testés avec une coloration brune ou grise (Wagner and Blatt, 1996).

Tableau 19 : Caractérisation des différentes fractions des trois plantes révélées au réactif de FeCl₃

Plante \ Phases	LIN	JRE	PLE
ED	+	-	+++
AC	+	+++	+++
1B	+	-	+++

+++ : positif (très riches : plus de 3 spots)
 ++ : moyennement positif (riches : 3 spots)
 + : faiblement positif (pauvres : 1 ou 2 spots)
 - : test négatif (absence)

Tableau 20: Facteur de rétention (Rf en cm) des taches sur CCM de *Lawsonia Inermis* (LIN) révélées au réactif de FeCl₃

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.86	1	0.40	1	0.20
2	-	2	-	2	0.40

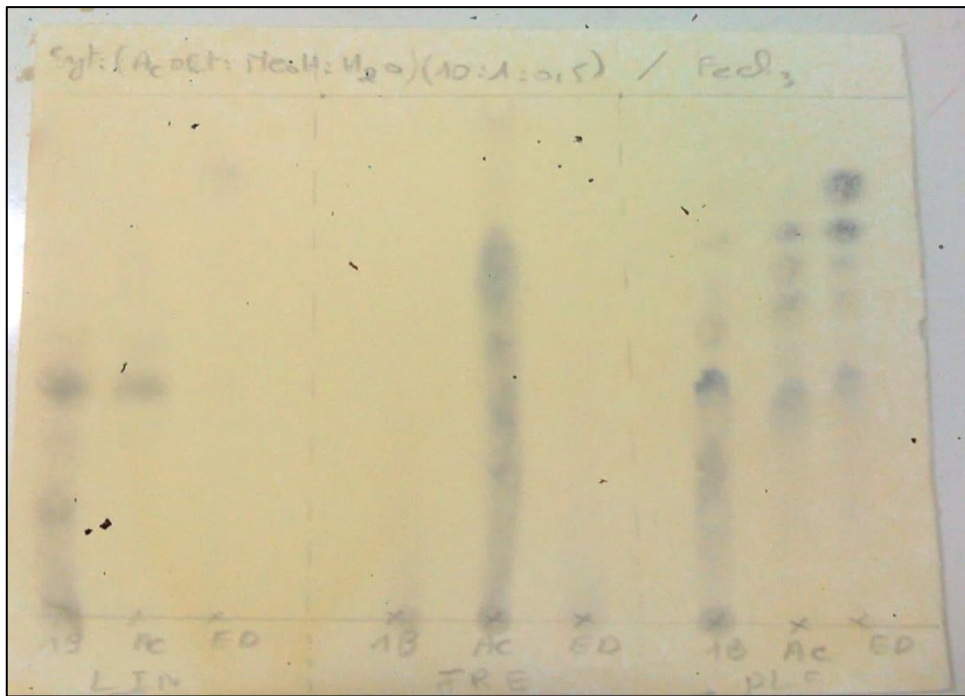
Tableau 21: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de *Juglans regia* (JRE) révélées au réactif de FeCl₃

Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	-	1	0.13	1	-
2	-	2	0.26	2	-
3	-	3	0.40	3	-
4	-	4	0.50	4	-
5	-	5	0.66	5	-
6	-	6	0.97	6	-

Tableau 22: Facteur de rétention (RF en cm) des taches sur CCM de *Pistatacia lentiscus* (PLE) révélées au réactif de FeCl₃

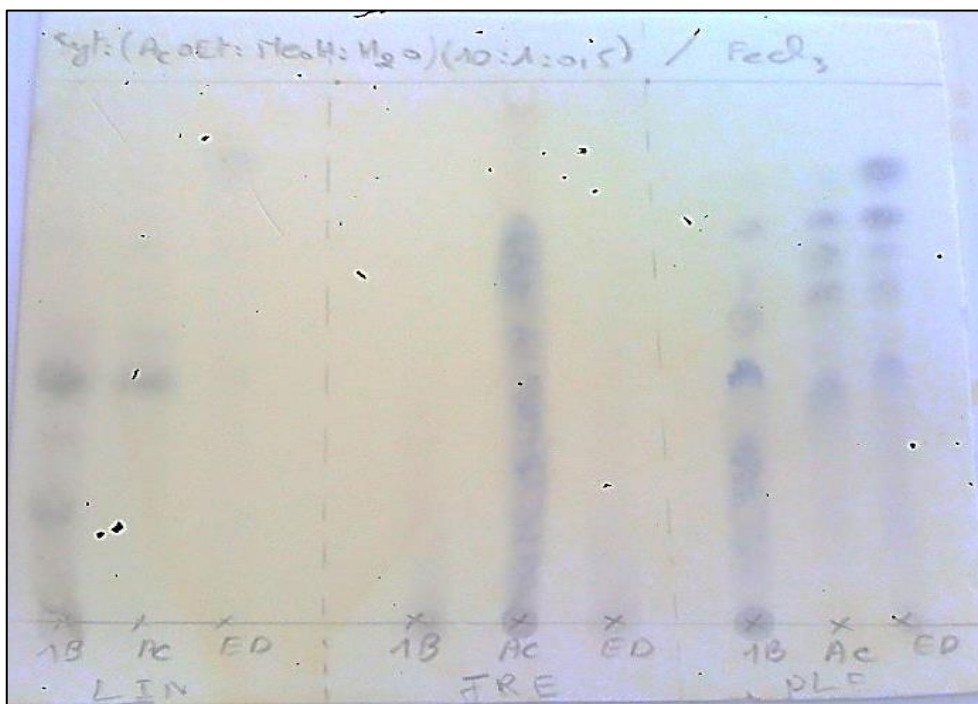
Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase 1butanol	
Spots	Rf	Spots	Rf	Spots	Rf
1	0.46	1	0.40	1	0.26
2	0.6	2	0.60	2	0.46
3	0.69	3	0.66	3	0.53
4	0.74	4	0.73	4	0.72
5	0.84	5	-	5	-

La présence des tanins révélée au réactif FeCl₃ a été caractérisée par l'apparition des taches au niveau des trois fractions de PLE (5 spots) et au niveau de la phase AC de JRE (6spots). Ces composés sont peu présents au niveau de toutes fractions de LIN (1 spots).



visible (avant révélation)

Figure 35 : CCM analytiques des phases des extraits de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice révélées au réactif $FeCl_3$



Après révélation

Figure 36 : CCM analytiques des phases des extraits de *Juglans regia*, *Pistacia lentiscus* et de *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice révélées au réactif $FeCl_3$

II.3.2 CCM sur plaque de verre polyamide DC6

Les chromatogrammes d'analyse des différents extraits de *Lawsonia inermis*, *Juglans regia* et de *Pistacia lentiscus*, résultant de la séparation sur plaque de polyamide, montrent une présence importante de divers types de flavonoïdes par l'apparition des taches de différentes couleurs qui leurs sont caractéristiques. Le réactif de Neu les révèle en rouge, jaune, bleu et vert figure 38.

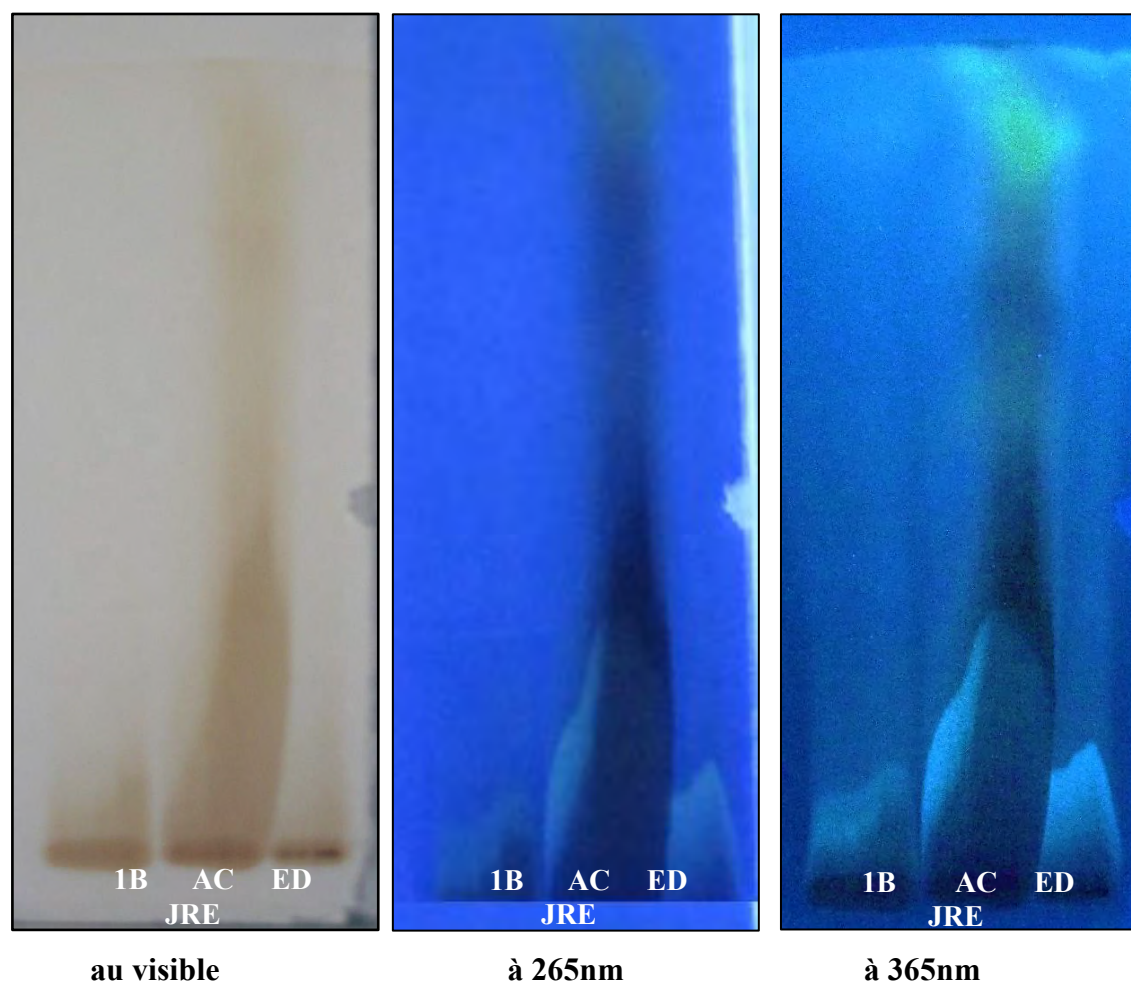
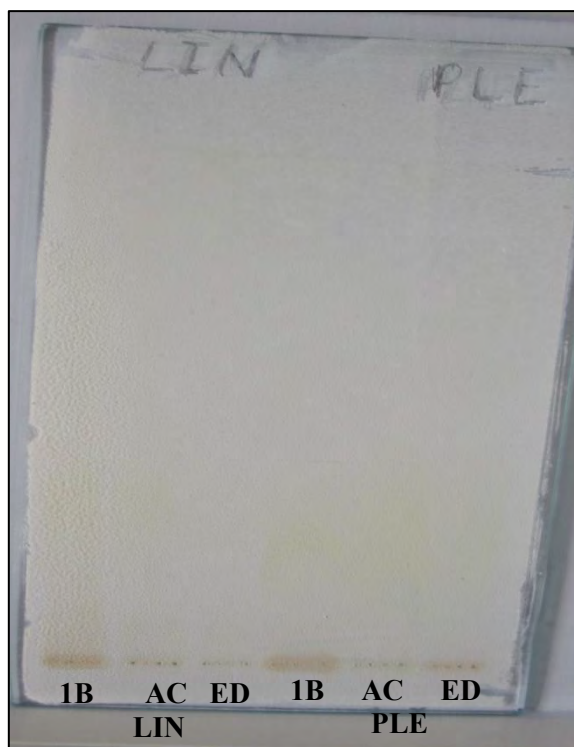
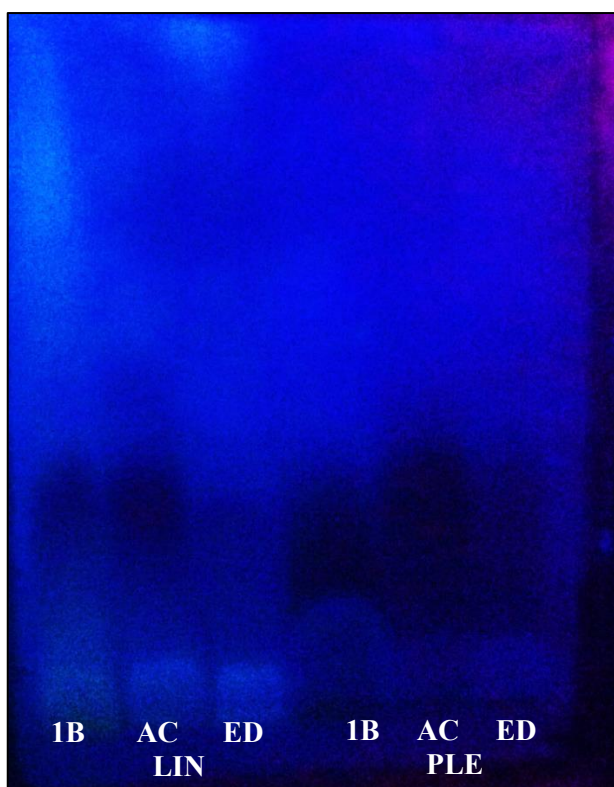


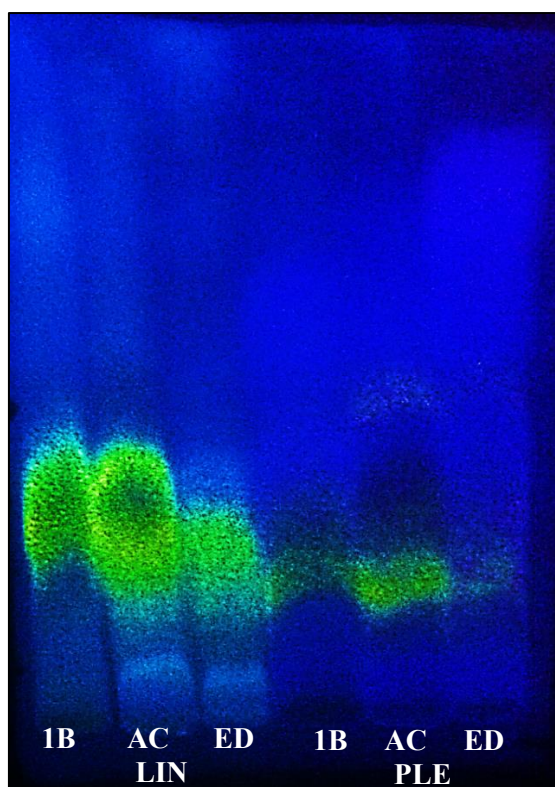
Figure 37 : Chromatogrammes résultants de l'analyse de l'extraits de *Juglans regia* par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10 ; v/v/v/v)



au visible (avant révélation)



à 265nm (après révélation)



à 365nm (après révélation)

Figure 38 : Chromatogrammes résultants de l'analyse des différents extraits de *Lawsonia inermis* et de *Pistacia lentiscus* par chromatographie sur gel de polyamide DC6 développé dans le système solvant MEC/MeOH/EtOH/éther de pétrole (40/30/30/10)

(à droite : 256nm, à gauche : 356nm)

Les plaques obtenues par CCM sur polyamide présentent une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques, les taches sont bien distincts et montrent une richesse considérable de nos plantes en substances flavonoïques.

Partant de leurs fluorescences et R_f , les échantillons sont riches en flavones correspondant aux tâches violettes, brunes, et bleues (Treki, 2002 ; Madi, 2010) et en flavonols qui sont représentés par la couleur jaune et ses dérivés ; jaune pâle, jaune fluorescent et jaune orangé. Ceci est conforme avec les travaux de Kosar *et al.* (2005), Lima *et al.* (2007), ainsi que Hamlat *et al.* (2008). Ces derniers mentionnent que les plantes appartenant à la famille des *Anacardidaceae* sont riches en flavonoïdes ; de type flavones et flavonols.

Nos résultats confirment ainsi la présence des composés flavonoïques dans la classification chimique des espèces étudiées.

Tous ces composants phytochimiques mis en évidence peuvent être à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou de l'ensemble des substances biologiquement actives.

II.4 Analyse Spectrale

La spectroscopie UV est une méthode couramment utilisée dans l'élucidation des structures des flavonoïdes. La plupart des flavonoïdes étalent sur leurs spectres UV deux bandes d'absorption maximales, l'une entre 240-295 nm (bande II), caractérisant le système benzoyle du cycle A et l'autre entre 300-400 nm (bande I), caractérisant le système cinnamoyle du cycle B. Les intensités de ces bandes dépendent du degré de conjugaison de la structure. En dehors des bandes d'absorption des différents chromophores présents dans les flavonoïdes, ce spectre nous renseigne aussi sur le type de squelette des flavonoïdes et sur la position des groupements hydroxyles.

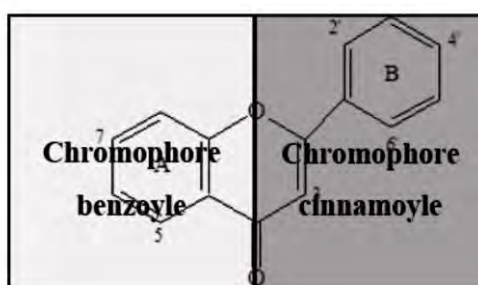


Tableau 23: Différentes bandes d'absorption des phases obtenue des extraits de PLE, JRE et LIN réalisés dans le méthanol.

Les espèces Végétales	Nature des Phases	Bande I (λ_{\max} en nm)	Bande II (λ_{\max} en nm)
PLE	Ether diéthylique	353	274
	Acétate d'éthyle	355	274
	1-butanol	358	275
	Eau	-	276
JRE	Ether diéthylique	-	256
	Acétate d'éthyle	-	256 – 258
LIN	Ether diéthylique	-	271
	Acétate d'éthyle	327	271
	1-butanol	-	273
	Eau	-	273

• Cas des phases des extraits de *Pistacia lentiscus*

La série des spectres UV des phases obtenues de l'extrait de PLE, les trois phases (Ether diéthylique, Acétate d'éthyle et 1-butanol) possèdent deux bandes d'absorption la première entre 250-280 nm : λ max = 274, 274 et 275 nm, respectivement et la deuxième entre 330-385 nm : λ max = 353, 355 et 358 nm, respectivement (tableau 23), ce qui est favorable à la prédominance des Flavonoïde de type **Flavonol**. La phase Eau possède une seule bande d'absorption entre 270-280 nm : λ max = 276 nm (Figure 39), caractérise la prédominance des **Flavanol**.

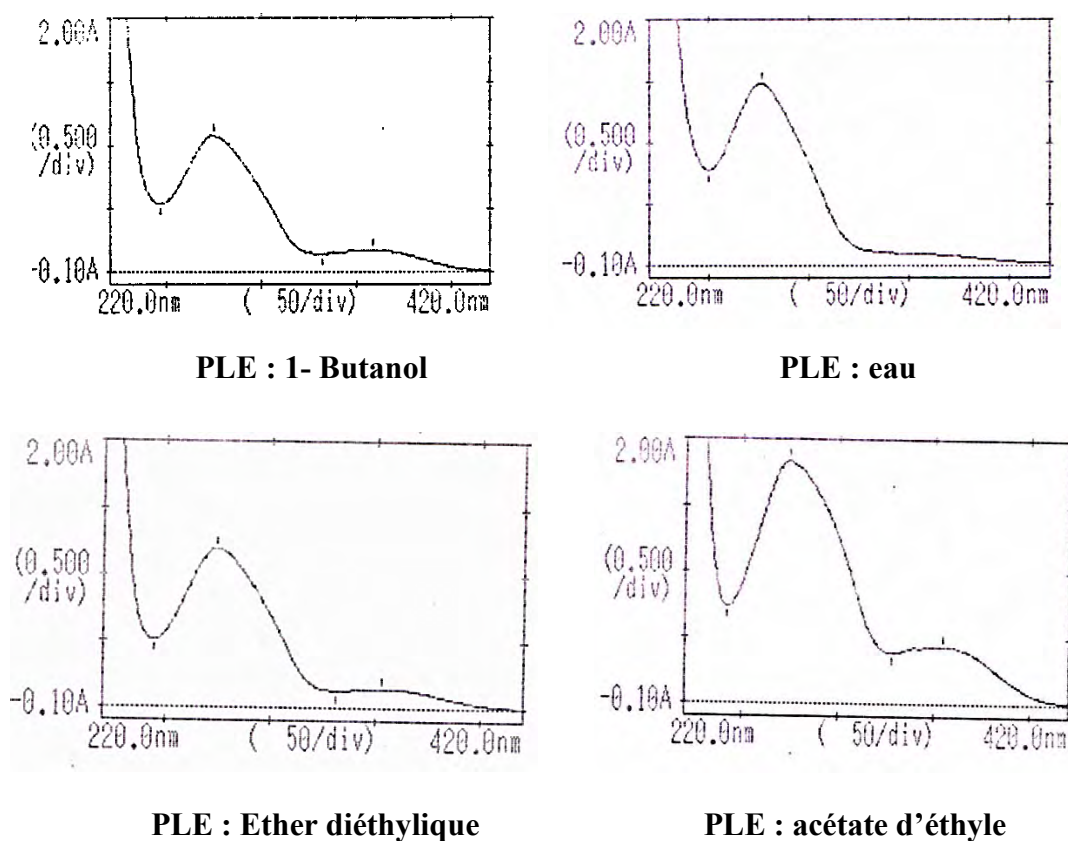


Figure 39 : Spectres d'absorption UV des extraits de PLE dans le méthanol.

- **Cas des phases des extraits de *Juglans regia***

Concernant les spectres UV des deux phases obtenues de l'extrait de JRE (Ether diéthylique, Acétate d'éthyle), ils possèdent uniquement une seule bande d'absorption entre 245-280 nm : $\lambda_{\text{max}} = 256, 256\text{-}258$ nm, respectivement, mais en absence d'autres bandes, la caractérisation de type des flavonoïdes reste délicate. A ce niveau, sur la base des données existantes sur les propriétés spectrales des flavonoïdes, cela nous permet d'attribuer la prédominance des flavonoïdes de nature **Flavonol**, **Flavone**, **Chalcone**, **Aurone** ou **Isoflavone**.

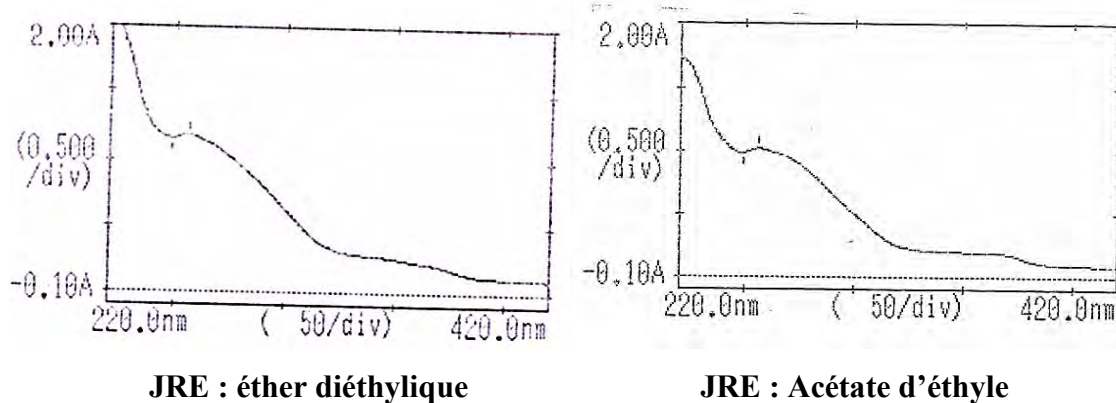


Figure 40: Spectres d'absorption UV des extraits de JRE dans le méthanol.

- **Cas des phases des extraits de *Lawsonia inermis***

Les spectres UV des phases obtenues de l'extrait de LNI (Ether diéthylique, 1-butanol et Eau), donne une seule bande d'absorption entre 245-280 nm : $\lambda_{\text{max}} = 271, 273$ et 273 nm, respectivement (Figure 41) mais en absence d'autres bandes, la caractérisation de type des flavonoïdes reste délicate. Ce qui nous permet de généraliser la prédominance des flavonoïdes de nature **Flavonol**, **Flavone**, **Chalcone**, **Aurone** ou **Isoflavone**. Alors que la phase d'Acétate d'éthyle possède deux bandes d'absorption la première entre 245-275 nm : $\lambda_{\text{max}} = 271$ nm, et la deuxième entre 300-330 nm : $\lambda_{\text{max}} = 327$ nm (Figure 41), ce qui est favorable à la prédominance des Flavonoïde de type **Flavone** ou **Isoflavone**.

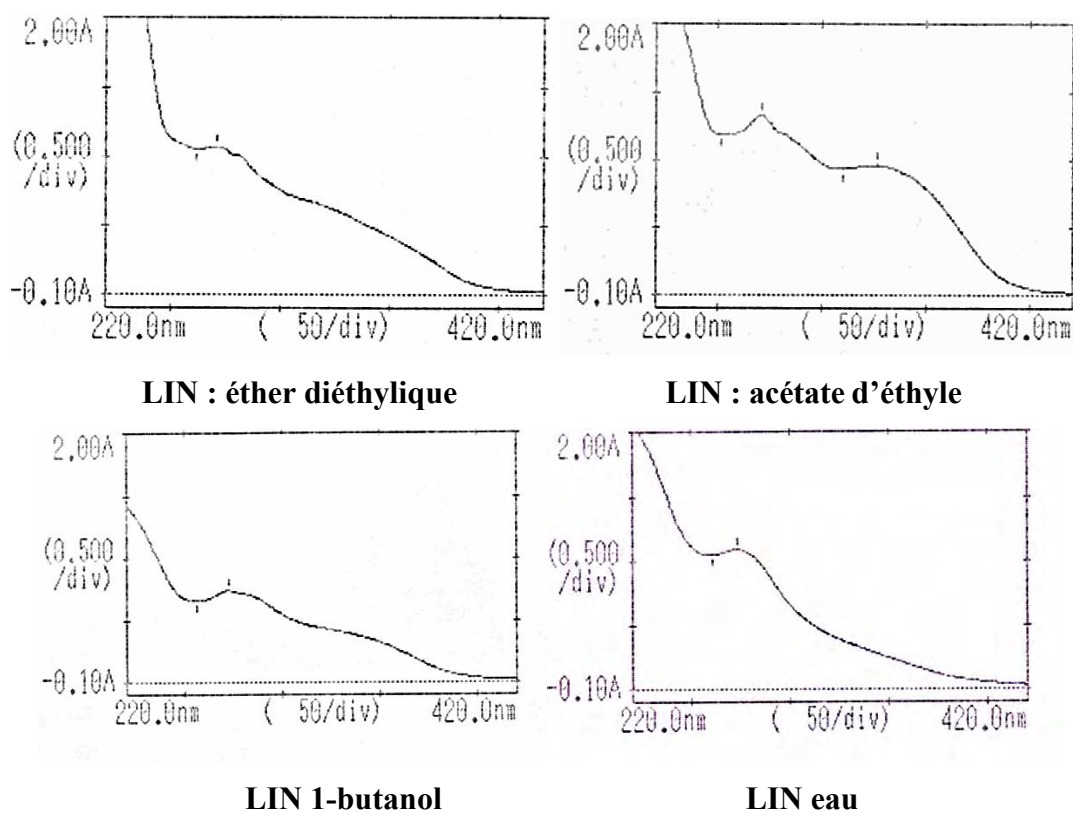


Figure 41: Spectres d'absorption UV des extraits de LNI dans le méthanol.

II.5 Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Un essai sur la phase acétate d'éthyle des feuilles la plante *lawsonia inermis* a été réalisé dans le but d'affirmer la présence des flavonoïdes dans cet extrait. En effet Les profils chromatographiques sont représentés au niveau de la figure 42 et les spectres UV-visible respectifs de chaque pic résultant sont donnés dans la figure 43; tandis que les résultats des analyses qualitatives sont rassemblés dans le tableau 24 (temps de rétention).

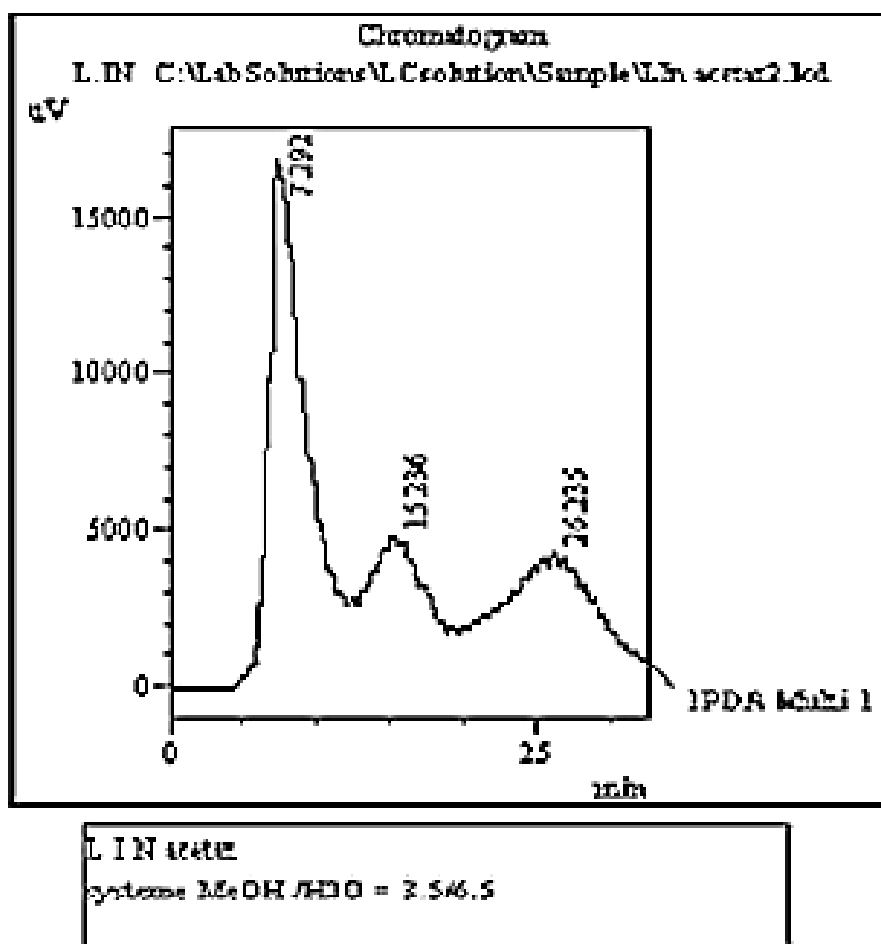


Figure 42 : Profil du chromatogramme (HPLC) de la phase acétate d'éthyle (AC) de *Lawsonia inermis*

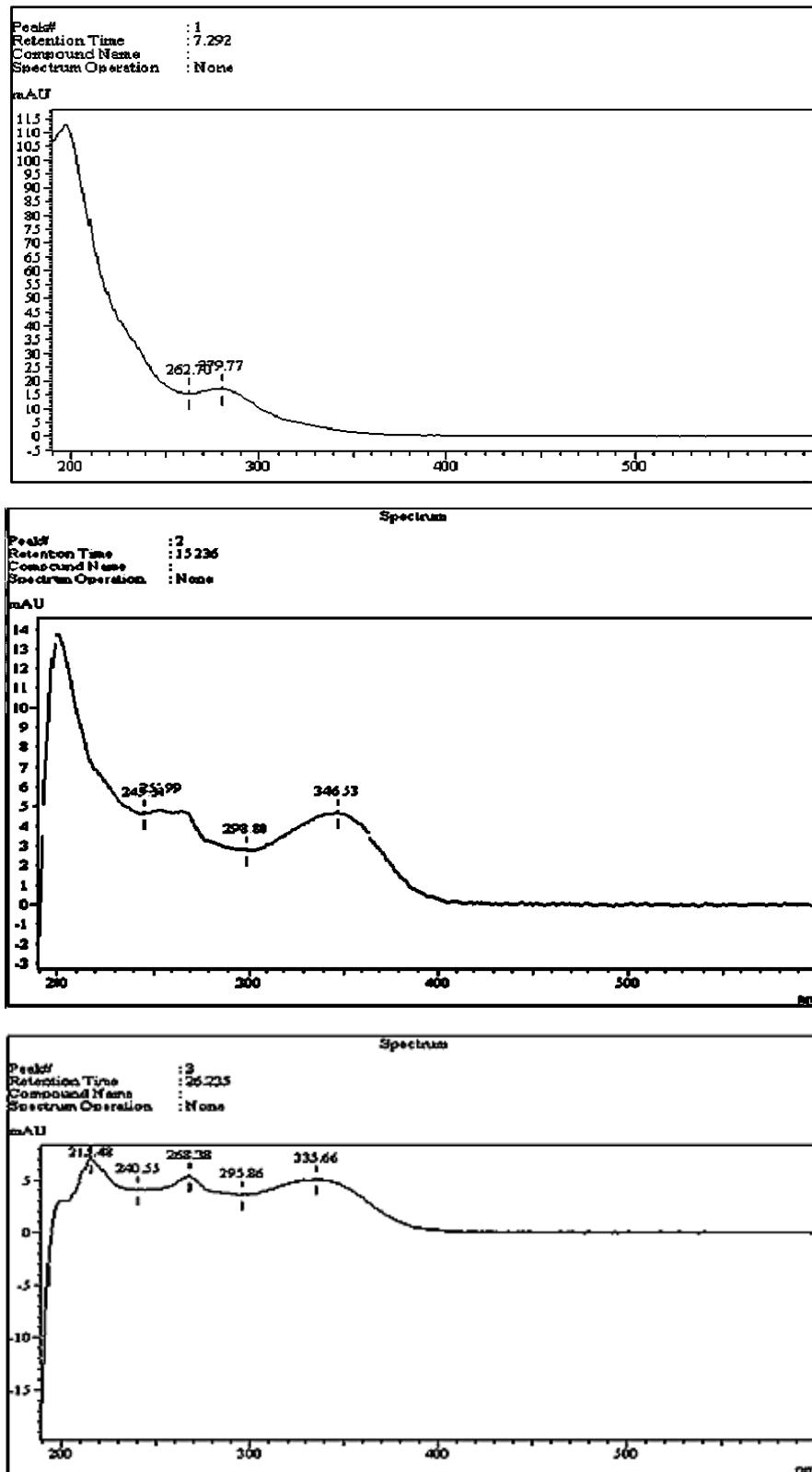


Figure 43: Spectres UV des pics élués à partir de la phase acétate d'éthyle (AC) de *Lawsonia inermis*

Tableau 24: Résultats de l'analyse en HPLC de la phase acétate d'éthyle (AC) de *Lawsonia inermis*

Peak Table C:\Lab Solutions\L\Csolution\Sample\L.in acetat2.lcd

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.292	2743572	15580	75.903	79.837
2	15.236	360665	2221	12.202	11.390
3	26.233	351600	1701	11.895	8.773
Total		2955837	19503	100.000	100.000

On peut observer une bonne résolution (efficacité) et séparation des différents pics résultants dans les profils chromatographiques. Il faut signaler que chaque pic correspond à une molécule.

Ainsi, trois pics ont été repérés pour cette fraction grâce au détecteur à barrettes de diodes qui a donné les profils UV de trois pics observés et a permis de les différencier grâce à leur maxima d'absorption. En effet, le premier pic a une forte absorption à 249 nm, le deuxième à une réponse à 286 nm et le troisième à 346 nm. Ces trois pics décelés dans le profil chromatographique peuvent nous faire supposer qu'on est en présence de molécules de flavonoïdes.

Les acides phénoliques présentent une bande maximale à 325 nm alors que les flavonoïdes ont deux bandes maximales à environ 250 nm et 350 nm.

II.6 Activité biologique

II.6.1 Activité antifongique des extraits totaux

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antidermatophyte des extraits hydroalcooliques de 3 plantes JRE, LIN et PLE sur la croissance *in-vitro* de 4 souches *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* et *Candida albicans*.

L'analyse des données expérimentales montre une activité antifongique notable de tous les extraits végétaux comparativement aux témoins (Griséofulvine) et au contrôle.

Les résultats obtenus ont révélé une activité antifongique remarquable significative des extraits végétaux de LNI, JRE et PLE contre les dermatophytes testés.

Tableau 25 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Trichophyton rubrum* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type).

	<i>Trichophyton rubrum</i>			
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD
LIN*	13	15	16	14.67 ±1.53** ^R
JRE*	14	14	13	13.67 ±0.58** ^R
PLE*	15	14	15	14.67 ±0.58** ^R
CONT	0	0	0	00± 0
GRISEO[▲]	20	20	20	20± 0

Tableau 26 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Trichophyton mentagrophytes* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type).

	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD
LIN*	13	14	16	14.33 ±1.53** ^M
JRE*	15	14	14	14.33 ±0.58** ^M
PLE*	18	17	16	17.00 ±1.00** ^{MM}
CONT	0	0	0	00± 0
GRISEO[▲]	20	20	20	20± 0

Légende : LIN : *Lawsonia inermis*, JRE : *Juglans regia*, PLE : *Pistacia lentiscus*

CONT : Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), GRISEO : Griséofulvine, D 1, 2 et 3 : Diamètre d'inhibition mesuré, Moy : Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, SD : écart type, * : 35mg/ml, ▲ : 0.6 µg/ml.

** (P<0.01) [extraits végétaux vs contrôle], MM (P<0.01) [extrait PLE vs LNI et JRE], les valeurs portant la lettre ne sont pas significativement différents.

À la concentration de 35 mg/ml les extraits végétaux de LIN, JRE, PLE et GRISEO à 0,6 µg/ml ont un effet significatif sur la souche de *Trichophyton rubrum* testé par rapport au contrôle, avec des diamètres de croissance de LIN (P<0.01), JRE (P<0.01) et PLE (P<0.01) : 14.67, 13.67 et 14.67 mm respectivement (Figure 44). Aucune différence significative entre les extraits de LNI, JRE et PLE.

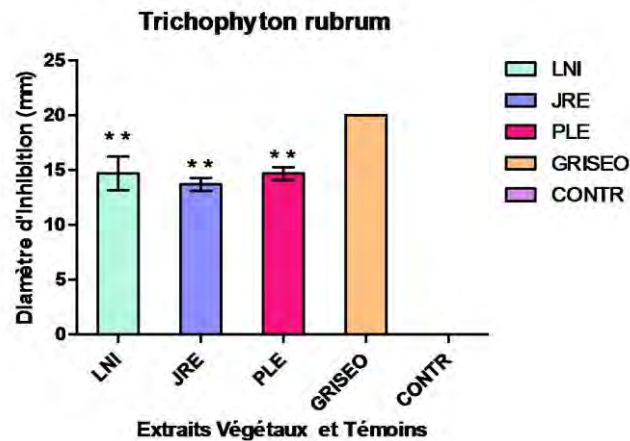


Figure 44 : Activité antifongique des extraits végétaux sur *Trichophyton rubrum*.

À la concentration de 35 mg/ml les extraits végétaux de LIN, JRE, PLE et GRISEO à 0,6 µg/ml ont un effet significatif sur la souche de *Trichophyton mentagrophytes* testé par rapport au contrôle. Avec des diamètres de croissance de LIN ($P < 0.01$), JRE ($P < 0.01$) et PLE ($P < 0.01$) : 14.33, 14.33 et 17 mm respectivement (Figure 45). Une différence significative de l'extrait PLE ($P < 0.01$) par rapport aux extraits LIN et JRE, par contre aucune différence significative entre les extraits de LIN et JRE.

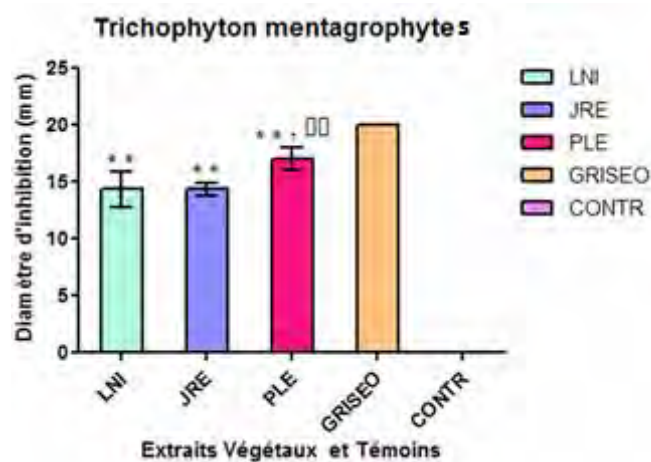


Figure 45 : Activité antifongique des extraits végétaux sur *Trichophyton mentagrophytes*

Tableau 27 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Microsporum canis* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type)

	<i>Microsporum canis</i>			
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD
LIN*	15	16	15	15.33 ±0.58** ^{.C}
JRE*	14	15	15	14.67 ±0.58** ^{.C}
PLE*	16	17	17	16.67 ±0.58** ^{.OO}
CONT	0	0	0	00± 0
GRISEO[▲]	20	20	20	20± 0

Tableau 28 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Candida albicans* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance fongique +/- écart type).

	<i>Candida albicans</i>			
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD
LIN*	18	19	19	18.67 ±0.58** ^{.♦♦}
JRE*	17	17	16	16.67 ±0.58** ^{.A}
PLE*	17	18	17	17.33 ±0.58** ^{.A}
CONT	0	0	0	00± 0
GRISEO[▲]	20	20	20	20± 0

Légende : LIN : *Lawsonia inermis*, JRE : *Juglans regia*, PLE : *Pistacia lentiscus*

CONT : Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), GRISEO : Griséofulvine, D 1, 2 et 3 : Diamètre d'inhibition mesuré, Moy : Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, SD : écart type, * : 35 mg/ml, ▲ : 0.6 µg/ml.

** (P<0.01) [extraits végétaux vs contrôle], OO (P<0.01) [extrait PLE vs LNI et JRE], ♦♦ (P<0.01) [extrait LNI vs JRE et PLE], les valeurs portant la lettre ne sont pas significativement différents.

À la concentration de 35 mg/ml les extraits végétaux de LIN, JRE, PLE et GRISEO à 0,6 µg/ml ont un effet significatif sur la souche de *Microsporum canis* testé par rapport au contrôle. Avec des diamètres de croissance de LIN (P<0.01), JRE (P<0.01) et PLE (P<0.01) : 15.33, 14.67 et 16.67 mm respectivement (Figure 46). Une différence significative de l'extrait PLE (P<0.01) par rapport aux extraits LIN et JRE, par contre aucune différence significative entre les extraits de LIN et JRE.

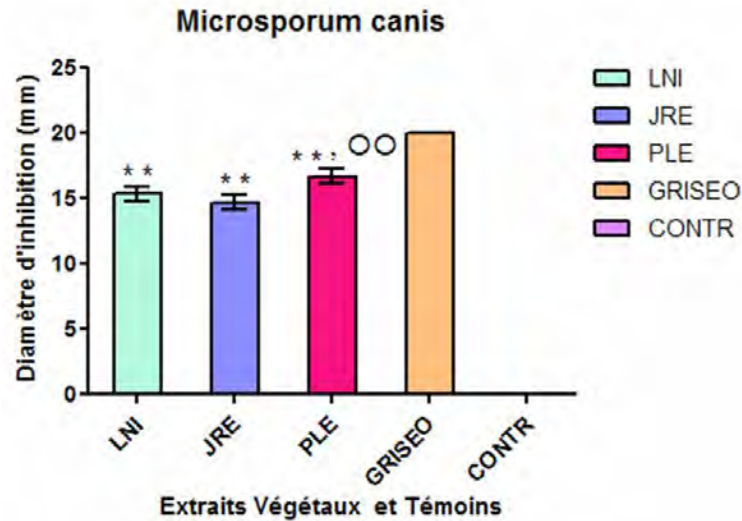


Figure 46 : Activité antifongique des extraits végétaux sur *Microsporium Canis*.

À la concentration de 35 mg/ml les extraits végétaux de LIN, JRE, PLE et GRISEO à 0,6 µg/ml ont un effet significatif sur la souche de *Candida albicans* testée par rapport au contrôle. Avec des diamètres de croissance de LIN ($P < 0.01$), JRE ($P < 0.01$) et PLE ($P < 0.01$): 18.67, 16.67 et 17.33 mm respectivement (Figure 47). Une différence significative de l'extrait LNI ($P < 0.01$) par rapport aux extraits JRE et PLE, par contre aucune différence significative entre les extraits de JRE et PLE.

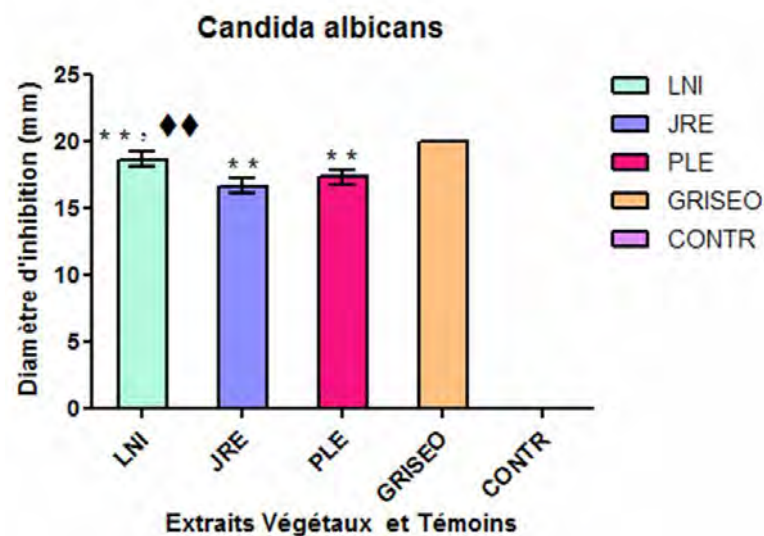


Figure 47: Activité antifongique des extraits végétaux sur *Candida albicans*.

Par la méthode de dilution sur milieu liquide, nous avons évalué la concentration minimale inhibitrice de LIN ayant développé une activité fongicide avec une différence significative par rapport aux extraits de JRE et PLE vis à vis de *C.albicans*. De même pour PLE ayant développé une activité fongicide avec une différence significative par rapport aux deux autres extraits (LIN JRE) et ceci vis à vis *Tr. Mentagrophytes*.

Tableau 29 : Concentration Minimale d’Inhibition (CMI) des extraits végétaux les plus actifs.

MICROORGANISMES	CMI des Extraits végétaux (mg / ml)	
	LIN	PLE
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ND	0,068
<i>Candida albicans</i>	0 ,034	ND

Actuellement, peu de médicaments efficaces sont disponibles pour le traitement des infections fongiques et plus particulièrement pour les dermatomycoses. Depuis la connaissance des principes actifs, contenus dans des plantes supérieures, et qui sont doués de propriétés pharmacologiques, plusieurs auteurs se sont orientés vers la recherche de plantes à activité antifongique. Dans la présente étude nous avons testé la sensibilité de quatre souches fongiques, isolées cliniquement, à l’action des extraits de trois plantes très connues en médecine traditionnelle algérienne et qui sont : *Lawsonia inermis*, *Pistacia lentiscus* et *Juglans regia*.

Les résultats ont montré que les trois plantes utilisées possèdent des propriétés antifongiques, ce qui justifie l’utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle.

Concernant *L. inermis*, **Misra et Dixit (1979)** ont rapporté que l’extrait éthanolique de cette plante possède une activité antifongique. Des analyses phytochimiques de cette plante ont révélé la prédominance de composés phénoliques (coumarines, flavonoïdes, naphthalène et les dérivés de l’acide gallique) (**Siddiqui et al., 2003**). D’autres composés comme les triterpénoïdes, les stéroïdes et les hydrates de carbone aliphatiques ont été également isolés (**Siddiqui et Kardar, 2001; Siddiqui et al., 2003**) Abulyazid et al. (2010) ont signalé la richesse de cette plante en naphthoquinones dont les principaux composants sont la Juglone, la lawsone et la plumbagone. Des études portées sur les naphthoquinones naturelles (**Binutu et al., 1996; Gafner et al.,1996;**

Brigham et al., 1999) et celles obtenues par synthèse (**Bogdanov et al., 2001 ; Riffel et al., 2002**) ont démontré que ces molécules inhibent la croissance de souches fongiques et bactériennes pathogènes. A l'optique de ces travaux, on pourrait attribuer l'activité antifongique de *L. inermis* principalement aux naphthoquinones.

Quant à *Juglans regia*, il a été prouvé par **Pereira et al. (2008)** et **Oliveira et al. (2008)** que les extraits de fruits de cette plante exercent une activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. De même une activité antimicrobienne a été démontrée à partir des extraits de l'écorce (**Alkhawajah, 1997**). Des analyses phytochimiques portées sur les différentes parties de cette plante ont montré sa richesse en composés phénoliques qui sont représentés principalement par les naphthoquinones et les flavonoïdes (**Li et al., 2008**) Signalons que ces molécules sont connues par leur pouvoir inhibant la croissance fongique.

De sa part, *P. lentiscus* a fait l'objet de plusieurs études. Des analyses phytochimiques ont porté sur les différentes parties de cette plante; des polyphénols ont été identifiés dans les feuilles (**Romani et al., 2002**). L'huile essentielle des feuilles est caractérisée essentiellement par sa richesse en α -Pinène, γ -terpinène et terpinène-4-ol (**Ben Douissa et al., 2005; Duru et al., 2003**) Des Flavonoïdes ont été également isolés de la partie aérienne de cette plante (**Kawashty et al., (2000)**). Une étude de **Duru et al., (2003)** portant sur la résine de *P. lentiscus* a révélé une activité antifongique vis-à-vis de *Rhizoctonia solani*. De même, les extraits de feuilles ont inhibé la croissance de *Phythium ultimum* et *Rhizoctania solani* (**Kordali et al., (2003)**).

Les résultats de la présente étude confirment cette propriété pharmacologique et prouvent la sensibilité d'autres souches fongiques (*Trichophyton mentagrophyte*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* et *Microsporium canis*) à l'extrait de feuilles de *P. lentiscus*.

Dans une évaluation phytochimique des différents extraits des écorces de *Juglans regia*, **Kshitij et al., (2013)**, affirme que l'extrait d'écorce de *Juglans regia* à différentes concentrations a une propriété anti - inflammatoire significative . Cette étude prouve l'efficacité de *Juglans regia* comme agent thérapeutique efficace dans le traitement des inflammations aiguës. Le résultat de cette étude authentifie les informations sur la propriété anti-inflammatoire de l'extrait d'écorce de *Juglans regia* (**Georgewill et Georgewill, 2010**).

Les résultats émanant de ces tests nous ont permis de montrer que les extraits hydroalcooliques des plantes étudiées inhibent in vitro la croissance des souches testées à des degrés de sensibilité variable.

Les extraits de *P. lentiscus* et de *L. inermis* ont développé une activité fongicide avec une concentration minimale inhibitrice de 0,068 mg/ml et 0,034 mg/ml respectivement vis-à-vis des souches *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida albicans*.

Les résultats concluants de notre étude nous permettent de rattacher l'activité antidermatophyte des extraits totaux à la richesse de nos plantes en métabolites mis en évidence lors du criblage phytochimique caractérisant les molécules naturelles responsables de cette activité antifongique.

II.6.2 Activité antifongique des extraits des phases

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives (**Mohammedi, 2013**)

Pour cela et dans le but d'estimer le potentiel antifongique de nos extraits, nous avons jugé important de compléter notre étude en évaluant l'activité des phases obtenues par épuisement successif avec des solvants à polarité croissante par la méthode de diffusion sur milieu gélosé décrite dans le chapitre matériel et méthodes. Les souches testées sont celles utilisées au préalable lors de l'évaluation de l'activité des extraits totaux. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 30 : activité antifongique des fractions ED, AC et 1B des extraits des plantes JRE, LIN et PLE sur la croissance *in-vitro* de *Trichophyton rubrum* (*T. rub*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T. men*), *Microsporum canis* (*M. canis*) et de *Candida albicans* (*C. Alb*).

Plantes Souches	PLE			JRE			LIN		
	ED	AC	1B	ED	AC	1B	ED	AC	1B
T. men	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. rub	-	-	-	-	+	-	+	+	-
M. canis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Alb	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+peu d'activité ; -pas d'activité

L'activité antifongique vis-à-vis des quatre souches dermatophytes a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Cette dernière est déterminée à différentes concentrations des fractions des trois plantes comme l'indique le tableau 31.

Tableau 31: Concentrations des différentes fractions des extraits testés (mg/ml) (lecture à 420nm (λ des flavonoïdes), blanc 2ml de Méthanol et 20 μ l de DMSO)

Plantes	AC	ED	1B
LIN	0.203	0.629	0.416
JRE	0.415	0.365	1.536
PLE	0.408	0.506	0.982

En effet, pas d'activité ou peu d'activité a été constaté sur nos échantillons pour la plupart des souches ; principalement *Trichophyton mentagrophytes* (*T. men*) et *Microsporum canis* (*M. canis*) qui n'ont pas été sensibles aux extraits testés. Quant à *Trichophyton rubrum* (*T. rub*), il a développé une légère activité pour les deux phases acétate d'éthyle (AC) et éther di-éthylique (ED) des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* et seulement la phase éther di-éthylique (ED) des extraits d'écorce de *Juglans regia*. Cependant, *Candida albicans* (*C. Alb*) a été l'unique

souche inhibée par la majeure partie des différentes fractions (ED, AC et 1B) des trois plantes (JRE, LIN et PLE). Cela justifie la théorie d'**Ouraini et al. (2007)** qui avancent qu'en ce qui concerne les champignons filamenteux, les méthodes de références utilisent des suspensions de spores permettant une utilisation en routine et que certaines études *in vitro* tendent à montrer que les résultats diffèrent selon que l'on utilise des spores ou des filaments.

En **2010**, **Noumi et al.** ont affirmé lors d'une étude sur les propriétés antifongiques par la méthode de diffusion sur gélose que l'extrait acétate d'éthyle de *Juglans regia* a une activité antifongique puissante contre toutes souches de *Candida* et particulièrement pour *Candida albicans* (CMI : 0,006 mg/ml). Ce qui justifie l'activité relevée lors de nos essais contre cette même souche. Ces résultats indiquent que les extraits peuvent contenir des composés ayant un potentiel thérapeutique contre les souches de *Candida* et, par conséquent, leur utilisation possible en tant qu'agents thérapeutiques.

Kpemissi (2007), dans une étude sur 26 extraits de neuf espèces d'*Anacardiaceae*, a révélé une activité antifongique de 32,80% sur huit souches filamenteuses et 76,92% sur deux levures, soit deux fois et demi celle sur les filamenteux. Au total ces 26 extraits ont eu une activité de 42,32% sur les dix souches testées, soit 23 extraits ont été actifs sur *Trichophyton mentagrophytes*, 14 sur *Trichophyton rubrum* et 20 sur *Candida albicans*.

Selon ce même auteur, l'activité est due probablement aux composés chimiques contenus dans ces plantes comme le corroborent les résultats de travaux de nombreux chercheurs. Les dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* et *Microsporum gypseum*) sont plus sensibles aux activités des extraits que les contaminants et que *Candida albicans* a prouvé sa sensibilité à la majorité des extraits testés, ce qui est en accord avec nos résultats.

Rahmoun et al. (2010) affirment que les différents extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle du henné comme étant les fractions les plus actives contre la levure *C. albicans*. Ces données suggèrent que cette activité est fortement liée à la présence de la *Lawson* dans des feuilles de henné. L'inhibition de la croissance de micro-organismes témoigne que le henné Algérien peut être largement exploité dans la recherche de nouveaux médicaments antimicrobiens.

Dans ses travaux, **Biabiany (2011)** avance que les extraits issus d'écorce, riches en tanins, perdent leurs activités au cours du fractionnement et qu'il y a clairement une interaction des tanins avec le champignon visible grâce au test des disques. Cela a été constaté lors de notre étude sur

l'écorce de *Juglans regia* où aucune activité n'a été observé principalement contre les souches : *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*.

Cette perte d'activité fongique serait due aux interactions des tanins avec la paroi fongique (**Biabiany, 2011**). Certains tanins sont connus pour se lier aux protéines ; ils pourraient donc probablement induire une modification de perméabilité membranaire et permettre alors l'entrée dans la cellule fongique d'autres composés qui possèderaient une activité cytotoxique et donc antifongique.

En phytochimie, la démarche classique consiste à extraire la plante à l'aide de plusieurs solvants en cascade ce qui a pour effet de diminuer voire rompre l'action synergique des composés lorsque celle-ci est indispensable à l'activité. Ce sont les fractions issues de ce protocole qui sont généralement testées et étudiées.

Le constat qui montre l'absence ou le peu d'activité obtenue lors de nos essais sur les différentes fractions, contrairement à la nette présence de cette activité lors des tests *in vitro* réalisés sur les extraits totaux, peut expliquer l'existence d'une synergie entre les constituants d'une plante. La synergie est le résultat de l'interaction entre plusieurs composés, de sorte que les effets biologiques d'une plante ou d'une partie de plante sont supérieurs à la somme des effets de ses constituants étudiés isolément (**Alkhawajah, 2007 ; Biabiany, 2011**)

Les scientifiques n'ont pas réussi à déterminer le mécanisme exact de la synergie, mais les hypothèses retenues sont :

- La présence d'antioxydants permettant la conservation des principes actifs.
- La présence de principes actifs complémentaires (flavonoïdes) potentialisant l'action du principe actif ayant montré une activité biologique.
- La présence d'un principe actif non encore isolé.

Selon **Bergeret et Tetau (1983) ; Hivin (2008)**, La plante totale a une action plus nette, plus complète que l'un ou plusieurs de ses principes actifs isolés ; Elle constitue un ensemble synergique naturel d'une activité thérapeutique plus souple, plus maniable que celle d'un alcaloïde ou d'un hétéroside. De plus, elle permet pour un même résultat de prescrire une dose moindre et, de ce fait, de rester en deçà d'un seuil de toxicité. Dans une drogue végétale il y a de nombreux constituants et ce n'est pas parce qu'on en a isolé un ou plusieurs qu'il n'en existe pas

encore une multitude d'autres qui peuvent par leur synergie d'action conférer à la plante son effet thérapeutique.

Les trois plantes utilisées lors de notre screening sont reconnues biologiquement actives en médecine traditionnelle avec des résultats probants (**Alkhawajah, 2007 ; Gagandeep et al., 2010; Benamor et al., 2010 ; Kamal et Jawaid, 2010**). Celles-ci ne révélant que trop peu ou pas d'activité lors de nos tests, nous laissent avancer plusieurs éventualités quant à cette absence de réponse lors de nos tests *in vitro* ;

- La médecine traditionnelle utilise le jus des feuilles, dont la composition chimique est impossible à reproduire expérimentalement par solvant ainsi que les éventuelles associations et synergies de composés qui peuvent s'opérer naturellement.
- La plante est utilisée fraîche en médecine traditionnelle. Lors de cette étude, pour des raisons de conservation, nous avons pris le parti de sécher les plantes. Cette étape préliminaire de séchage peut engendrer des altérations chimiques des composés et provoquer la perte de l'activité.
- Les concentrations testées peuvent être insuffisantes pour visualiser une activité, cela nous amène à augmenter les doses des drogues testées pour éventuellement arriver à un effet significativement positif.

En effet, l'absence d'activité *in vitro* n'est pas synonyme d'absence d'activité réelle et au contraire, l'activité *in vitro* n'est pas garante d'une activité ultérieure. Il est totalement impossible de reproduire dans leur intégralité les facteurs impliqués dans une interaction peau/champignon/antifongique (**Biabiany, 2011**) ; Nous ne pouvons que nous en approcher en élaborant des modèles (solvants et tests pharmacologiques) et il convient toujours de garder un œil critique vis-à-vis de nos résultats.

Un résultat positif devra par conséquent toujours être validé par la suite sur le patient par la mise en place de tests cliniques. De plus, au cours des tests *in vitro*, d'une façon générale, dans un extrait brut, des interactions peuvent se produire et des phénomènes notamment de précipitation ou d'émulsion, peuvent interférer dans le résultat (faux positifs/négatifs) (**Ferrari, 2008 ; Akroum, 2011**).

Les caractéristiques de la technique d'analyse sont essentielles, l'opérateur devant s'assurer de sa sensibilité, de sa spécificité et de sa reproductibilité. La fiabilité des résultats en dépend. De plus, l'isolement des composés actifs lorsque cela est possible permet de caractériser et de corroborer l'activité observée (*in vitro* ou sur l'animal).

CONCLUSION

L'utilisation des plantes ou de leurs extraits pourrait constituer une excellente alternative aux problèmes de résistance aux antifongiques. Ce présent travail s'intéresse à l'effet antifongique des feuilles des PLE et LIN et de l'écorce de JRE, notamment à leur activité antidermatophyte.

Cette étude a comme objectif de contribuer à caractériser la nature chimique des substances intervenant dans cette activité. Ainsi, un criblage phytochimique bioguidé a révélé la présence de quatre grands groupes chimiques (tanins, flavonoïdes, Stéroïdes et Terpénoïdes et saponines) dans les extraits totaux de nos trois plantes sélectionnées. Ces groupes chimiques qui sont connus pour leurs activités antimicrobiennes pourraient être responsables des activités antifongiques observées.

La CCM sur gel de silice et polyamide ainsi que l' HPLC, nous a permis de confirmer les résultats des réactions de caractérisation. Les chromatogrammes résultants révélés sous UV avant et après la détection au réactif de Neu, nous a donné une idée sur la nature des composés phénoliques présents, essentiellement des flavonoïdes. La révélation aux réactifs de Liebermann-Burchard et de FeCl₃ a mis en évidence la présence des terpènes et des stéroïdes et des tanins. Les flavonoïdes des extraits des phases acétate d'éthyle, ED, 1B et eau identifiés par la spectrophotométrie UV-Visible confirment la présence des molécules de natures Flavonol, Flavone, Chalcone, Aurone ou Isoflavone présentes dans nos trois plantes.

Par ailleurs, les activités *in vitro* des extraits hydroalcooliques testés sur la croissance des 3 souches dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*) et sur une levure (*Candida albicans*) ont été significativement remarquable pour PLE, LIN et JRE à la concentration de 35mg/ml ; ce qui justifieraient l'utilisation de ces extraits par les tradithérapeutes dans le traitement des affections de la peau et des plaies.

L'évaluation du pouvoir antidermatophyte des extraits totaux de *P. lentiscus* et de *L. inermis* ont développé une activité fongicide avec une concentration minimale inhibitrice de 0,068 mg/ml et 0,034 mg/ml respectivement vis-à-vis des souches *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida albicans*.

L'activité des extraits des phases obtenus par affrontement successifs a été notable pour *Candida albicans*, unique souche inhibée par la majeure partie des différentes fractions (ED, AC et 1B) des trois plantes (JRE, LIN et PLE).

Cette partition nous a permis de nous confronter aux conséquences éventuelles du fractionnement phytochimique et à la perte d'activité induite. Les différentes classes de composés ont des propriétés complémentaires et agissent en synergie, pour un effet totum. Ceci rend compte de la complexité organisée de la nature.

Cependant, le mécanisme d'action de ces extraits demeure une piste à explorer. La recherche des activités des différentes fractions des extraits constitue une des façons de faire pour l'étude de l'efficacité de chaque extrait. Afin de mieux appréhender les activités de ces extraits totaux actifs pour un meilleur bien-être des populations, il serait donc intéressant de :

- Déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de cette activité ;
- Faire une étude toxicologique et une évaluation clinique ;
- Entreprendre la culture et le suivi des espèces aux activités antifongiques les plus intéressantes en vue d'assurer leur préservation pour une utilisation durable et rationnelle ;
- Etendre cette méthodologie à l'étude d'autres familles de plantes à potentialités thérapeutiques ;
- Prendre en compte des éventuelles synergies de composés dans la plante ;
- Définir des limites des modèles utilisés *in vitro* ou lors du fractionnement afin de valider correctement les résultats ;
- Les souches utilisées doivent provenir d'isolats cliniques en priorité afin de se rapprocher au plus près des conditions *in vivo*.

Pour une étude beaucoup plus pointue, on pourra envisager de mener d'autres investigations telles que :

- La détermination du meilleur moment de prélèvement des organes végétaux pour obtenir une bonne composition chimique des extraits ;
- L'étude des activités d'extraits de boutons floraux, fleurs, fruits, graines, jeunes pousses et éventuellement des huiles essentielles.

A terme, ces études doivent permettre de trouver de nouveaux antifongiques pour accroître la gamme des antifongiques naturels dans notre pays et aussi de contourner le cas de résistances aux antifongiques classiques, de proposer une exploitation durable des espèces Algériennes à extraits actifs.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abadie J., (2007).** La traite des plantes. La recherche. 51 (411) : 50-52.
- **Abah, S.E. and G. Abah, (2010).** Antimicrobial to and Antioxidant Potentials of *Agaricus bisporus*. Advances in Biological Research, 4(5): 277-282.
- **Abbas M., Boudriche D., (2007).** Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pictacia lentiscus* L. et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques, Centre de recherche et de developpement, Saidal, Alger.
- **Abd-el-Malek Y, El-Leithy MA, Reda FA, Khalil M., (1973).** Antimicrobial principles in leaves of *Lawsonia inermis*. Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie 128: 61-67.
- **Abdel-Rahman A and Soad A., (1975).** Mastic as antioxidant. J Am Oil Chem Soc, 52, 423.
- **Abulyazid, I. Elsayed M.E. Mahdy b, Ragaa M. Ahmed., (2010).** Biochemical study for the effect of henna (*Lawsonia inermis*) on *Escherichia coli*. Arabian Journal of Chemistry (2010), doi:10.1016/j.arabjc.2010.10.005(In press).
- **Afzal, M., Al-Oriqual, G., Al-Hussan, J.M. and Mohammed, N.; (1984).** Isolation of 1,2-dihydroxy-4-glucosyloxynaphthalene from *Lawsonia inermis*. Heterocycle, 22, 813-816.
- **Afzal, M., Al-Oriquat, Al-Hussan, J.M. and Mohammed, N.; (1980).** Flavone glycosides from *Lawsonia inermis*. Heterocycle, 14, 1973-1976.
- **Aganga A.A., Mosase K.W.,(2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. Animal Feed Science and Technology, 91:107-113.
- **Ait youssef, M., (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Edition Ibis press 349 p.
- **Akinpelu D. A.,(2001).** Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark. Fitoterapia, 2001; 72 : 286-287.
- **Akroum S., (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat en Science de l'Université de Constantine
- **Al-Amiery Ahmed A., Kadhum Abdul Amir Hassan., Abu Bakar Mohamed (2012)** Antifungal activities of new coumarins. Molecules 17, 5713-5723 ISSN 1420-3049.
- **Alcamo J, Kauppi P, Posch M, Runca E (1984).** Acid Rain in Europe: A Framework to Assist Decision Making. IIASA Working Paper WP-84-032.
- **Ali-Shtayeh MS, Yaghmour R, Faidi, Y, Salem K and Al-Nuri M (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. J Ethnopharmacol, 60, 265-271.

- **Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z and Mahajna J (2000).** Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. J Ethnopharmacol, 73, 221-232.
- **Alkhawajah A. M. (2007).** Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. Am J Chin Med. 1997;25(2):175-80.
- **Alkhawajah, A.M., (1997).** Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. Am. J. Chinese Med. 2008 (25), 175–180.
- **Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF., (2008).** Walnut [*Juglans regia*] leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. Food Chem 106: 1014-1020.).
- **Al-said, M, Ageel A, Parmar N and Tarik M (1986).** Evaluation of mastic a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. J Ethnopharmacol, 15, 271-278.
- **Amarowicz R., Troszynska A., Shahidi Fereidoon., (2005).** Antioxydant activity of Almond seed extract and its fractions. Journal of Food Lipids, 12:344-358.
- **Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F. (2005)** Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. J food lipids. 12: 344-358.
- **M. Deiana, A. Rosa, V. Casu, F. Cottiglia, L. Bonsignore, M. A. Dessì. (2003)** Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. Journal of the American Oil Chemists' Society.2003, Volume 80, Issue 1, pp 65-70
- **Anderson, C. M. Halleberg, A., Hogberg T. (1996)** Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. Adv. Drug. Res., 28 : 65-180.
- **Arbonnier M (2009)** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quae Amazon France 3ème édition 528 P
- **Aron P. M., (2007).** Composition of Flavonoid Phenolic Polymers Isolated from red wine during maceration and significance of flavan-3-ols in foods pertaining to biological activity. Thèse master. Oregon State University, 194 p.
- **Arya R., Babu V., Ilyas M., Nassim K. T. (1989).** Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. J Indian Chem Soc, 1989 ; 66 : 67-68.
- **Asha kale, Sucheta Gaikwad, Kavita Mundhe, Irmala Deshpande and Jyoti Salvekar, (2010).** Quantification of phenolics and flavonoids by spectrophotometer from *Juglans regia*. International Journal of Pharma and Bio Sciences.ijpbs.net Natural Chemistry ISSN 0975-6299 Vol.1/Issue-3/Jul-Sep.2010
- **Atmani D.,Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D., (2009).** Antioxydant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, J. Elsevier, Food Chemistry 112 / 303–309

- **Aubreville A., (1970).** Flore forestière soudano-guinéenne AOF- Cameroun-AEF. Société d'éditions géographiques maritimes et coloniales, 523p.
- **B. P. Georgivskii, N. F. Komissarenko, C. E. Dmitrou., (1990).** Les composés bioactifs des plantes médicinales, ed., Naouka, 1990, 336 p.
- **Badiaga M.,(2012).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia Smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse Docteur d'université. Ecole doctorale des sciences fondamentales.183 p.
- **Bagre I., Bahi C., Gnahoue., Djaman A. J. and Guede-Guina F. (2007).** Composition phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antifongique des feuilles de *Morinda morindoides* (BAKER) *Milne-redh (rubiaceae)* sur *Aspergillus fumigatus* et *Candidat albicans*. J.sci. pharm. Biol., 8 (1), 15-23. EDUCI.]
- **Bahorun T.,Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur T ., Gazin TC.,Pinkas M., Luycky M ., Gazin M.(1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation.Arznein Forsch/Drug Res1-6.
- **Balasundram, N., K. Sundram and S. Sammar, (2006).** Phenolic compound in plants and agri-industrial by-products. Antioxidant activity, occurrence and Food Chem., 1: 191-203.
- **Balkis MM, Leidish SD, Mukheryei PK, Ghannoun MA. (2002).** Mechanism of fungal resistance. Drugs 2002;62:1025–140.
- **Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L. (1973).** The thin layer chromatography of flavonoids. Chemistry of natural compounds, 9 (1): 17-21.
- **Bartosikova , Necas, Suchy and Kubinova (2003).** Antioxydative effects of morine in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory. Drug and Chemical Toxicology, 72, 87-94.
- **Bataille X. (2000).** Livre interactif de chimie.
- **Batawita K, Kokon K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P.(2002).** activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togalaise : *Conyza aegyptiaca* (L) Ait. Var. *lineariloba* (DC) O. Hoffum (Asteraceae).
- **Belhadj, S., (2000).** Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, p 108.
- **Bellakhdar, J., (2003).** Le Maghreb à travers ses plantes: plantes, productions végétales et traditions au Maghreb. Eds. Le fennec.
- **Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M., (2005).** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. Flavour and Fragrance Journal, 20, 410–414.

- **Benamor H., Rached W., Derdour A et Marouf A. (2010).** Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Biol. Sci.*, 10 (1) : 1-9, 2010.
- **Benhammou N ; Bekkara F A ; Kadifkova Panovska T, (2008).**Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 2(2). pp. 022-028, April, 2008
- **Berbaut J., (1971-1979).** Flore illustrée du Sénégal, tomes 1 à VI. Clairafrique, Dakar.
- **Bergeret C., Tetau M.,(1983).** La phytothérapie rénovée. 2e édition Maloine, Paris, 1983.. Classification Dewey : 610-Sciences médicales.
- **Berthillier, A. (1972),** La chromatographie et ses applications, Dunod Paris.
- **Besle J, Lamaison J, Pradel P, Fraisse D, Viala D and Martin B (2004).** Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc Rech Ruminants*, 11, 67-70.
- **Bhardwaj, D.K., Jain, R.K., Jain, B.C. and Mehta, C.K.; (1978).** 1-hydroxy-3,7 dimethoxy- 6- acetoxanthone, a new xanthone from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*,17, 1440-1441.
- **Bhoury Wissem, Ines Skandrani, Mohamed Ben Sghair, Marie Geneviève Djoux Franca, Kamel Ghedira and Leila Chekir Ghedira (2011).** Digallic acid from *Pistascia lentiscus* fruits induces apoptosis and enhances antioxidant activities. *Phytother Res*, Epub.
- **Biabiany M. (2011).** Recherche et développement d'extraits antifongiques issus de la flore Guadeloupéenne : Caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation. Thèse de doctorat université Lille nord de France.
- **Biallo D., Sanogo R., Yasambou H (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (*Rhamnaceae*). *C. R. Chimie.* 7 : 1073-1080.
- **Binutu, O.A., Adesogan, K.E., Okogun, J.I., (1996).** Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Med.* 62, 352– 353.
- **Bock B., (2013).** Base de Données Nomenclature de la Flore de France. Tela Botanica. BDNFF v4.02.
- **Bogdanov, P.V., Ortiz, C.S., Eraso, A.J., Albesa, I., (2001).** Relationship between chemical structure and antibacterial activity in methylated isoxazolyl naphthoquinones. *Med. Chem. Res.* 10, 577–586.
- **Boiron P., (2005).** Pathologies Tropicales : Introduction à la mycologie médicale. In : Thèses Ph.D., Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée aux Biotechnologies Industrielles. Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques. Faculté de pharmacie de Lyon.

- **Bonev I.; (1973).** Note technique sur le noyer, production des plants greffés et création des noyeraies. Ed. Bibliothèque forestière. Alger. 31p.
- **Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E.,(2004).** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 50:120-123.
- **Bossche H. U., Mackenzie D. W. R., Cauwenbergh; C., Cutsem J. V., Drouhet E., Dupont B (1990).** Mycoses in aids patients. New-York : Plenum Press ; 27-53
- **Botineau., (2010)** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs édition Lavoisier 501pp.
- **Botton B., Bretton A., Fevre M., Gauthier S., Guy PH., Larpent J. P., et al. (1990).** Biotechnologies. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle, 2e éd Paris : Masson,
- **Bouchet PH., Guignard J. L., Villard J., (1999)** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés de Pharmacie, Paris : Masson.
- **Bouchet PH., Guignard J.-L. Pouchus Y.-F., Villard J., (2005)** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés de Pharmacie, Paris : Masson.
- **Bouchet Ph., Masanes C., Delaude C. (1986).** Activités antidermatophytes et anti-levures d'une série de saponines extraites de végétaux récoltés au Zaïre. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, 1986 ; XV (2) : 533-538.
- **Bouhadjera K.,(2005).** contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana r.br. et Aristida pungens l.* thèse Diplome de Doctorat d'état université abou bekr belkaid Algérie 149p.
- **Boullard B., (2001).** Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. Edition ESTEM 307 pp.
- **Bretauudeau J.; (1981).** Atlas d'arboriculture fruitière. Vol.IV. Ed. J-B Bailliere. Paris.pp.147- 170.
- **Brigham, L.A., Michaels, P.J., Flores, H.E., (1999).** Cell-Specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.* 119, 417–428.
- **Broadasky T.F., Lewis C., Eble t. E., (1976).** Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, ; 123 : 33-44.
- **Brouta F., Dexamps F., Losson B., Mignon B., (2001).** Données récentes sur la pathogénèse de l'infection à *Microsporum canis* chez les Carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.* Vol. 145 ; pp 236-242.

- **Bruneton J., (1987).** pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 1ère Edition Lavoisier.
- **Bruneton J., (2009).** pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4ème Edition Lavoisier.
- **Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie et Phytochimie des plantes médicinales. 2ème édition, Paris.P 914.
- **Bruneton, J., (1996).** Plante toxique : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 529.
- **Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3eme Ed, Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.
- **Burgot G., Burgot J.L., (2002).** Methodes instrumentales d'analyse et d'applications. Ed.médicales internationales.
- **Burke R. W., Diamondstone B. I., Velapoldi R. A. et Menis O., (1974).** « Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol », dans Clin. Chem.,vol. 20, no 7, 1974, p. 794-801
- **Cabrera M ., Simoens M ., Falchi G. Lavaggi M.L ., Puo O-E ., Castellano E-E ., Vidal A., Azqueta A ., Monge A ., Cerain A.L ., Sagraera G ., Seoane G ., Grecetto H. and Gonzalez M.,(2007).** Synthetic chalcones, flavanones and flavones as antitumoral agents : Biological evaluation and structure activity relationships, Bioorganic et Medical Chemistry, 15:3356 -3367. cellular action mechanism. J Pharmaco .Sci, 96, 229-254.
- **Chen C.N., Weng M.S., Wu C., Lin J.k., (2004).**Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells. Food Chemistry, 1(2):175-185.
- **Chung KT., Wong TY., Wei CL., Huang YW and Lin Y., (1998).** Tannins and human health: a Chrysanthemum segetum L. By capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 709 197-202.
- **Collins CH., Lyne PM and Grange J.M., (1995).** Microbiological Methods. Seventh ed., Butterworths, London
- **Congiu Raffaele., Falconieri Danilo., Bruno Marongiu., Alessandra Piras and Silvia Porcedda., (2002).** Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. Flavour and Fragrance Journal, 17(4), 239–244.
- **Cordell, G. A.,(1981).** Introduction to alkaloids, a biogenetic approach, John Wiley, New York.
- **Coste H., (1937).** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.

- **Cottiglia F., Loy G., Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L., (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4): 302-305.
- **Cowan, M.M.,(1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-570.
- **Cushine T P T and Lamb A J., (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agent*, 26, 343-356.
- **Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb., (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.
- **Dacosta Y., (2003).** Les phytonutriments bioactifs. (Ed)Paris.317p.
- **Dalal H., (1986).** Valorisation du Henné au Sénégal *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae).UCAD, Fac de Med. et de Pharm., 80p.
- **Das H C, Wang J H and Lien E., (1994).** Carcinogenecity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relation ship analysis. *Journal of Food Engineering*, 69, 133-136.
- **De Candolle A., (1904).** Origin of cultivated plants.Kegan Paul, Trench, Trubner et Co., London.
- **De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T.,(2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2): 31-63.
- **Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L., (2003).** Natural product: their chemistry
- **Delahousse G., (2003)** Les plantes à propriétés antifongiques. Thèse docteur en pharmacie. Université de Nantes. Faculté de pharmacie 109P
- **Delmeyda W., (2001).** Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site).chromatographie sur couche mince.),
- **Delmeyda W. Remise à jour., (2000).** méthodes de chimie analytiques et instrumentales (cours).
- **Diallo A. M., (2005).** Etude des plantes médicinales de Niafunke (region tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* forsk. (Capparidacee). thèse de doctorat d'état. Université de Bamako.
- **Diallo A-M., (2005).** Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée).Thèse de Doctorat. Université de Bamako.125p.

- **Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S., (1999).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var.chia. *Planta Med.* 65, 749-751.

- **Yarikamarani, Y., Messaoud, A., Babak, E., Souheila, M.B., Mahnaz, S.G. (2007).** Inhibitori effects of Flavonoid-rich extract of *Pistacia vera* hullon growth and acid production of bacteria in valved in dental plaque. *International Journal of pharmacology*, 3: 219-226.

- **Hseini, S., Kahouadji, A.,(2007).** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental) *LAZAROA*, 28: 79-93.

- **Villar, A., Sanz, M.J., Payo, .M., (1987).** Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *Int J Crude Drug Res* 25, 1-3.

- **Paraschos, S., Magiatis, P., Mitaku, S., Petraki, K., Kaliaropoulos, A., Maragoudakis, P., Mentis, A., Sgouras, D., Skaltsounis, A.L., (2007).** In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother* 51, 551-559.

- **Djerrou Z, Djaalab H, Riachi F, Serakta M, Chettoum A, Maamer Zi, Boutobza B, Hamdi Pacha Y, (2013).** Irritantcy potential and sub acute dermal toxicity study of *Pistacia lentiscus* fatty oil as a topical traditional remedy. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, Vol 10, No 3.

- **Djerrou Z., Maameri Z., Hamdi-Pacha Y., Serakta M., Riachi F., Djaalab H and Boukeloua.(2010).** Effect of Virgin Fatty Oil of *Pistacia Lentiscus* on Experimental Burn Wound's Healing in Rabbits. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*; 7(3): 258–263.

- **Dinesh Babu P. and Subhasree R.S.(2009).** Activities of *Lawsonia inermis* - A Review. *Academic Journal of Plant Sciences* 2 (4): 231-232, 2009. ISSN 1995-8986.

- **Dob T., Dahmane D and Chelghoum C., (2006).** Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* L from Algeria. *Journal of essential oil research: JEOR* e 18(3): 335-338.

- **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm.*, 142: 61-78.

- **Doughari et al., (2007).** Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, 2011, p. 772 -790-778.
- **Dupont B., (1992).** Traitement de la Cryptococcose au cours du SIDA. J. Mycol. Méd., 2 (suppl.I) : 15-22.
- **Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S. and Hirata, T., (2003).** Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. Fitoterapia. 74 : 170-176.
- **Dzhuraev, K.S., Nuraliev, Y.N., Kurbanov, M., Akhmedova, L.F. and Abyshev, A.Z.; (1982).** Leaf coumarins of *Lawsonia inermis* grown in Tadzhikistan. Rast. Resur., 18, 377-379.
- **E. Noumi, M. Snoussi, H. Hajlaoui , E. Valentin ., A. Bakhrouf., (2010).** Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases Volume 29 , Issue 1 , pp 81-88
- **E. Y. Ladiguina, L. N. Safronitch., V. E. Otriachenkova, I. A. Balandina, N. I. Grinkevitch. (1983).** Analyse chimique des plantes médicinales, ed., Moskva, Vischaya Chkola, 1983, 172 p,
- **Ekoumou C., (2003).** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- **El Babili F, Valentin A, Chatelain C., (2013).** Lawsonia Inermis: Its Anatomy and its Antimalarial, Antioxidant and Human Breast Cancer Cells MCF7 Activities. Pharmaceut Anal Acta 4: 203. Volume 4 Issue 1.
- **El Sohly H.H., Joshi A.S., Nimrod A.C., (2001)** Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. Planta. Med., 67,87-89.
- **Erdemoglu N., Küpeli E., Ilada EY., (2003).** Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. J Ethnopharmacol 89: 23-129.
- **Fathallah A, Saghrouni F., (2008).** Le diagnostic des mycoses superficielles Hôpital farhat hached de sousse STPI: Tunis 25- 26 Avril 2008
- **Ferrari J., (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Ex A. Rich. Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.
- **Ferreira.M., et pereira-Wilson C. (2007).** Water and méthanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induce oxidative damage. Chemiobiological interaction. 167 : 107-115.

- **Feuilhade M., Bazase J., Claudy A, Roujeau J.C., (2002).** Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques. Infections à dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères. *Ann Dermatol Venereol*. Vol, 129 ; pp 2S58-2S64.
- **Fiorucci S., (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212 p.
- **Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M.,(2001).**The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 153-162.
- **Forestier, J.P., (1982).** Henné, Absorption de la lawsone par le cheveu. *International Journal of Cosmetic Science*, 4 : 153-174.
- **Formica J V and Regelson W., (1995).** Review of the biology of quercetine and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 33, 1061-1080.
- **Frutos P, Hervás G, F Giráldez and A Mantecón., (2004).** Review : Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.
- **Gacem M. A., (2011).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Magister en biologie, Université Kasdi Merbah- Ouargla, pp 87.
- **Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Evans, H.S., Hostettmann, K., (1996).** Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry* 42, 1315–1320.
- **Gagandeep C., Sandeep G., Priyanka P., (2010).** *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2010; 2(2): 91-98. ISSN 0975-248.
- **Garavel L., (1959).** La culture du Noyer. J.B. Baillière et fils, Paris, 285 p.
- **Garavel L.; (1971)** .Le stage "noyer". Bulletin de la vulgarisation forestière n°71. France 11p.
- **Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K and Komaitis M., (2008).** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methalonic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120-1130.
- **Gavrilorie M., Maginot M.J., Gavrilorie C.S., Wallach J., (1996).** Manipulation d'analyse biochimique. 3ème édition Doin Paris : 112-120.
- **Georgewill OA, Georgewill UO.,(2010)** Evaluation of the anti-inflammatory activity of extract of *Vernonia amygdalina*, *Asian Pac J Trop Med*, 3(2), 150-151.

- **Germain E., (1992).** Le noyer. In: A. Gallais et H. Bannerot (Eds), Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection, INRA, Paris, pp 620-632.
- **Gervais N., (2001)** .Aliments fonctionnels et produits nutraceutiques. Les fibres, les vitamines et les autres éléments nutritif .Le médecin de Québec, 36 (4) : 64-68.
- **Ghestem A., Segun E ., Paris M ., Orecchioni A-M. (2001).**Le préparateur en pharmacie : Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris ,273p.
- **Goetz P., et Busser C., (2007).** La phytocosmétologie. Edition Springer-Verlag France, Paris, 2007.
- **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1220-1234.
- **Grant wyllie S, Joseph J Brophy, Vassilios Sarafis and Hobbs., (1990).** Volatile Components of the Fruit of Pistacia Lentiscus. Journal of Food Science, 55 (5), 1325–1326.
- **Gregoriu D., Delacretas J., Borelli D.,(1986)** Traité de mycologie médicale, 2e éd. Paris : Doin.
- **Grillot R., (1996)** Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Collection option bio. Elsevier, 391 p.
- **Grünz G., Daniel H. and Spanier B.,(2010).** In vivo visualization of flavonoids in *C. elegans* using 2-aminoethyl diphenyl borate. The worm breeder's gazette 18 : 1
- **Guanon D, Nitriema JB, Sourabié S, Traoré LK, I, Guisson IP, Kondogbo B. (2003).** Etude in vitro de l'activité antifongique d'extraits des influrescences mâles de *Borassus aethiopum* (Mart.) Arecaceae.
- **Guignard J.L., (1998).** Abrégé de botanique. Masson (Ed). Paris, 212p.
- **Guignard, J.L., Dupont, F., (2004).** Botanique: Systématique moléculaire, 13eme édition. Paris: Masson.
- **Guyot, M., (1992).** Systématique des Angiospermes. Lomé (Togo): Presses Editogo.
- **H. Wagner, S. Bladt, E. Zgainski., (1996).** Plant drug analysis, a thin-layer, chromatography atlas, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2nd ed., New York, 320 p.
- **Hadi M., (2004).** La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p.

- **Hamad H Hasan., Ibrahim H Habib., Mariam H Gonaïd and Mojahidul., (2011).** Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour*, 1 (1), 15-23.
- **Hamimed S., (2009).** Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Magister en chimie organique. Université Constantine1. p166.
- **Hamlat N ; Hassani A ; Ouafi S. (2008).** Analyse des polyphénols extraits des feuilles du *Pistacia lentiscus* Etude de l'activité antibactérienne; *Revue des régions arides* ISSN 0330-7956 2008 (1), no21, pp. 306-316.)
- **Hamoir J, Goret M, Mignon B, Gustin P. (2001)** Actualités sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *An. Méd. Vét*, vol. 145, pp 226-232.
- **Harborne J.B., (1973).** *Phytochemical methods*. Chapman and Hall Ltd., London. pp. 49-188.
- **Hatano T., Kusuda M., inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66:2047-2055.
- **Hazebroucq G., Dorvault.t, (1994).** *l'officine*. 23ème édition. Vigot.
- **Hemingway, S. R. and Phillipson, J. D., (1980)** Alkaloids of the Rubiaceae. In : J. D. Phillipson and M.H. Zenk (Eds), *Indome and Biogenetically Related Alkaloids*. Academic Press, London, pp. 62-90.
- **Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., (2004),** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* N° 1: 3-6.
- **Hivin B. (2008).** *Phytothérapie et aromathérapie en élevage biologique bovin* enquête auprès de 271 éleveurs d0e France. Mémoire de docteur vétérinaire école nationale vétérinaire de Lyon
- **Hoffman L., (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 245p.
- **Hosein, H.K.M. and D. Zina, (2007).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna .*International Journal of Microbiological Research* 3 (3): 183-187, 2012
- **Hosein, H.K.M. and D. Zina, (2007).** Phenolic Compounds and Antioxidant

Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia Inermis*). World Journal of Dairy & Food Sciences, 2: 38-41.

- **Hostettmann, K. and Wolfender, J.-L., (2004).** Applications of liquid chromatography/ UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In Bioactive compounds in natural sources, Taylor and Francis, Londres : 31-68.
- **Hu S.G., Li L., He X.W., (2005).** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. Journal of Chromatography A, 1062:31-37.
- **Hulin A, Deguillaume A.M, Bretagne S Bézie Y (2005).** Bon usage des antifongiques dans le traitement des Candidoses et Aspergilloses invasives. J Pharm Clinic. Vol 24 N° 3 pp 125-138.
- **Huwez F U and Al-Habbal M J (1986).** Mastic in the treatment of benin gastric ulcers. Gastroenterologia Japonica, 21, 273-274.
- **Ignat I., Volf I., Popa I.V. (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food chemistry 126: 1821-1835.
- **Jacob Vaya and Saeed Mahmood., (2006).** Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia Lentiscus* L.). Biofactors, 28 (4), 169-175.
- **Janakat S and Al-Merie H., (2002).** Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. J Ethnopharmacol, 83, 135-138.
- **Jones S.B and Luchainger A.B ., (1979).** ‘Plant Systematic’, published by Mc Gram Hill Book Company, New York, London.
- **Jurd, L. and Horowitz, R., (1962),** Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- **Janakat, S., Al-Merie, H., (2002).** Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. Journal of Ethnopharmacology 83, 135-138.
- **Kordali. S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E., (2003).** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in turkey. Fitoterapia 74, 164-167.
- **Kuiate, J.R., Bessiere, J.M., Zollo, P.H.A., Kuate, S.P., (2006).** Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract

from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. From Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 160-165.

- **Kamagate Kone D., Coulibaly N.T., Brou E. and Sixou M., (2001).** Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. *Ortondo-stomatologie tropicale*. N° 95.
- **Kamal M., Jawaid T., (2010).** Pharmacological activities of *lawsonia inermis* L.: a review. *International Journal of Biomedical Research*. IJBR 1 [2] [2010]62-68
- **Karumi, Y., Onyeyili, P.A. & Ogugbuaja, V.O.,(2004).** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* 4, 179-182.
- **Kawashty, S. A., Mosharrafa, S. A. M., El-Gibali, M., & Saleh, N. A. M. (2000).** The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 915–917.
- **Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., (2005).** Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15: 3584-3587.
- **Kim H P, Son K H, Chang H W and kong S S., (2004).** Antiinflammatory plant flavonoids and
- **Klein R. S., Harris C. A., Small C. B., Moll B., Lesser M., Friedland G. H., (1984).** Other form of candidoses. *N. Engl. J. Med.*, 9 : 354-355.
- **Knežević S.V., Blazekwic B., Stefan M.B., Babac M., (2012).** Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In “Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao: 155-180.
- **Koffi, N., Beugré, K., Guédé, N., Zirihi, D. & Laurent, A., (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sciences & Nature* 6 (1), 1-15.
- **Kokwaro. J. O., (1986).** Anacardiaceae. In: Polhill, R. M. (Editor), 1986. *Flora of Tropical East Africa*.
- **Konan n. A., Bacchi E. M., Lincopan N., Varela D. S., Varanda E. A. (2007).** Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J ethnopharmacol.*; 100 : 30 - 38.
- **Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H. and Duru, M.E., (2003).** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species growth in Turkey. *Fitoterapia*. 74 : 164-167.
- **Kosar M., Dorman H.J.D., et Hiltunen R. (2005)** Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *lamiaceae*

- **Kouno I, Inoue M, Onizuka Y. et al., (1988).** Phytochemistry 27, 611-612.
- **Kpemissi Amana E., (2007).** Les *anacardiaceae* du togo : Études botaniques, Écologiques et propriétés antifongiques Université de Reims champagne-ardenne UFR Pharmacie 168p
- **Kpemissi Amana Eyana., (2007).** Les anacardiaceae du Togo : études botaniques, écologiques et propriétés antifongiques. Doctorat en biologie végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. p 182.
- **Kshitij Agarwal, Verma Ankit Kumar, Saini Prem., (2013).**In vitro antiinflammatory activity of juglans regia bark. Journal of Drug Delivery & Therapeutics; 3(4), 122-123
- **Lagnika L., (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur (Strasbourg/France): 268 p.
- **Lahouel M., (2005).** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- **Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P., (2004).** Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. Pathologie expérimentale 52 : 314-322
- **Larousse Médical. (2006).** Paris: Larousse.
- **Larpent, J.P et Sanglier, J.J., (1989).** Biotechnologie des antibiotiques, Masson, Paris.
- **Latte LP, Kolodziej H.,(2000).** Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. Naturforsch 55(5-6): 467-72
- **Laure F., (2005).** Etude de la composition chimique et de la biodiversité du *Calophyllum urophyllum* de Polynésie française. Thèse de doctorat, Nice.373p.
- **Leonti M., Casu L., Sanna F., Bonsegnore L., (2001).** A Comparison of Medicinal Plant Use in Sardinia and Sicily, De Materia Medica 72, 09122, Italy
- **Lessourd F.; (1920).** Le noyer. Ed. Lacadémie d'agriculture. Paris. 49p.
- **Leung, A.Y.; (1980).** Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, cosmetics, John Wiley and Sons, New York.

- **Lev E and Amar Z., (2002).** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J Ethnopharmacol*, 82, 131-145.
- **Li K, Geng, Simonsen J and Karchesy., (2004).** Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *Internationa Journal of Adhesion and Adhesives*, 24, 327-333.
- **Li, C., Liu, J. X., Zhao, L., Di, D. L., Meng, M., Jiang, S. X., (2008).** Capillary zone electrophoresis for separation and analysis of four diarylheptanoids and an α -tetralone derivative in the green walnut husks (*Juglans regia* L.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 749–753.
- **Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Chu FY, Wu MY, Huang YT, Hsueh PR. (2010).** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, 35 (5): 457-60.
- **Lima C.F., Patricia C., Valentao R., Andrade P.B., Seabra.R.M., Fernandes-Ferreira.M., et pereira-Wilson C. (2007).** Water and méthanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induce oxidative damage. *Chemiobiological interaction.*, 167 : 107-115.
- **Lindley, J. (1830).** An introduction to the Natural System of Botany. Longman, Rees, Orme, Brown and Green, London, England.
- **Lock O., Cabello I., Doroteo V. H., (2006).** analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*. 20 : 6-11.
- **Longo L., Scardino A., Vasapollo G., (2007).** Identification and Quantification of Anthocanins in The Berries of *Pistacia lentiscus*L Elsevier, Italy.
- **Luigia Longo., Scardino Anna and Vasapollo Giuseppe.,(2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*, 8 (3), 360- 364.
- **Mabberley, D.J., (1987).** The Plant Book (A portable dictionary of the higher plants). Cambridge: University Press.
- **Macheix JJ., Fleuriet A., Chritian JA., (2006).** Composés phénoliques dans la plante- structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire». Édition Lavoisier : 1-27
- **Mac Granahan G.H., Leslie C., (1990).** Walnuts (*Juglans*). In: Genetic resources of temperate fruit and nut crops, *Acta Horticulturae*, 290(2) : 907-951.

- **Madhavavi D. L., Deschpandle S., Salunkle D. K., (1996).** Food antioxydants technological, toxicological and health perspectives. Ed. Marcel Dekker, New York, 101 p.
- **Madi A., (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Thèse de magistère de l'université de Constantine.p 116
- **Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A., Chinou I B and Mitaku S., (1999).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var.chia. *Planta Med*, 65, 749-751.
- **Mahmoud, Z.F., Abdel Salam, N.A. and Khafagy, S.M.; (1980).** Constituents of henna leaves- *Lawsonia inermis* L. growing in Egypt. *Fitoterapia*, 51, 153-155.
- **Malec, L.S., Pamilio, A.B.,(2003).** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* 1, 30-38.
- **Malekzadeh F., (1968).** Antimicrobial Activity of *Lawsonia inermis* L. *American Society for Microbiology* Vol. 16, No. 4 p. 663-664.
- **Mamyrbekova-Bekro J. A., Boua B.B., Diaby A., Bekro Y.A., (2013).** Screening phytochimique bio guidé et évaluation in vitro des propriétés purgatives d'Anchomanes difformis (Blume) Engl., une plante utilisée en Côte d' Ivoire dans le traitement folklorique de la constipation. *Revue « Nature & Technologie »*. B-Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/ Pages 20 à 26
- **Marfak A., (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES.187 p.
- **Markham, K. R., (1982)** Technique of flavonoids identification, Academic press, London.
- **Markham, K.R. and Mabry, T.J., (1968).** *Phytochemistry*, 7, pp. 1197.
- **Marner FJ, Freyer A and Lex, J., (1991).** Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia Lentiscus*. *Phytochemistry* 30, 3709-3712.
- **Marone P, Bono, Leone, Bona, Carretto and Perversi., (2001).** Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, 13, 611-614.
- **Marston, A. and Hostettmann, K., (2006).** Developments in the application of counter current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 181-194.
- **Marston, A. and Hostettmann, K., (2006).** Separation and Quantification of Flavonoids. In "Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylors and Francis: 1-36.

- **Mazauric JP, Salmon JM. (2005).** Interactions between yeast less and tannins and related compounds on demathophytes, mould fungi and yeasts.
- **Mcgranahan G., Chuck L., (2009).** Breeding Walnuts (*Juglans Regia*) 249-275pp. In Mohan Jain., Priyadarshan P.M. Breeding Plantation tree crops temperate species. Springer édition.
- **Mendham, Denney, Barnes, Thomas., (2006).** Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck Larcier : 272.
- **Merck E. (Darmsadt), (1975).**Révélateurs pour la chromatographie en couches minces sur papier. Publisher, E. Merck, 1975. Length, 149 pages.
- **Merghem R., (2000).** Rôle des polyphénols et tanins condensés dans l'alimentation. Institut des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Constantine. Vol. n°3 : 113-118
- **Merghem R, (2009).** Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine: pp
- **Merghem R. (2011).** Les plantes sources de molécules d'intérêt pharmacologique ou nutritionnel. In « congrès international de Nutrition. 22, 23 Mai 2011. Université d'Oran, Algérie. P 24-25.
- **Merghem R., Jay M., Brun N., Voirin B. (2004).** Qualitative Analysis and HPLC Isolation and Identification of Procyanidins from *Vicia faba*. *Phytochemical Analysis* 15: 95-99
- **Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C., Voirin B. (1995).** Five 8-C-Benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry* 38, 3: 637-640.
- **Merghem R., Jay M., Viricel M.R., Bayet C., et Voirin B. (1995).** Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*,. 38 : 637-640 metal-catalysed reactions. *Annu Rev Biochem* 62 : 797-821.
- **Misan A.C., Mimica Dukic N.M., Mandic A.I., Sakac M.B., Milovanovic I.J., Sedej I.J., (2011).** Developpement of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Cent. Eur.J. Chem.* 9 (1): 133-142.
- **Misra, S. B. et Dixit, S. N., (1979).** Antifungal activity of leaf extracts of some higher plants. *Acta Botanica Indica*, 7(2), 147–150
- **Mohammedi Z. (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie
- **Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N. & Vahidipour, H.R., (2003).** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82

- **More D and White J., (2005).** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, 18-24.
- **Moulari B. L., Chaumont H., Guillaume J. P., Millet Y., Pellequer J., Yann (2006).** Potentiation of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (*Hypericaceae*) leaf extract against oral bacteria using poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: *in vitro* study. *Acta Odontologica Scandinavica*. 64(3): 153-158.
- **Musa A.E et Gasmelseed G.A (2012).** Characterization of *Lawsonia inermis* (Henna) as Vegetable Tanning Material. *Journal of forest products & Industries*, 2012, 1(2), 35-40.
- **Dedoussis GV, Kaliora AC, Psarras S, Chiou A, Mylona A, Papadopoulos NG, Andrikopoulos N K (2004).** Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174, 293-303.
- **Nabavi, Seyed Fazel; Ebrahimzadeh, Mohammad Ali; Nabavi, Seyed Mohammad; Mahmoudi, Mitra; Rad, Shabnam Keyvani (2011)** Biological activities of *Juglans regia* flowers *Rev. Bras. farmacogn*;21(3):465-470,
- **Nakhala, A.M., Zakin, N., Mahrous, T.S., Ghali, M.and Youssef, A.M.; (1980).** Isolation and identification of four aromatic compounds from henna leaves. *Chem. Microbial. Technol. Lebenson*, 6, 103-105.
- **NCCLS., (1999).** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline, (1999); M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.).
- **Nikoh N., Iwabe N., Kuma K.I., Miyata T. (1994).** Phylogenetic relationship of the kingdoms of Animalia, Plantae, and Fungi, inferred from 23 different protein species. *Mol Biol Evol*, 11 : 762-768.
- **NirmlaDevi T., Apraj V., Bhagwat A., Mallya R., Sawant L., Pandita N., (2011).** Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. bark *Pharmacognosy Journal*, Volume 3, Issue 25, September 2011, Pages 39-43
- **Ochocka R.J., Rajzer D., Kowalski ., Lamparczyk H (1995).** Determination of coumarins from determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis.
- **Ojala T., Rames S., Haansu P., Vuorela H., Hiltunen R., Hahtela K., Vuorela P., (2000).** Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in finland. *Journal of Enthopharmacology*, 73: 299-305.
- **Okamura H., Mimura A., Yakou Y., (1993).** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem*, 33, 557-561.

- **Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatanv T.,(1983).** Studies on the activities of tannins And Related coumpounds from medicinal plant and drugs. Inhibition effects of lipid peroxidation in mithchordria and microsomes of liver. Chem. pharm .Bull, 31:1625-1631.
- **Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira Isabel C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A., (2008).** Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L. green husks. Food and Chemical Toxicology 46 2326–2331.
- **Ong Kian C., Khoo Hoon-Eng., (1997).** Biological effects of myricetin. General Pharmacology: The Vascular System, 29(2), 121-126.
- **Orturno A., Baidez A., Gomey P., Arenas MC.,(2005).** Citrus perasidi and *Citrus sinensis flavonoids* : Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*.
- **Osato M.,(2009).** Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. Int. J. Antimicrob. Agents 2009, 17 (1): 39-44 ;
- **Ounis M., Zitouni A., (1996) .** Le noyer commun (*Juglans regia* L). Le connaître ...pour mieux le développer. Rev la forêt algérienne n°2. Ed.INRF Algérie .pp15-20.
- **Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M. I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M, A. Belablas M., A (2007).** Activités antifongique de l'acide oleique et des huiles essentielles de *thymus Saturejoides* L. et de *Mentha Pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. Phytothérapie ; Vol 1 ; pp 6-14.
- **Paolini V, A Frayssines, F De La Farge, F Dorchies, H Hoste. 2003.** Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. Vet Res 34, 1-9.
- **Papageorgiou V P, Bakola, Christianopoulou N M and Apazidou K K (1997).** Gas chromatographymass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. Journal of Chromatography, 729, 263-273.
- **Paraschos S, Magiatis P, Mitaku S, Petraki K, Kaliaropoulos A, Maragoudakis P, Mentis A, Sgouras and Skaltsounis (2007).** In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother, 51, 551-559.
- **Paris M.; Hurabielle M., (1981).** Abrégé de Matière médicale pharmacognosie. tomes 1, Masson M, Paris. P 339.
- **Paris R. R et Moyse. , (1965).** Précis de matière médicale Edition Paris : Masson.
- **Paris R.R. ; Moyse H., (1976),** Matière médicale. tome 1 Masson m, 2 ème édition,

Paris. P 419.

- **Paudel P., Satyal P., Dosoky NS., Maharjan S., Setzer WN., (2013).** Juglans regia and J. nigra, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and Biological activities. Nat Prod Commun. Oct;8(10):1481-6.
- **Paul José Teisseire., (1991).** Chimie de substances odorantes, ed Lavoisier, 1991
- **Pell, S.K., (2004).** Molecular systematics of the cashew family (*Anacardiaceae*). Thèse de Doctorat. St
- **Pelli K., Lyly M., (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. Finlande. 28p.
- **Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L. (2008)** Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Food Chem Toxicol ;46 (6):2103-2111.
- **Perrier F., Grillot R., Lebeau B., Galop J. (1988) :** Mycoses et antifongiques. Monit. Internat., 6 : 71-87.
- **Pharmacopée française (2010).** Xème éd (<http://www.afssaps.fr/Activites/Pharmacopee>).
- **Philippe M., (2013).** Les familles des plantes à fleurs d'Europe: Botanique systématique et utilitaire. Presses universitaires de Namur.
- **Porter L. J., Hirtstich L. N., Chang B. G., (1986).** The conversion of procyanidins and pro-delphinidins to cyanidins and delphinidins. Phytochemistry, 25 (1), 223-230.
- **Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Tomáš Filipický, Libuše Zatloukalová, Luděk Jahodář, Paolo Bovicelli, Ilaria Proietti Silvestri, Radomír Hrdina and Luciano Saso ,(2011).** In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. J Inorg Biochem, 105, 693–701.
- **Prichard A J N., (2004).** The use of essential oils to treat snoring. Phytotherapy Research, 18, 696-699.
- **Punyasiri PA, Abeysinghe SB, Kumar V.,(2005).** Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. J Chem Agri:31(6):1315-24
- **Rahmoun M.N., Benabdallah M., Villemin D., Boucherit K., Mostefa-Kara B., Ziani-Cherif C., Choukchou-Braham N., (2010).** Antimicrobial screening of the Algerian Lawsonia inermis (henna). Scholars Research Library. Der Pharma Chemica, 2010, 2(6): 320-326. review. Crit Rev Food Sci Nutr, 38(6), 421-64.
- **Riffel, A., Medina, L.F.C., Stefani, V., Bizani, D., Brandelli, A., (2002).** Antimicrobial activity of a new series of naphthoquinones. Braz. J. Med. Biol. Res. 35, 811–818.
- **Rios, J.L., M.C. Recio and A. Villar, (1988).** Screening methods for natural

- products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.*, 23: 127–49
- **Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., & Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13, 79–86. Rotterdam (Netherlands) : A. A. Balkema. 59 p.
 - **Sahpaz S (2013)** Composés aromatiques polyphénoliques laboratoire de pharmacogonose EA GRIOTT. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques Univ Lille 2.
 - **Scherrer, A.M., Motti, R. et Weckerle, C. S.,(2005)** Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy) *J. Ethnopharmacol.* 97: 129-143.
 - **Segretain G., Drouet E., Mariat F., (1987).** Diagnostic de Laboratoire en mycologie médicale, 5e éd. Paris : Maloine,.
 - **Serakta M, Djerrou Z, Mansour-Djaalab H, Kahlouche-Riachi F, Hamimed S, Trifa W, Belkhiri A, Edikra N, Hamdi Pacha Y. (2013)** Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: *Juglans regia*, *Lawsonia inermis* and *Salvia officinalis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, Vol 10, No 3 (2013).
 - **Sharma Ankita et Sharma Kanika (2013)** Efficacy of lawsonia inermis linn. and eucalyptus citriodora hook. essential oils and their combination as antifungal and antiaflatoxin agent. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research* 130-143.
 - **Siddiqui, B. S., Kardar, M. N., Ali, S. T. et Khan, S., (2003).** Two new and a known compound from *Lawsonia inermis*. *Helvetica Chimica Acta*, 86(6), 2164–2169.
 - **Smail-Saadoun, N., (2002).** Types stomatiques du genre *Pistacia*: *Pistacia atlantica* Desf.ssp. *Atlantica et Pistacia lentiscus* L. p369
 - **Srivastava S.K., Srivastava S. D., and Chouksei B.K. (2001).**New antifungal constituents from *Terminalia alata*. *Fitoterapia*, 72, 106-112.
 - **Stahl, E., (1969).**Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, 2nd. Edit New York 1041 pp., 244.
 - **Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii., Zlabinger g.I., Neychev H.,(2007).** Enhanced resistance to *Salmonella enteric sero var typhimurium* infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection.* 9: 7-14.

- **Seghiri R., (2008).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis* These Doctorat d'Etat en Chimie Organique Université Mentouri - Constantine. 248 P.

- **Stocker P, Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El-Boustani S and Moulin A., (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86: 919-925.

- **Tabuti J., Dhillion S.S., Lye K.A. (2003).** Ethnoveterinary medicines for cattles (*Bos indicus*), in Bulamogi county, Uganda: plant species and mode of use. *Journal of ethnopharmacology* , 88, pp. 279-286.

- **Taguchi G., Fujikawa S., Yazawa T., Kodaira R., Hayashida N., Shimosaka M., Okazaki M., Tahrouch S, Audary C, Rapior S, Moudolot L, Gargadenneca and Fruchner A., (2000).** Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot. Gallica*, 147(3), 225-232.

- **Tanaya, J.H.,(1997).** Effect of Natural of Synthetic phytosterol Administration on cholesterol Metabolism in Normolipidemic Humans, National Library of Canada.

- **Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan d., Kavanagh K., (2007).** Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, 21: 801-808.

- **Trabelsi Hajer, Olfa Aicha Cherif, Faouzi Sakouhi, Pierre Villeneuve, Justin Renaud, Nathalie Barouh, Sadok Boukhchina and Paul Mayer (2011).** Total lipid content, fatty acids and 4- desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*. Epub.

- **Traoré C.M. L., (1999).** Contribution à l'étude des *Combretaceae* médicinales du Mali. Thèse de pharmacie, Bamako, 99 p 38, 165 p.

- **Treki A.(2002).** Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales *Ranunculus repens* et *Thymus hirtus* sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies. Thèse de magistère de l'université de Constantine.

- **Treki A., Merghem R., Dehimat L., (2009).** Etude phytochimique et Evaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée : *Thymus hirtus*. *Sciences et Technologie C-N° 29* : 25-29.

- **Trigui M., Ben Hsouna A., Hammami I., Culioli G., Ksantini M., Tounsi S., Jaoua S., (2013).** Efficacy of *Lawsonia inermis* leaves extract and its phenolic compounds against olive knot and crown gall diseases. *Crop Protection*, Volume 45, March 2013, Pages 83-88 ;

- **Vanbreuseghem R., De vroey C., Ta kashio M., (1978).** Guide pratique de

Mycologie médicale et vétérinaire. Paris : Masson.

- **Vander Berghe .D.A-Vlietink.A.J.,(1991).** Serening Methods for antibacterial and antiviral agent From higher plants.Methods in plants biochgmistry vol 6pp 47-54.
- **Vanier P., (1999)** : Plantes médicinales.231p
- **Vavilov N.I., (1949).** The origin of cultivated plants. Edition Waltham, Mass.
- **Vaya J, Mahmood S., (2006).** Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (*Ficus carica L.*), Carob (*Ceratonia siliqua L.*) and Pistachio (*Pistacia lentiscus L.*), Biofactors.;28(3-4):169-75. PubMed PMID: 17473377
- **Villar A., Sanz M J., Payo M.,(1987).** Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus L.* Int J Crude Drug Res, 25, 1-3.
- **Wagner H., Ulrich-Merzenich G., (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceutical. Phytomedicine, 16, pp. 97-110.
- **Walker A.F., (2006).** Herbal medicine: the science of art. Proceedings of the nutrition society, 65, pp. 145-152.
- **Waller, G. R. and Nowacki, E. K., (1978).** Alkaloids Biology and Metabolism in plants. Plenum Press, New York, 294 p.
- **Wang L, Ma L, Leng W, Lui T, Yu L, Yang J, Zhang W, Zhang Q, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Wan Z, Ding G, Yu F, Tu K, Li Y, Li R, Shen Y, Jin Q. (2006).** Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed equence tags. Bio. Med Central Genomics ; Vol, 7 ; pp 255.
- **Wang Y., (2008).** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. Chem Res Toxicol 21, 276-281.
- **Wang YN, Shi GL, Zhao LL, Liu SQ, Yu TQ, Clarke SR, Sun JH. (2007)** Acaricidal activity of *Juglans regia* leaf extracts on *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). J Econ Entomol. Aug;100(4):1298-303.
- **Wyllie M.G.,(2006).** A groundswell for phytotherapy. BJU International, 97, pp. 1345-1346.
- **Yasilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y and Takalshi Y (1995).** Traditional medicine in Turkey. V: Folk medicine in the inner *Taurus Mountains*. J Ethnopharmacol, 46, 133-152.
- **Ziani-Cherif C and Choukchou-Braham N.(2010).** Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). Scholars Research Library Der Pharma Chemica, 2010, 2(6): 320-326. ISSN 0975-413.

- **Zihiri G. and Kra A., (2003).** Évaluation de l'activité antifongique *Microglossa Pirifilia* (LARMARCK) O. KUNTZE (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Rev. Med. Pharm. Afr*, 17, 2003, 11-19.

EVALUATION CHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIDERMATOPHYTE DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES D'ALGERIE

RESUME

L'utilisation des plantes ou de leurs extraits pourrait constituer une excellente alternative aux problèmes de résistance aux antifongiques. Dans l'optique de trouver des extraits de plantes à activité antidermatophytique, les feuilles de *Lawsonia inermis* L. et de *Pistacia lentiscus* L., ainsi que l'écorce de *Juglans regia* L., ont été macérées dans de l'éthanol. Les extraits hydroalcooliques obtenus ont été fractionnés successivement à l'éther de pétrole, à l'éther diéthylique, à l'acétate d'éthyle et au 1butanol. Les extraits et fractions des trois plantes ont été soumis au criblage phytochimique par des méthodes standards et qui a révélé leur richesse en flavonoïdes, en tannins, en stérols et terpénoïdes et en saponines.

L'analyse spectrale a mis en évidence des molécules de nature Flavonol, Flavone, Chalcone, Aurone ou Isoflavone présentes dans tous les extraits. Par les méthodes d'incorporation en milieu solide et de dilution en milieu liquide, l'évaluation du pouvoir antidermatophyte a été comparée avec celui de la Griseofulvine.

À la concentration de 35mg/ml les trois plantes LIN, PLE et JRE ont montré une activité antifongique vis à de toutes les souches sélectionnées.

L'extrait hydroalcoolique de *Lawsonia inermis* L. a été le plus actif ($P < 0.01$) avec un diamètre d'inhibition de $18,87 \pm 0,58$ mm et une CMI = 0,034 mg/ml pour *Candida albicans*.

L'extrait de *Pistacia lentiscus* L. a été le plus actif pour *Trichophyton mentagrophyte* ($P < 0.01$) en induisant un diamètre d'inhibition de $17 \pm 1,00$ mm et une CMI = 0,068 mg/ml ; De même, pour *Microsporum canis* ($P < 0.01$) avec une zone d'inhibition de $16,67 \pm 0,58$ mm.

L'extrait de *Juglans regia* L. a développé une importante activité antifongique sur *Candida albicans* par rapport aux autres souches testées.

L'effet antifongique des trois extraits sur la souche *Trichophyton rubrum* a été significativement comparable ($P < 0.01$).

Le fractionnement réalisé par épuisement successif avec des solvants organiques à polarité croissante n'a pas amélioré l'activité antidermatophytique. Seule *Candida albicans* a été sensible aux extraits des phases testées.

Les résultats de cette étude justifient l'usage traditionnel des extraits de LIN, JRE et PLE dans le traitement des dermatoses et candidoses. Ces plantes méritent donc d'être protégées et valorisées.

Mots clés : *Lawsonia inermis* L.; *Pistacia lentiscus* L.; *Juglans regia* L.; activité antifongique; CMI.

CHEMICAL EVALUATION AND ANTIDERMATOPHYTE ACTIVITY OF SOME ALGERIAN MEDICINAL PLANTS

SUMMARY

The use of plants or their extracts could be an excellent alternative to the problem of resistance to antifungals. In view to find plant extracts with antidermatophytic activity, leaves of *Lawsonia inermis* L., *Pistacia lentiscus* L. and bark of *Juglans regia* L., were soaked in ethanol. The hydroalcoholic extracts were fractionated successively with petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate and 1butanol. Extracts and fractions of the three plants were subjected to phytochemical screening, by standard method, which has revealed their rich in flavonoids, tannins, sterols, terpenoids and saponins.

Spectral analysis has shown molecules of nature: Flavonol, Flavone, Chalcone, Aurone or Isoflavone present in all the extracts. By methods of incorporation in solid medium and broth dilution, the evaluation of antidermatophyte activity was compared with that of Griseofulvin. At a concentration of 35mg/ml, the three plants LIN, JRE and PLE have shown antifungal activity against all of the selected strains.

The hydroalcoholic extract of *Lawsonia inermis* L. was the most active ($P < 0.01$) with an inhibition diameter of 18.87 ± 0.58 mm and a MIC = 0.034 mg / ml for *Candida albicans*. The extract of *Pistacia lentiscus* L. was the most active on *Trichophyton mentagrophyte* ($P < 0.01$) by inducing an inhibition diameter of 17 ± 1.00 mm and a MIC = 0.068 mg / ml; Similarly, for *Microsporum canis* ($P < 0.01$) with an inhibition zone of 16.67 ± 0.58 mm. The extract of *Juglans regia* L. has developed a significant antifungal activity on *Candida albicans* compared to other tested strains.

The antifungal effect of the three extracts on the *Trichophyton rubrum* strain has been significantly comparable ($P < 0.01$).

Fractionation produced by FIFO with organic solvents of increasing polarity has not improved antidermatophytic activity. Only *Candida albicans* was sensitive to tested phases of the extracts. The results of this study justify the traditional use of the extracts of LIN, JRE and PLE in the treatment of dermatoses and candidiasis. So these plants should be protected and valued.

Keywords: *Lawsonia inermis* L.; *Pistacia lentiscus* L.; *Juglans regia* L.; antifungal activity, CMI.

نتائج ليل الكويماي ولنش اطال مضاد لقطري انتبعض لبنات البطية لجلووية

ملخص

إن استخدام المضادات أو من خصها أي لمن أن يكون بيلا مطبازا المشكلة مقاومة ضدات لقطريات. وفي إطار البحث عن مضاد لخصات نسوية ذات نشاط ضد اللفطريات، قضايق أوراق الخاء ونبات الضررو وكلكلحاء لجوزاللمكيفي اليتلول. وتلم فصل لتقربي لمستخصات اللمية الكحولي اقدم حصل غي هفي يثلباترول ، يثلوي اليتل ، الت اليتل و1 بيتلنول . هذه لمستخصات و الأجزاء للمستتالت، تم إخضاعها للتجليل اللبيطي للمطرق قيسية، و اللخيشفت غي هذه لمستخصات لطفلافونيد و الثرين و لسيرولات و لكايينيدات وكلك للصبرين.

أظهر التجليل اللبيطي جزئيات من بطيعة لطفلافونول ، فلافون ، كالكون ، أورون أو أليزو افون و لاموج و هفي جي غلامستخصات . وقتت مقارنات نشاط ضد اللفطريات لمستخصات مع دواء اللغريبي هفيين وكان لك عن طيق وسطل للتيس في وسط صلب و اللخيفي وسط وسطل . في تركيز 53 مغ / مل ، أظهرت للمستتالت نشاط ضد ذلك من ال الت لمتجربة . وكان لمستخصات اللخول يلفات الخاء الأثر نشاط ($P < 1$...) (م ع ق ط ر نتشي ط $18.81 \pm$ 38 . لهم و $MIC = 0.034$ له غ / مل ضد اللة ك ل ي دا لليكنز . و أمامت لخصات للضررو فك ان الأثر نشاط ضد لاش عروية للقناية) $P < 1$...) (و مذلق ط ر نتشي ط $11 \pm$ 1 ... لهم و $MIC = 0.068$ له غ / مل ؛ وكلك ضد يكر و و روم اللبية) $P < 1$...) (م ع من ط ق نتشي ط $16.61 \pm$ 3 8 ... لهم .

و أمامت لخص لاجوز اللبيطي ق دأبدى نشاطها ال ضد اللة ك ل ي دا لليكنز للمقارنة مع السلالات الأخرى التي يتم اعتبارها . وقد كان لتأثير لمستخصات اللثة ماثال غي اللة لاش عروية للقناية . ولمتجه من النشاط ضد اللفطريات عملية تجيئة لمستخصات بالستينزاف اللخيفي في للمفات اللعوي بقطي متزايدة . وكلك اللة ك ل ي دا لليكنز للتمسرة للوجيدة لأجزاء لمستخصات المتجربة . إن نتيج هذه للدراس قترر اللست للمقل يدي لمستخصات نسبات الخاء و للضررو وكلك لاجوز اللبيطي في عالج لكاهب اللجد و اللحيضات . وتستحق لك هذه للمستخصصات اللبية و اللقوييم .

الكلمات المفتاحية : أوراق الخاء ، نبات الضررو ، لاجوز اللبيطي الك نشاط ضد اللفطريات ، CMI .