

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

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé

THESE DE DOCTORAT LMD

EN BIOLOGIE

Spécialité : Biologie et Santé

CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DU
POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE *Juglans regia*

Par :

DJAIRENE Nassima

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur USDB-1	Présidente
D. CHABANE	Professeur USTHB	Examinatrice
N. SAADOUN	Professeur UMMTO	Examinatrice
H.S. CHERIF	MCA USDB-1	Directrice de thèse
F. HAMAI-DI-CHERGUI	Professeur USDB-1	Co-directrice de thèse

Blida, 2022

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de *Juglans regia* L., plante médicinale largement répandue en Algérie. La valorisation de ses métabolites secondaires offre de nouvelles perspectives dans les industries pharmaceutiques.

Le screening phytochimique et l'empreinte chromatographique par HPLC ont dévoilé une présence remarquable de composés phénoliques dans les deux extraits éthanoliques (Feuilles / écorces).

L'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. incorporé comme principe actif antimicrobien dans la formulation de la solution antiseptique 2%, a révélé une grande action inhibitrice (>30 mm) sur la croissance des germes pathogènes incriminés dans les infections ostéoarticulaires sur matériel (IOAM) .

La crème dermique 2% formulée à base d'extrait éthanolique des feuilles de *J.regia* L. a démontré une excellente tolérance cutanée avec une absence totale d'irritation dermique, possédant ainsi *in vitro* d'intéressantes propriétés antifongiques contre les affections dermatologiques superficielles, avec des pourcentages d'inhibition très importants dépassant les 50%.

La pâte dentifrice et le bain de bouche formulés à base de Siwak de *J.regia* L. ont montré un potentiel anticariogène sur la croissance des germes pathogènes des infections bucco-dentaires, avec des zones d'inhibition très importantes qui varient entre 18mm et 60mm.

L'effet *in vitro* de la solution d'irrigation formulée à base d'extrait éthanolique de Siwak de *J.regia* L. a donné une bonne éradication du biofilm de *Entérocooccus faecalis*, l'agent étiologique responsable de l'échec du traitement endodontique.

L'étude de la toxicité des deux extraits éthanoliques incorporés dans les différentes formulations pharmaceutiques n'ont pas décelé un effet toxique sur l'ensemble de modèle cellulaire même à fortes concentrations, avec un taux de viabilité qui dépasse 76%.

Mots clés : *Juglans regia* L., Infections ostéoarticulaires, solution antiseptique 2%, affections dermatologiques, anticariogène, toxicité.

ABSTRACT

The present work deals with the study of *Juglans regia* L., a medicinal plant widely used in Algeria. The valorization of its secondary metabolites offers new perspectives in the pharmaceutical industries.

Phytochemical screening HPLC chromatographic revealed a remarkable presence of phenolic compounds in the two ethanolic extracts (leaves / barks).

The ethanolic extract of the leaves of *Juglans regia* L. incorporated as an antimicrobial active principle in the formulation of the 2% antiseptic solution, revealed a great inhibitory action (>30 mm) on the growth of pathogenic germs incriminated in osteoarticular infections on material (OAMI).

The 2% dermal cream formulated based on ethanolic extract of the leaves of *J. regia* L. has demonstrated excellent skin tolerance with a total absence of dermal irritation, thus possessing *in vitro* interesting antifungal properties against superficial dermatological affections, with very high inhibition percentages exceeding 50%.

Toothpaste and mouthwash formulated with Siwak from *J. regia* L. have established an anticariogenic potential on the growth of pathogenic germs of oral infections, with very important inhibition zones that vary between 18mm and 60mm.

The *in vitro* effect of the irrigation solution formulated with the ethanolic extract of Siwak of *J. regia* L. showed a good eradication of the biofilm of *Enterococcus faecalis*, the etiological agent responsible for the failure of endodontic treatment.

The study of the toxicity of the two ethanolic extracts incorporated in the different pharmaceutical formulations did not detect a toxic effect overall cell model even at high concentrations, with a viability rate exceeding 76%.

Keywords: *Juglans regia* L., osteoarticular infections, 2% antiseptic solution, dermatological diseases, anticarigene, toxicity.

ملخص

يرتكز هذا العمل على دراسة نبات *Juglans regia* L. ، وهو نبات طبي منتشر على نطاق واسع في الجزائر. ان تثمين المركبات الثانوية تقدم افاق جديدة في الصناعات الدوائية.

كشف الفحص الكيميائي النباتي والبصمة الكروماتوجرافية بواسطة HPLC عن وجود تركيزات ملحوظة من المركبات الفينولية في المستخلصين الإيثانوليين (الأوراق / اللحاء).

كشف المستخلص الإيثانولي لأوراق *Juglans regia* L. الذي تم تضمينه كمبدأ نشط مضاد للميكروبات في صياغة محلول مطهر 2 %، عن تأثير مثبت كبير على نمو الجراثيم المسببة للأمراض (>30 مم) التي تسبب العدوى العظمية المفصلية على المادة (IOAM).

أظهر الكريم الجلدي 2% المصنوع من المستخلص الإيثانولي لأوراق *Juglans regia* L. تحملاً ممتازاً للجلد مع غياب تام لتهيج الجلد، وبالتالي يمتلك خصائص مضادة للفطريات مخبرياً ضد الأمراض الجلدية السطحية بنسبة تفوق %50

لقد أثبت معجون الأسنان وغسول الفم المصنوع من السواك *J.regia* L. إمكانات مضادة للبكتيريا على نمو الجراثيم المسببة للأمراض الناتجة عن التهابات الفم (18مم و 60 مم)

أظهر التأثير المختبري لمحلول لعلاج اللبي المصنوع من المستخلص الإيثانولي للسواك من *J.regia* L. القضاء الجيد على الأغشية الحيوية البيوفيلمية لـ *Enterococcus. faecalis* ، العامل المسبب للمرض المسؤول عن فشل المعالجة اللبية.

لم تكشف الدراسة السمية للمستخلصين الإيثانوليين المتضمنين في المستحضرات الصيدلانية المختلفة عن تأثير سام على نموذج الخلية بأكملها حتى عند التركيزات العالية ونسبة الخلايا الحية تفوق 76 بالمئة.

الكلمات المفتاحية : *Juglans regia* L. ، الالتهابات العظمية المفصلية ، محلول مطهر 2 % ، الأمراض الجلدية ، مضاد للتسوس ، سمية .

Remerciements

Avant tout je remercie "Allah" tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Je tiens à exprimer ma sincère gratitude et ma reconnaissance à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma bonne formation et à leur encadrement agréable, en l'occurrence Dr **Cherif H. S**, maitre de conférences classe "A", qui a eu l'amabilité de m'encadrer ; sans ses orientations, ses conseils judicieux et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de mon travail, cette thèse n'aurait pas vue le jour. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait bénéficier de votre expérience ainsi que de votre enthousiasme pour la recherche ; je vous exprime mes respectueux sentiments.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Pr **Hamaidi – Chergui F**, professeur à l'université de Blida -1-, faculté des sciences de la nature et de la vie, de m'avoir orienté et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa grande compétence et sa disponibilité continue. Malgré toutes ses journées surchargées, elle trouvait toujours un moment pour discuter ce projet. Elle a su me faire partager ses nombreuses connaissances, sa vision toujours claire et synthétique. Ma sincère gratitude et un grand respect vous sont personnellement adressés, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir beaucoup appris.*

*Je souhaite exprimer mes sincères et profonds remerciements à Pr **Saidi F**, directrice du laboratoire de recherche de Biotechnologie, Environnement et Santé et responsable de la formation doctorale à l'université de Blida 1, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.*

*Je remercie vivement les membres examinateurs pour avoir accepté d'évaluer ce travail : Pr **Chabane D**, professeur à l'université des Sciences Technologiques Houari Boumediene, d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance et ma haute considération.*

*Pr **Saadoun N**, professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Je suis profondément reconnaissante de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier vivement **Dr Azrou S**, pour m'avoir permis de réaliser la majeure partie expérimentale des analyses microbiologiques au laboratoire central, CHU Frantz fanon, Blida, pour m'avoir conseillé et guidé avec bienveillance. Je remercie chaleureusement tous les membres des unités de bactériologie, de mycologie et parasitologie médicale, d'hémobiologie et de Biochimie, CHU Frantz fanon, Blida, pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail.*

*Je remercie sincèrement **Dr Brahimi M**, maître-assistant à l'Université de Relizane, qui a su me faire profiter de ses nombreuses connaissances scientifiques.*

*Je tiens également à remercier profondément Pr **Abdi S**, directrice du laboratoire central, CHU Frantz fanon, Blida.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur **Moula M**, responsable du laboratoire de recherche et de développement Vague de Fraîcheur, Blida, pour sa gentillesse, son aide, pour m'avoir permis d'effectuer les formulations pharmaceutiques. Sans oublier de remercier l'ingénieure madame **Kasmi H**, pour son aimable accueil.*

Je remercie également :

Tous les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

Le staff hospitalier, médecins et infirmier(e)s qui ont contribué à la réalisation de cette étude. Je pense plus particulièrement à :

*Monsieur, le professeur **Hamidani M**, chef de service de la chirurgie orthopédique et traumatologie et à tous les membres de son équipe médecins et infirmier (e)s pour leur grande disponibilité, CHU Frantz Fanon, Blida.*

*Docteur **Razkellah L**, médecin spécialiste en mycologie et parasitologie médicale,*

*Docteur **Benamara M**, pharmacienne spécialiste en microbiologie médicale,*

*Docteur **Touaibia M**, maître de conférences classe A à l'université de Blida 1,*

*Docteur **Aouam N**, maître assistante en hémobiologie, CHU Frantz fanon, Blida,*

*Docteur **Letaief M R**, Chirurgien-dentiste pour son aimable accueil,*

*Un grand merci est adressé à Monsieur **Tekarri Ali Seghir**.*

Dédicaces

À mes très chers parents,

Aux deux êtres qui m'ont prodigué tant d'amour, d'affection et de bonheur, qui ont fait tant de sacrifice pour mon éducation, mes études et mon bien être, qui m'ont comblé par leur soutien et leur générosité durant toute mon existence et qui continuent toujours à m'entourer de leur ample affection.

Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mes sentiments profonds d'amour, de respect et de reconnaissance que je porte pour vous.

Sans vos prières, votre soutien, votre dévouement et vos conseils précieux, je n'aurais pu surmonter le stress de ces longues années d'étude.

Vous êtes pour moi l'exemple de droiture, de patience et de persévérance.

Seul Dieu tout puissant pourra vous récompenser. Mon plus vif espoir est de vous voir à mes côtés le plus longtemps possible.

Que ce modeste travail puisse être le résultat de vos efforts, de vos sacrifices et un début de mes récompenses envers vous.

Puisse Dieu vous protéger et vous accorder une bonne santé et une longue vie.

À ma sœur Khadidja,

Pour ton soutien indéfectible car je sais pertinemment que je peux toujours compter sur toi, car tu m'as prêté main forte durant la réalisation de ce projet.

À mes chers collègues,

Dr. Lydia, Amina, Yousra, Dr. Ikram, Aicha, Meriem, Mélissa, Maroua, Dr. Amel, Dr. Ilhem, Dr. Faiza, Sabah, Dr. Assia, Yakout, Dr. Nadia, Nassima, Samira, Manel, Dr. Kenza, Dounia, Fadéla, Amou Djamel, madame Amel, madame Lila, Mr. Sofiane, Mr. Soudet, Mr. Marmouz, Mr. Boumidouna, Mr. Djellata, Mr. El arbi, Mr. Kherbache.

À toute ma promotion de doctorat en Biologie et Santé

Pour notre amitié d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Au souvenir des bons moments passés ensemble.

Je vous dédie ce travail en témoignage des souvenirs inoubliables.

Dr Nassima.

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....16

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation de l'espèce *Juglans regia* L.19

1.1.1. Classification du genre *Juglans*.....19

1.1.2. Description botanique de *Juglans regia* L.19

1.1.3. Origine et répartition géographique21

1.1.4. Profil phytochimique et principes actifs21

1.1.5. Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques.....25

1.2. Microorganismes et pathologies infectieuses étudiées.....27

1.2.1. Infections d'origine bactérienne.....27

1.2.2. Infections d'origine fongique.....28

1.2.3. Infections ostéo-articulaires sur matériel en chirurgie orthopédique.....28

1.2.4. Mycoses superficielles : Onychopathies à dermatophytes et à *Candida* ...31

1.2.5. Infections bucco-dentaires.....33

1.3. Mécanismes d'action des molécules bioactives.....34

1.3.1. Activité antibactérienne.....34

1.3.2. Activité antifongique.....35

1.3.3. Hémato-toxicité.....36

1.3.4. Activité antioxydante.....36

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Lieux des expérimentations.....38

2.2. Matériel biologique.....38

2.2.1. Matériel végétal.....38

2.2.2. Souches microbiennes.....39

2.2.3. Populations malades étudiées et prélèvements.....	39
2.2.3.1. Etude clinique des malades en chirurgie orthopédique et traumatologie..	39
2.2.3.2. Etude clinique des malades atteints d'une dermatomycose superficielle..	40
2.2.3.3. Etude clinique des malades atteints des infections dentaires.....	41
2.2.3.4. Etude de la cytotoxicité et la viabilité cellulaire.....	41
2.2.3.5. Etude de la tolérance et l'innocuité cutanée de la crème dermique formulée.....	41
2.3. Matériel non biologique.....	41
2.4. Méthodes.....	42
2.4.1. Préparation des extraits.....	42
2.4.2. Cinétique d'extraction et rendement.....	43
2.4.3. Calcul du rendement.....	44
2.4.4. Screening phytochimique	44
2.4.5. Analyse chromatographique des extraits par HPLC.....	45
2.4.6. Screening pharmacologique	46
2.4.6.1. Elaboration de la solution antiseptique 2%.....	46
2.4.6.1.1. Etude clinique.....	48
2.4.6.1.2. Activité antimicrobienne.....	51
2.4.6.2. Elaboration d'une crème dermique antifongique 2%.....	54
2.4.6.2.1. Etude clinique.....	57
2.4.6.2.2. Activité antidermatophyte.....	59
2.4.6.2.3. Activité anticandidosique.....	60
2.4.6.3. Elaboration d'une pâte dentifrice, bain de bouche et solution d'irrigation.	60
2.4.6.3.1. Activité anticariogène.....	65
2.4.6.4. Innocuité cutanée de la crème dermique antifongique 2%.....	71
2.4.6.5. Cytotoxicité érythrocytaire (myéloïde) <i>in cellulo</i>	73
2.4.6.6. Cytotoxicité lymphoïde <i>in cellulo</i>	78
2.4.6.7. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	77
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1. Rendement d'extraction.....	79
3.2. Résultats de l'étude phytochimique.....	80

3.2.1. Screening phytochimique.....	80
3.2.2. Caractérisation des composés phénoliques par HPLC.....	82
3.3. Résultats du Screening pharmacologique.....	86
3.3.1. Etude analytique de la solution antiseptique 2%.....	86
3.3.1.1. Contrôle de qualité de la solution antiseptique 2%.....	86
3.3.2. Résultats de l'étude préclinique et clinique des infections IOA.....	87
3.3.2.1. Résultats de l'enquête préclinique.....	87
3.3.2.2. Résultats de l'étude clinique.....	87
3.3.2.3 Résultats de l'activité antibactérienne.....	87
3.3.2.4. Résultats de l'antibiofilmogramme de la SA2%.....	91
3.3.3. Etude analytique de la crème dermique antifongique 2%.....	95
3.3.3.1 Contrôle de qualité de la crème dermique antifongique 2 %.....	95
3.3.3.2. Résultats de l'activité antidermatophyte.....	96
3.3.3.3. Résultats de l'antifongigramme de la crème dermique 2%.....	99
3.3.3.4 Résultats de l'activité anticandidosique.....	103
3.3.3.5. Résultats de l'antifongigramme de la solution antiseptique 2%.....	104
3.3.4. Etude analytique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation.....	107
3.3.4.1. Contrôle de qualité de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la SI....	108
3.3.4.2. Résultats du potentiel anticariogène en stomato- parodontologie.....	108
3.3.4.3. Résultats du traitement endodontique.....	111
3.3.5. Résultats de l'innocuité cutanée de la crème dermique antifongique 2%..	114
3.3.6. Résultats de la cytotoxicité érythrocytaire (myéloïde) <i>in cellulo</i>	116
3.3.7. Résultats de la cytotoxicité lymphoïde <i>in cellulo</i>	117
3.3.8. Résultats de l'activité antioxydante.....	119
CONCLUSION.....	121
APPENDICES	
REFERENCES	

Liste des figures

Figure 1.1.	<i>Juglans regia</i>	19
Figure 1.2.	Acides gras insaturés présents dans les fruits de <i>Juglans regia</i> L.	22
Figure 1.3.	Flavonoïdes, Juglone et acides organiques présents dans les feuilles de <i>Juglans regia</i> L.....	23
Figure 1.4.	Composition en l'huile essentielle des feuilles de <i>Juglans regia</i> L.....	24
Figure 1.5.	Structures chimiques des composés phénoliques des écorces de noix identifiés par RMN.....	25
Figure 1.6.	Différentes classes des microorganismes.....	27
Figure 1.7.	Articulations synoviales.....	28
Figure 1.8.	Différents types d'articulations synoviales.....	29
Figure 1.9.	Parodontite apicale.....	34
Figure 1.10.	Mécanisme d'action antimicrobien.....	36
Figure 1.11.	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaire.....	37
Figure 2.1.	Différents types de matériel utilisés en chirurgie orthopédique.....	39
Figure 2.2.	Onychomycose à dermatophytes.....	40
Figure 2.3.	Synoptique de la démarche appliquée.....	42
Figure 2.4.	Procédé d'extraction.....	43
Figure 2.5.	Différents types de prélèvement de pus orthopédique.....	49
Figure 2.6.	Identification par système API ^{20E}	50
Figure 2.7.	Technique de microdilution en milieu liquide.....	52
Figure 2.8.	Prélèvement mycologique.....	57
Figure 2.9.	Formulation de la pâte dentifrice à base d'extrait de Siwak.....	64

Figure 2.10. Formulation bain de bouche.....	64
Figure 2.11. Test de l'échiquier de microdilution.....	69
Figure 2.12. Traitement par les solutions d'irrigation.....	71
Figure 2.13. Application cutanée de la crème dermique antifongique 2%	72
Figure 2.14. Préparation des mélanges réactionnels avec la solution érythrocytaire.....	74
Figure 2.15. Echantillons des liquides de ponction.....	76
Figure 2.16. Test de viabilité cellulaire.....	76
Figure 3.1. Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Juglans regia</i> L. visualisé à 254nm.....	84
Figure 3.2. Chromatogramme de l'extrait éthanolique des écorces de <i>Juglans regia</i> L. visualisé à 254nm.....	85
Figure 3.3. Activité antibactérienne de la solution antiseptique 2%.....	88
Figure 3.4. Production de biofilm staphylococcique par la technique de tissu en plaque TCP.....	92
Figure 3.5. Antibiogramme <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline (MRSA).....	93
Figure 3.6. Observation microscopique des filaments mycéliens x100.....	96
Figure 3.7. Aspect microscopique de l'espèce <i>T.rubrum</i> x40.....	97
Figure 3.8. Aspect microscopique de l'espèce <i>T.mentagrophytes</i> x40.....	97
Figure 3.9. Aspect microscopique de l'espèce <i>M.canis</i> x40.....	98
Figure 3.10. Activité antifongique de la crème dermique antifongique 2% contre <i>Microsporium canis</i>	100
Figure 3.11. Résultats de l'activité antidermatophyte de la solution antiseptique 2%.....	101
Figure 3.12. Aspect microscopique de l'espèce <i>Candida albicans</i> x40.....	103

Figure 3.13. Activité anticandidosique de la solution antiseptique 2 % contre les souches <i>Candida albicans</i> comparée aux traitements antifongiques.....	105
Figure 3.14. Sensibilité des germes oraux contre la pâte dentifrice.....	109
Figure 3.15. Réduction du Log UFC d' <i>E. faecalis</i> ATCC29212 par les solutions d'irrigations.....	116
Figure 3.16. Résultats du Patch test.....	118
Figure 3.17. Toxicité érythrocytaire sous microscope x100.....	119
Figure 3.18. Morphologie des neutrophiles observés sous microscope photonique au grossissement x 40.....	121
Figure 3.19. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide céphalo-rachidien.....	121
Figure 3.20. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide d'ascite.....	122
Figure 3.21. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide articulaire.....	122
Figure 3.22. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Juglans regia</i> L.....	123
Figure 3.23. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des écorces de jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	124
Figure 3.24. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine C.....	124

Liste des tableaux

Tableau 1.1.	Propriétés pharmacologiques et biologiques de <i>Juglans regia</i> L.....	25
Tableau 1.2.	Classification des infections péri-implantaires en infections précoces et tardives.....	31
Tableau 2.1.	Gradient d'élution.....	45
Tableau 2.2.	Composition de la solution antiseptique 2 % pour 25 ml.....	46
Tableau 2.3.	Disques d'antibiotiques testés.....	54
Tableau 2.4.	Composition de la crème dermique antifongique 2%.....	55
Tableau 2.5.	Composition de la pâte dentifrice formulée à base d'extrait de Siwak..	63
Tableau 2.6.	Composition de bain de bouche à base d'extrait de Siwak.....	65
Tableau 3.1.	Aspect, couleur et rendement des extraits éthanoliques de <i>Juglans regia</i> (L.).....	79
Tableau 3.2.	Criblage par réactions chimiques.....	80
Tableau 3.3.	Identification des composés phénoliques de l'extrait des feuilles.....	82
Tableau 3.4.	Identification des composés phénoliques de l'extrait des écorces.....	83
Tableau 3.5.	Appréciation organoleptique et chimique de la solution antiseptique 2%.....	86
Tableau 3.6.	Qualité microbiologique de la solution antiseptique 2%.....	86
Tableau 3.7.	Résistance et sensibilité des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> ...	89
Tableau 3.8.	Résistance et sensibilité des <i>SARM</i>	90
Tableau 3.9.	Résistance et sensibilité des <i>MRSCN</i>	90
Tableau 3.10.	Résistance et sensibilité de <i>Morganella morganii</i>	91
Tableau 3.11.	Criblage des concentrations minimales inhibitrices de biofilm.....	92
Tableau 3.12.	Effet de sensibilité des <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques....	93

Tableau 3.13. Appréciation organoleptique et chimique de la crème dermique antifongique 2%.....	95
Tableau 3.14. Qualité microbiologique de la crème dermique antifongique 2 %.....	95
Tableau 3.15. Espèces isolées et origine de leur infection.....	99
Tableau 3.16. Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de la crème dermique antifongique 2%.....	99
Tableau 3.17. Valeurs des diamètres des colonies et le % d'inhibition de la solution antiseptique 2%.....	100
Tableau 3.18. Espèces candidosiques isolées et origine de leurs infections.....	103
Tableau 3.19. Diamètre des zones d'inhibition des souches <i>Candida</i>	104
Tableau 3.20. Concentration minimale inhibitrice et profil fongicide ou fongistatique des souches <i>Candida</i>	106
Tableau 3.21. Appréciation organoleptique et chimique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation.....	108
Tableau 3.22. Qualité microbiologique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation.....	108
Tableau 3.23. Diamètre des zones d'inhibition des germes oraux.....	109
Tableau 3.24. Effet inhibiteur exprimé par les concentrations minimales inhibitrices (CMI en % v/v).....	115
Tableau 3.25. Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICFI).....	115
Tableau 3.26. Réactions cutanées après application de la crème antifongique 2% (Patch test).....	117

Introduction

Au cours des dernières années, et en raison du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médico-chirurgicales invasives, les infections microbiennes restent des complications graves dont la fréquence est toujours en augmentation [1]. D'un autre côté, l'usage étendu des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la santé humaine conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes, d'où l'intérêt d'orienter les recherches vers de nouvelles voies plus saines en exploitant des ressources naturelles inépuisables à activités pharmacologiques plus puissantes, qui sont considérées comme une source d'inspiration de nouveaux médicaments [2][3][4].

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés thérapeutiques à mettre en valeur. [5]. *Juglans regia* est une espèce botanique médicinale de la famille des Juglandacées avec plusieurs vertus. C'est une espèce de lumière, exigeant une exposition importante au soleil pour bien se développer [13].

Au cours des dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin. Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique exposent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent perpétuellement une source extrêmement précieuse pour la production de nouveaux concepts chimiques [6]. En effet, la recherche scientifique a tendance à se focaliser sur l'exploration des substances qui constituent une alternative prometteuse aux anciennes substances d'origine synthétique. Face à cette situation inquiétante, d'énormes efforts sont autorisés dans le domaine de la recherche médicale en vue de trouver de nouvelles molécules naturelles actives efficaces et non toxiques [7].

Avec la rénovation de la recherche scientifique, de nouveaux principes actifs à nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des plantes aromatiques et médicinales d'authentiques médicaments. Leurs nombreuses actions biologiques peuvent traiter de nombreuses affections pathologiques [8].

Des investigations biologiques et pharmacologiques sur *Juglans regia* ont été rapportées par différents chercheurs révélant plusieurs activités à savoir :

antibactérienne [9][10][11], antifongique [12][13][14], anticancéreuse [15], neuroprotectrice [16], antioxydante [17], hépatoprotectrice [18] et autres.

Afin de bien situer le contexte dans lequel ce travail de recherche s'inscrit, nous avons visé en premier lieu l'identification essentiellement des composés bioactifs composant l'espèce *Juglans regia* L. retrouvée en abondance en Algérie et en second lieu d'étudier leur potentiel au maintien de l'hygiène et la santé humaine à travers des tests *in vitro*, de leurs effets antimicrobiens vis-à-vis de certains germes impliqués dans diverses maladies. Les travaux de cette thèse font partie d'un projet de recherche du laboratoire des biotechnologies, environnement et santé, université de Blida 1.

Le manuscrit est scindé en trois parties essentielles. Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique, retraçant dans la première partie la bibliographie de l'espèce *Juglans regia* L. ainsi que sa grande richesse en principaux composés bioactifs, et en deuxième partie l'éthologie microbienne de quelques pathologies pouvant toucher l'Homme : les infections oséoarticulaires sur matériel en chirurgie orthopédique et traumatologie, les dermatomycoses et les infections buccodentaires.

Le deuxième chapitre est consacré à la méthodologie appliquée :

- ✚ Une étude phytochimique comportant le dosage et l'identification de certains métabolites secondaires.
- ✚ La formulation des produits pharmaceutiques (une solution antiseptique, une crème dermique antifongique, une pâte dentifrice, un bain de bouche et une solution d'irrigation) à base des extraits éthanoliques de *Juglans regia* L.
- ✚ Le contrôle physico-chimique et microbiologique de ces formulations. Ces produits ont été testés comme moyen thérapeutique naturel.
- ✚ Evaluation des tests biologiques et pharmacologiques basés sur plusieurs techniques :
 - ❖ Tests de mise en évidence de l'effet antimicrobien et le pouvoir antioxydant,
 - ❖ Evaluation de la solution d'irrigation dans le traitement endodontique,
 - ❖ Etude de la tolérance cutanée de la crème dermique,
 - ❖ Evaluation de la cytotoxicité *in cellulo*.

Le troisième chapitre comprend les résultats et la discussion relatifs aux différents tests pratiqués. Le manuscrit s'achève par une conclusion générale basée

sur une lecture attentive des principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives de recherche à approfondir dans le cadre de la présente étude.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation de l'espèce *Juglans regia* L.

Le genre *Juglans* appartient à la famille des Juglandacées, cette famille regroupe quatre genre : *Juglans*, *Carya*, *Pterocarya*, *Platycarya*, et vingt-quatre espèces dont quinze sont originaires du continent Américain. D'après **Vanier [19]**, *Juglans* vient de Jovisglans qui signifie « gland de Jupiter ».

1.1.1. Classification du genre *Juglans*

La classification phylogénétique retenue est celle de l'**APG III [20]**.

Règne : Archéplastides
 Clade : Angiospermes
 Clade : Dicotylédones vraies
 Clade : Noyau des Dicotylédones vraies
 Clade : Rosidées
 Clade : Fabidées
 Ordre : Fagales
 Famille : Juglandacées
 Genre : *Juglans*
 Espèce : *Juglans regia* L.

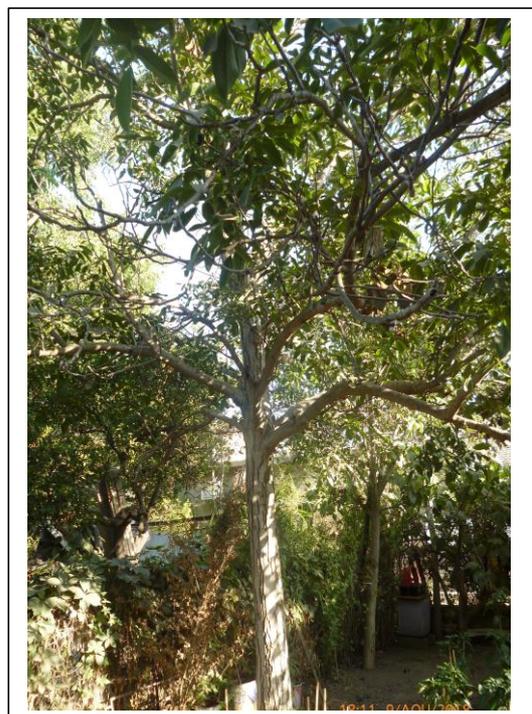


Figure 1.1 : *Juglans regia*(originale,2018)

1.1.2. Description botanique de *Juglans regia* L.

○ Nomenclature

Etymologiquement, l'existence du nom *Juglans* dans différentes cultures lui confère plusieurs noms vernaculaires :

- ❖ **En Français** : Noyer royal ; Gogulier, Calottier et Eclonnier [21], arbre au sommeil,gland de jupiter , gland divin [22] ;

- ❖ **En Arabe** : El Jouza ou souak الكركاع - الفجرم - السواك - الجوزة [22][23] ;
- ❖ **En Berbère** : Tadjoudjte تسويك [22] ;
- ❖ **En Hindou** : le noyer commun est appelé Akhort [24].

Juglans regia L. est un grand arbre à feuilles caduques qui peut vivre 150 à 200 ans [25]. Il croît pour atteindre 25 à 35 mètres de haut. Son tronc souvent court peut atteindre jusqu'à 2 mètres de diamètre. C'est une espèce de lumière, exigeant une exposition importante au soleil pour bien se développer [13].

✚ Racine :

D'après **Becquey** [26], la racine est pivotante. Dès la première année, le pivot atteint 50 à 80 cm, puis il continue à s'enfoncer et peut descendre jusqu'à 3 et même 5 m si le sol le permet.

✚ Ecorce :

Le Noyer commun se reconnaît à son écorce de couleur blanc argenté à mat lisse dans le jeune âge [27], sur les arbres les plus âgés elle brunit et se fissure en long [28].

✚ Rameaux :

Ils sont gros anguleux, bruns luisant, et portent de larges cicatrices foliaires triangulaires situées sous le bourgeon. L'intérieur des rameaux est constitué d'une moelle cloisonnée. Les bourgeons globuleux et brun-noirs sont glabres et sont enveloppés de 2 écailles [28].

✚ Feuille :

Les feuilles sont de 25 jusqu'à 40 centimètres de long, disposées en alternance, imparipennées avec 5 à 9 folioles, jumelées en alternance avec une foliole terminale. Elles mesurent de 10 à 18 cm de long et 6 - 8 cm de large [13].

✚ Fleur :

La floraison a lieu avant la sortie des feuilles. Les fleurs mâles sont des châtons mesurant de 5 à 10 cm de long, vert jaune et apparaissant sur les pousses de l'année.

Les fleurs femelles, globuleuses et groupées par 2 ou 3, ont de très larges stigmates [28].

Fruit :

Le fruit est sphérique de 4 à 6 cm de large, c'est une noix à coque très dure, à 2 valves enfermées dans une enveloppe (le brou) épaisse et charnue, d'abord verte, puis brun noir [28]. S'ouvrant d'elle-même à maturité, la peau mince de la noix est ridée et possède deux arêtes renflées contrairement à d'autres variétés de *Juglans* [29], la coque renferme une amande très riche en huile savoureuse et comestible fraîche ou sèche [19].

1.1.3. Origine et répartition géographique

Juglans regia L. est originaire de la chaîne des montagnes de l'Asie centrale, qui s'étend de la province de Xinjiang ouest de la Chine, du nord de l'Inde, du Pakistan et du Sri Lanka via l'Afghanistan, l'Iran et la Turquie orientale [13][30].

Dans ces pays, se trouve une grande diversité génétique de cette espèce, en particulier les formes ancestrales avec la fructification latérale.

Le noyer commun est une espèce forestière et fruitière, du fait que ses fruits, son bois, son écorce et ses feuilles, trouvent une large utilisation dans la vie quotidienne algérienne [31]. Il se trouve souvent sous forme de peuplement dans différentes régions de l'Algérie, constitués généralement d'hybrides naturels principalement 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. Cependant, les surfaces plantées appartiennent généralement aux privés [32].

1.1.4. Profil phytochimique et principes actifs

Fruits

Les noix ont été utilisées globalement dans la nutrition humaine depuis les temps anciens. La haute teneur en protéines et en huile contenu dans les grains de *Juglans regia* L. (Juglandacea) rendent ce fruit indispensable pour la nutrition humaine [33].

Ils sont aussi une bonne source en flavonoïdes, en stérols, des substances pectiques, acides phénoliques et polyphénols apparentés ainsi que des composés organiques et minéraux : les acides gras insaturés, vitamine E, fibres, magnésium et potassium [34][35].

Les graines des noix contiennent une teneur élevée en huile dont la gamme varie entre 52 à 72% [36].

Les composés majoritaires de l'huile de noix sont les tri-acyl-glycérols (980 g / kg d'huile), dans laquelle les acides gras mono-insaturés (principalement l'acide oléique 18:1 n-9) avec une teneur qui varie de 22,63 à 27,27%, et les acides gras polyinsaturés (acides linoléique 18:2 ω 6 et α -linoléique 18:3 ω 3) sont présents en grandes quantités : 49,93 à 54,41% et 14,32 à 17,82% respectivement (Figure 1.2) [13][35].

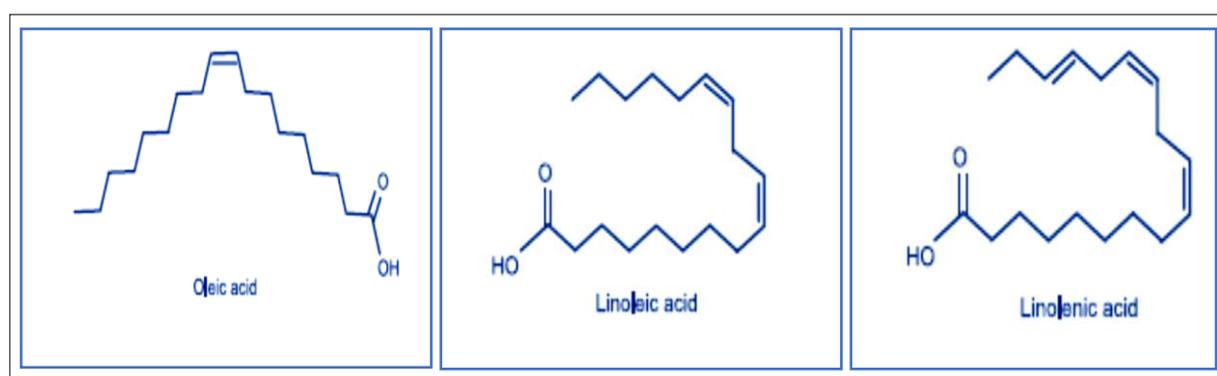


Figure 1.2. Acides gras insaturés présents dans les fruits de *Juglans regia* L. [37][38][39].

Selon une étude menée par plusieurs chercheurs, il a été trouvé que la valeur moyenne pour les protéines était de 18,1%, composées principalement de glutélines (environ 70% des protéines totales des graines) avec des quantités moindres de globulines (18%), albumines (7%) et prolamines (5%) [38].

✚ Feuilles

Les feuilles de noyer sont considérées comme une source naturelle de composés utilisées largement en médecine traditionnelle de soins de la santé [27].

Les études phytochimiques montrent que les feuilles contiennent environ 10% de tanins du type ellagitanins [40] et pas moins de 2 % de tanins pyrogallol [41].

Les métabolites identifiés à partir des feuilles de *Juglans regia* L. sont principalement des polyphénols c'est-à-dire des naphthoquinones comme la juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), tanins hydrolysables, flavonoïdes, phénol, acides

carboxyliques comme féruliques et l'acide caféique ainsi que les diarylheptanoïdes (Figure 1.3) [42][43].

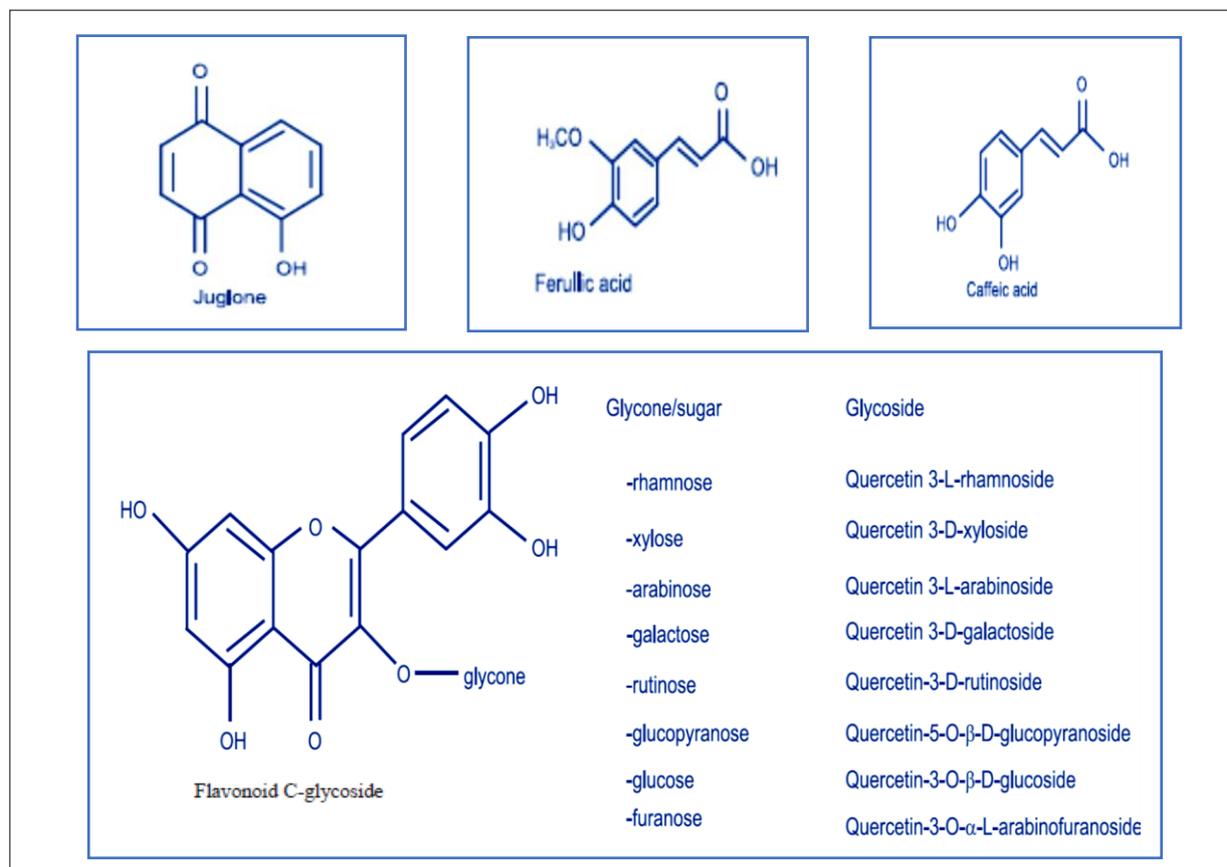


Figure 1.3. Flavonoïdes, Juglone et acides organiques présents dans les feuilles de *Juglans regia* L.[44][45][43][37].

Les terpènes ont été identifiés également, en particulier les monoterpènes, les sesquiterpènes et les mégastigmanes [46][47].

Elles contiennent aussi environ 3,4 % des flavonoïdes principalement sous forme de quercétine [48] [49], répartis respectivement : 0,6% d'hypéroside (quercétine 3-O-galactoside) [48], entre 0,2 et 0,6% de quercétine 3-O-rhamnoside [48] [49], Plusieurs autres flavonoïdes comme la quercétine 3-galactoside, quercétine 3-arabinoside, quercétine 3-xyloside, quercétine 3-rhamnoside et deux autres partiellement identifiées ; la quercétine 3-pentosides et le kaempférol ont été détectés[42] [50].

✚ Huile essentielle

Verma et al., [51] ont exploré la diversité du rendement et de la composition en l'huile essentielle des feuilles de *Juglans regia*. Les principaux composants des huiles essentielles identifiés étaient le (E)-Caryophyllène (1,4 %- 47,9%), β -Pinène (4,5% - 39,5%), Germacrène D (5,0% - 23,3%), α -Pinène (1,5 %- 18,1%) et -Humulène (1,1% - 11,8%).

Dans une étude réalisée en Inde, les composantes majeures de l'huile essentielle des feuilles de noix étaient α -Pinène (15,1%), β -Pinène (30,5%), β -Caryophyllène (15,5%), Germacrène D (14,4%) et Limonène (3,6%)(**Figure 1.4**) [52].

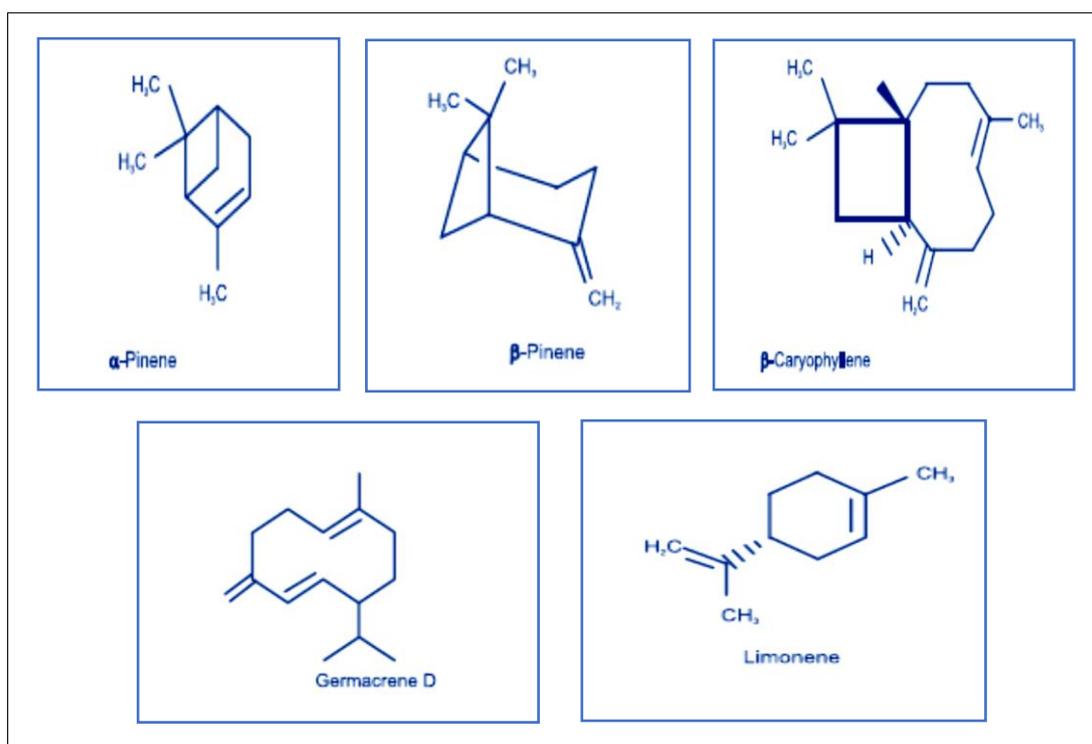


Figure 1.4. Composition en l'huile essentielle des feuilles de *Juglans regia* L. [44][45][52][53].

✚ Ecorces (Souak)

En Afrique du Nord, « l'écorce des racines est très recherchée par les indigènes comme dentifrice » ou souak (le nom du bâtonnet à se frotter les dents) [54].

Au Maroc, **Souak** « **bois frotte-dents** » est appliqué à l'écorce. Les écorces, de tige et de racines, se trouvent chez les herboristes en petits paquets. Les indigènes s'en servent comme dentifrice, d'où le nom de Souak.

En découpant les bois frotte-dents en lanières, ils frottent sur leurs dents et gencives. Cette pratique a pour effet d'affermir les gencives tout en les colorants, ainsi que les lèvres.

Dans une étude réalisée sur les écorces de noix, six acides phénoliques ont été identifiés par résonance magnétique nucléaire : acide pyrogallique (**1**), acide phydroxybenzoïque (**2**), acide vanillique (**3**), ethyl gallate (**4**), acide protocatechuique (**5**) et acide gallique (**6**) (**Figure1.5**) [43].

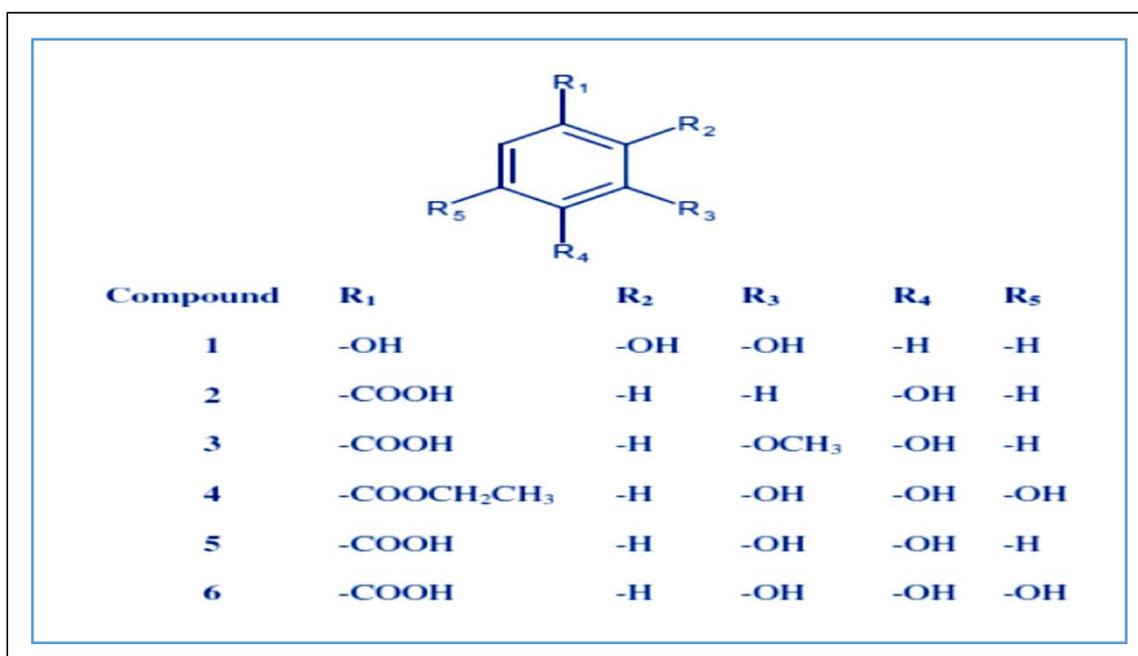


Figure 1.5. Structures chimiques des composés phénoliques des écorces de noix identifiés par RMN [43].

1.1.5. Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques

Des investigations biologiques et pharmacologiques de *Juglans regia* L. ont été rapportées par différents chercheurs révélant plusieurs activités (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1. Propriétés pharmacologiques et biologiques de *Juglans regia* L.

Potentiel thérapeutique	Pathologie	Molécule thérapeutiques	Référence
Anti-dermatophyte	Onychomycoses-teigne de cheveux	Flavonoïdes, tannins	[55]
Antibactérien	Affection cutanée : acné Infections Maladies parodontales	Flavonoïdes, tannins, Juglone	[9] [10] [11]

Antifongique	Affection cutanéounguéale Affections pulmonaires Muguet buccal Eczéma Psoriasis	Flavonoïdes, tannins, alcaloïdes, Saponosides, Terpenoïdes	[12] [13] [14]
Anti-viral	Herpès simplex Arthralgies Exanthème	Flavonoïdes, juglone	[56] [57]
Anti-helminthique	Parasitose	Polyphénols, tanins	[58] [59]
Hypo-glycémiant	Diabète type 2	Composés poly- phénoliques	[60]
Neuro-protecteur	Alzheimer Parkinson	AGMI, AGPI	[16]
Hépto-protecteur	Lésions hépatiques	Composés poly- phénoliques, juglone	[18]
Antituberculeux	Tuberculose	Juglone	[61]
Anti-hyperuricémique	Uricémie	Composés poly- phénoliques	[62]
Anticancéreux	Cancer du côlon, Cancer du sein, Cancer de la prostate Cancer de la peau Cancer du poumon	Juglone	[15]
Antioxydant	vieillessement cutané	polyphénols	[17]
Antidépresseur	dépression	sérotonine	[63]
Anti-inflammatoire	Inflammation	Composés poly- phénoliques	[64]
Hypolipémiant/ antihypertenseur	Hypertension artérielle	Juglone, AGMI, AGPI, phytostérols	[65]

1.2. Microorganismes et pathologies infectieuses étudiées

L'organisme humain est constamment menacé par différents agents pathogènes, notamment les microorganismes : bactéries, virus, champignons microscopiques (**Figure 1.6**). Il possède un système de défense qui lui permet d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut aggraver la situation et entraîner une maladie infectieuse [66].

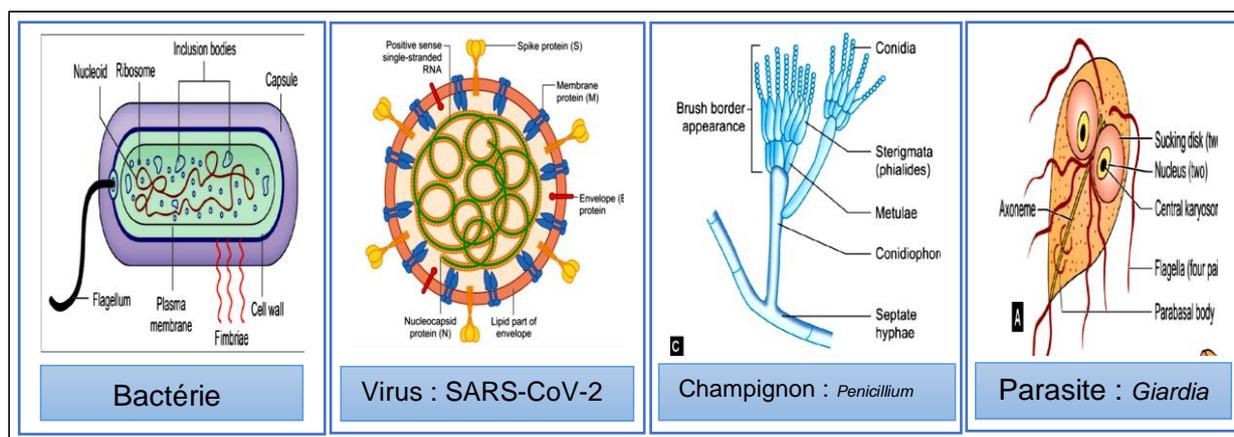


Figure 1.6. Différentes classes des microorganismes [67].

1.2.1. Infections d'origine bactérienne

La capacité des bactéries à provoquer des maladies ou des lésions tissulaires, est souvent référée à deux termes étroitement liés mais non synonymes « pathogénèse » et « virulence » [67]. Les bactéries sont des microorganismes pourvues d'un caractère d'adaptation. Elles sont capables de survivre et de se multiplier dans l'environnement, certaines développent un phénomène de sporulation pour vivre plus longtemps. La plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. En plus, elles possèdent un potentiel d'adaptation génétique important "ADN plasmidique" comme elles peuvent transférer ce matériel génétique vers différentes espèces. Cette adaptabilité génétique peut augmenter à la fois le pouvoir pathogène et la résistance aux antibiotiques [68].

1.2.2. Infections d'origine fongique

Les mycoses sont des infections fongiques causées par des champignons microscopiques. Elles peuvent être superficielles touchant la couche cornée de l'épiderme, les ongles, les cheveux, les poils et les muqueuses, comme elles peuvent être semi-profondes, profondes (viscérales) ou systémiques [69]. Les mycoses ne sont pas rares, et il semble que leur incidence soit toujours en augmentation, puisqu'elles touchent plus d'un milliard de personnes dans le monde [69]. Il existe plus de 3700 genres et 100 000 espèces de champignons microscopiques, dont environ 400 espèces pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'homme [70] [71].

1.2.3. Infections ostéo-articulaires sur matériel en chirurgie orthopédique

a) Articulations

Les zones de contact entre les os sont d'une importance capitale pour la mobilité et la solidité du squelette. La grande majorité des articulations sont mobiles, c'est-à-dire qu'elles permettent aux os de bouger les uns par rapport aux autres.

La membrane qui tapisse l'intérieur d'une capsule fibreuse produit un liquide, la **synovie**, qui remplit la cavité synoviale. Elle lubrifie l'articulation et nourrit les cartilages qui tapissent l'extrémité des os [72] (**Figure 1.7**).

Les articulations fibreuses et cartilagineuses possèdent très peu de mobilité, tandis que les articulations synoviales permettent une grande variété de mouvements (**Figure 1.8**). Ces dernières sont délimitées par une capsule fibreuse solidement fixée.

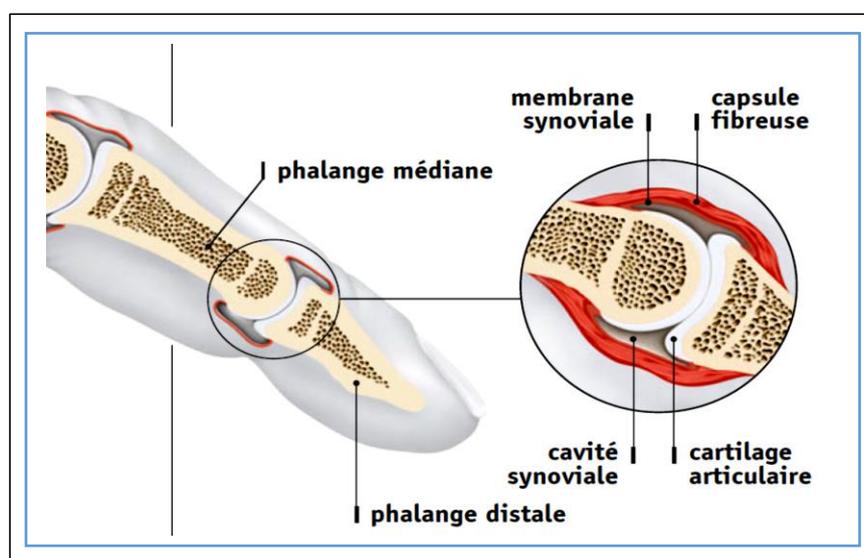


Figure 1.7. Articulations synoviales [72].

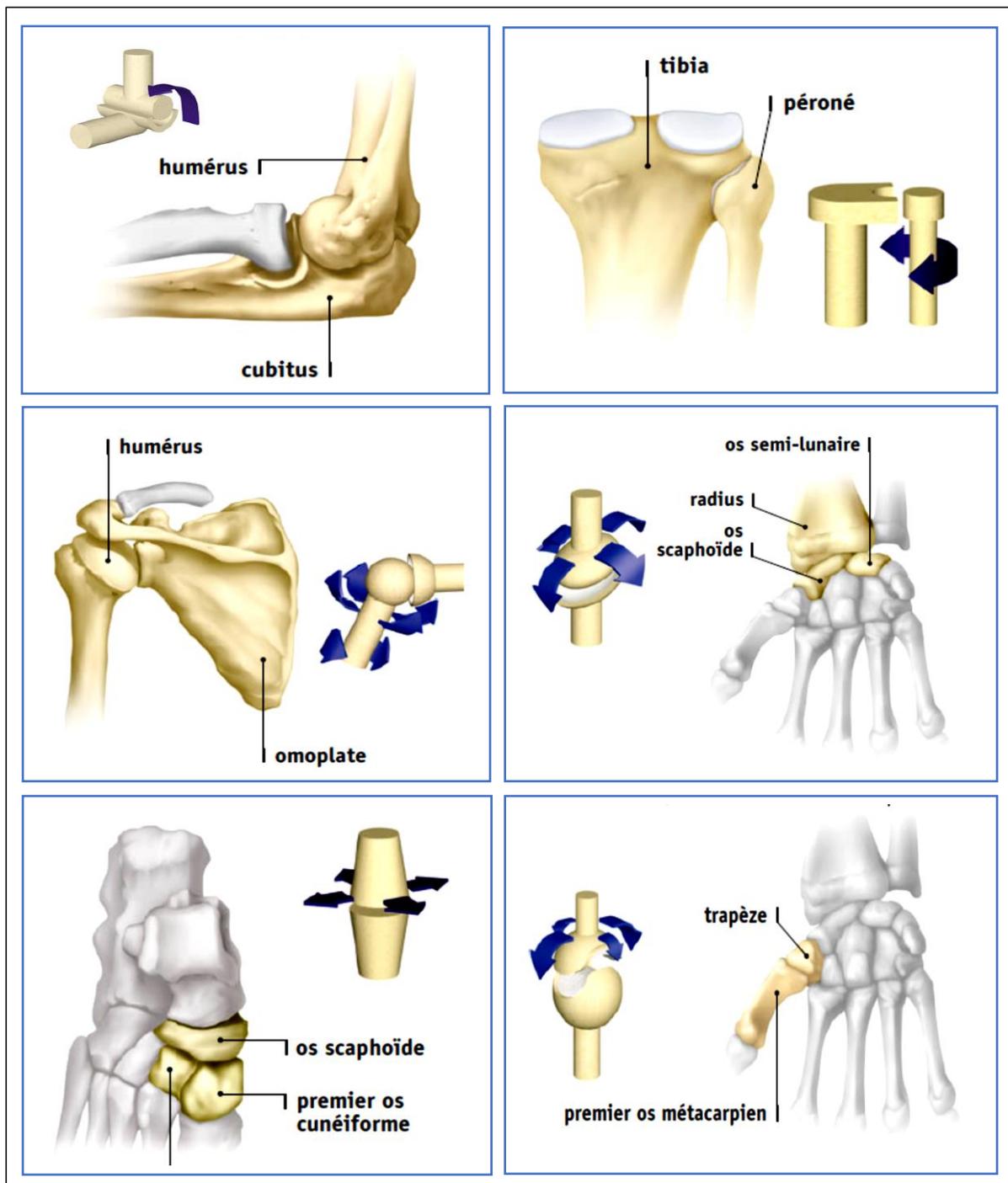


Figure 1.8. Différents types d'articulations synoviales [71].

Les nouvelles technologies ont permis à la chirurgie orthopédique d'assurer le remplacement des articulations par la mise en place des implants chirurgicaux (prothèses et matériel d'ostéosynthèses), d'améliorer la mobilité et de restaurer la fonction articulaire [73]. Les infections ostéoarticulaires (IOA) regroupent un ensemble

d'entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par des microorganismes, le plus souvent bactérien [74][75].

Ces infections ostéoarticulaires (IOA) apparaissent comme des complications traumatiques post-opératoires à cause de ces matériaux orthopédiques étrangers. Parfois, l'infection persiste jusqu'à devenir chronique [76].

b) Types de matériel utilisés en chirurgie orthopédique

Le matériel utilisé en comblement ou en remplacement du tissu osseux est mis chirurgicalement en contact avec l'os, la moelle osseuse, le sang, le tissu musculaire voire même la partie profonde du derme. Il doit donc être parfaitement « tolérébiocompatible » : Vis, plaque vissée, clou centromédullaire, fixateur externe et les prothèses [77].

L'infection sur matériel orthopédique est liée à la présence de micro-organismes en phase de réplication. Implanté dans l'organisme, le dispositif de fixation de fracture est rapidement colonisé par des bactéries mettant en jeu des interactions physicochimiques [78]. Plusieurs facteurs de risque peuvent favoriser l'infection et déclencher le processus d'attachement abiotique :

- Infection du site opératoire,
- Patient à haut risque d'infection nosocomiale,
- Dermatoses inflammatoires ou infectieuses, escarres cutanées,
- Rasage traumatique intempestif,
- Une durée d'intervention chirurgicale supérieure à 3h,
- La qualité d'hémostase et de la fermeture cutanée,
- Environnement peu fiable : perforation des gants des opérateurs, importante contamination bactérienne de l'air,
- Conditions de pansement et la cicatrisation cutanée post-opératoire [79] [80].

c) Infection bactérienne

Les infections péri-implantaires figurent parmi les principales complications après le traitement par ostéosynthèse d'une fracture et requièrent une prise en charge interdisciplinaire [81]. La présence du matériel orthopédique offre une surface sur laquelle les bactéries vont pouvoir adhérer pour former un biofilm [82]. Les agents pathogènes les plus fréquemment incriminés sont les bactéries à Gram positif tels que

le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) (30%) et les *Staphylocoques* à coagulase négative (22%) [83]. Ce réservoir bactérien peut initier la production de biofilm, qui représente un assemblage des bactéries en agrégats, irréversiblement adhérentes à une surface inerte grâce à la matrice polysaccharidique extracellulaire (MEC) [84]. Ce processus d'attachement est favorisé par des protéines de la (MEC) telles que : adhésines /autolysines (AtIA) et (AtIE) présentes respectivement chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* [85].

Afin de pouvoir déterminer la stratégie thérapeutique optimale, les infections péri-implantaires sont classées selon trois caractéristiques (**Tableau 1.2**) [81]:

- Moment d'apparition (infection précoce ou tardive),
- Etendue de l'infection/ostéomyélite,
- Traitabilité du biofilm (mise en évidence d'agents pathogènes problématiques).

Tableau 1.2. Classification des infections péri-implantaires en infections précoces et tardives [81].

	Infection précoce	Infection tardive
Moment d'apparition	Infection postopératoire précoce (<6 semaines après l'opération)	Infection de bas grade (>6 semaines après l'opération) Infection récidivante / persistante
Biofilm	Immature	Mature
Signes cliniques	Fièvre, rougeur, gonflement, douleurs	Douleurs, relâchement de l'implant, fistule
Agents pathogènes	Hautement virulent : <i>Staphylococcus aureus</i> , streptocoques, entérocoques, bactéries à Gram négatif	Faiblement virulent : <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>
Traitement	Débridement et maintien de l'implant	Retrait ou remplacement de l'implant.

1.2.4. Mycoses superficielles : Onychopathies à dermatophytes et à *Candida*

a) Onychopathie à dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux et kératinophiles qui se développent préférentiellement dans la couche cornée de la peau et des phanères

[86]. L'atteinte au niveau des pieds est beaucoup plus fréquente qu'au niveau des mains, elle prédomine au gros orteil **[87]**.

On distingue plusieurs formes cliniques d'onychomycose à dermatophytes **[83]** :

- **Onychomycoses sous-unguéales distales ou latéro-distales :**

C'est l'atteinte la plus fréquente, elle touche souvent les gros orteils en premier puis les autres ongles. Elle se présente sous la forme d'une hyperkératose, une onycholyse et un aspect blanc jaunâtre des ongles. Le champignon pénètre par la partie distale de l'ongle, sous la tablette unguéale **[88]**.

- **Onychomycoses sous-unguéales proximales :**

Le champignon pénètre par l'extrémité proximale de l'ongle et se propage dans la partie distale et en profondeur de la lame unguéale. Cette atteinte est observée principalement chez des patients immunodéprimés **[89]**.

- **Onychomycoses superficielles blanches ou leuconychies :**

Les leuconychies superficielles correspondent à une atteinte de la partie superficielle de la tablette unguéale sans atteinte du lit de l'ongle **[88]**.

- **Onycho-dystrophie totale :**

Cet aspect correspond à une destruction totale des ongles par les dermatophytes **[89]**. Elle constitue l'état ultime d'une des variétés précédentes. L'ongle est épaissi, déformé, parfois très friable et disparaît complètement, laissant le lit à nu, parsemé de débris de kératine anormale **[90]**.

b) Onychomycose à Candida : Candidose

Les candidoses cutané-unguéales représentent les aspects cliniques les plus fréquemment rencontrés dans les infections à Candida **[91]**. La principale espèce pathogène, *Candida albicans*, ubiquitaire, colonise généralement l'oropharynx, le tube digestif et le vagin. Les principaux sites pouvant être touchés par les pathogènes du genre Candida sont : la cavité buccale et le système digestif ; la sphère urogénitale ; les plis cutanés (intertrigo) et les ongles **[87][92]**.

Les candidoses unguéales siègent dans la plus part des cas au niveau des mains, les femmes sont touchées avec prédilection. Souvent l'atteinte débute par un périonyxis sous forme d'un bourrelet inflammatoire plus ou moins saillant entourant la base de l'ongle et dont la pression douloureuse exprime une sérosité **[93]**.

1.2.5. Infections bucco-dentaires

La maladie carieuse est une maladie infectieuse multifactorielle qui se caractérise par une déminéralisation progressive des tissus durs de la dent (émail dentine, cément) [94]. La carie dentaire résulte ainsi de l'interaction de trois principaux facteurs [95][96][97]:

- Facteur bactérien, par la présence de bactéries cariogènes au sein de la plaque dentaire.
- Facteur alimentaire, par l'ingestion importante et fréquente de sucres fermentescibles.
- Facteur hôte lié à ses capacités de défenses (émail, salive).

La santé bucco-dentaire a des effets directs sur l'être humain ainsi que sur la qualité de sa vie quotidienne. Les lésions de la cavité buccale demeurent actuellement les pathologies infectieuses les plus répandues dans le monde, à savoir les caries dentaires et les maladies de la gencive [98]. La cavité buccale représente une niche écologique favorable (température, humidité, pH et nutriments), qui permet la colonisation et la croissance d'une gamme diversifiée de microorganismes, principalement bactérien [99].

La majorité des microorganismes sont présentés sous forme de biofilm attachés sur les tissus (plaques dentaires). Ce dernier représente un mode de vie, qui permet aux germes pathogènes de développer un caractère de résistance [100]. Parmi ces microorganismes, *Enterococcus faecalis* un pathogène opportuniste des voies gastro intestinales et uro-génitales. Ce microorganisme ne fait pas partie de la flore normale des plaques dentaires [101], mais il possède une grande aptitude de former des biofilms [102]. Considéré comme étant le principal agent étiologique causatif de ces infections persistantes [103], ainsi, la formation des biofilms augmente significativement la résistance des pathogènes endodontiques, à la fois face aux solutions d'irrigations couramment utilisées et envers les conditions défavorables de l'espace endodontique [104].

Par ailleurs, *E. faecalis* est considéré actuellement comme l'agent étiologique responsable de l'évolution des caries dentaires allant d'une simple lésion vers des infections potentiellement graves, telles que les endocardites [105] et les parodontites apicales [106](Figure1.9).

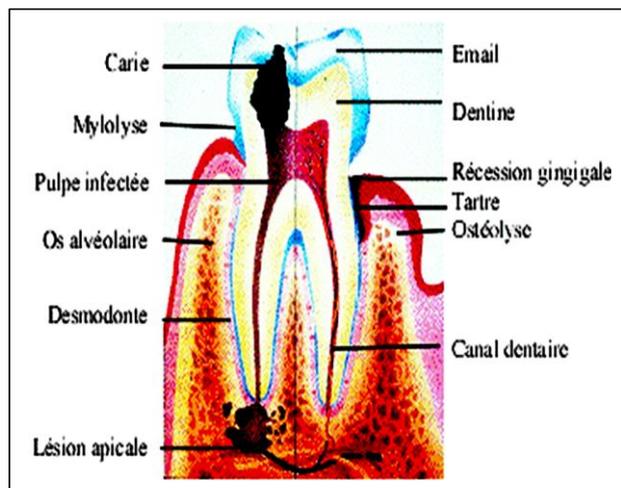


Figure 1.9. Parodontite apicale [107].

Après un traitement endodontique et plombage de la dent infectée, des échecs surviennent parfois et qui se caractérisent par une récurrence : réinfection de la racine dentaire et la persistance de l'inflammation. Ces pathologies dues à l'échec endodontique sont connues sous le terme d'infection endodontique persistante [108]. La principale cause de l'échec endodontique est liée à la persistance de certains pathogènes vis-à-vis des traitements mécaniques et à la résistance aux solutions d'irrigation : l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et la chlorhexidine (CHX) [104].

1.3. Mécanismes d'action des molécules bioactives

1.3.1. Activité anti-bactérienne

Sous la forme de biofilm, les bactéries posent de graves problèmes en matière de santé publique. Elles sont plus résistantes à divers traitements antimicrobiens. La recherche de l'activité antibactérienne consiste à estimer le degré d'inhibition de la croissance des germes soumis sous l'action d'une molécule thérapeutique. Les naphthoquinones sont des composés aromatiques (Polyphénols) qui possèdent deux fonctions cétonne. Dans leurs structures di-cétonne, ils sont pourvus d'une vraie source de radicaux libres stables. Ce sont des composés capables de se lier irréversiblement avec les acides aminés nucléophiles des protéines. Cette complexification mène souvent à l'inactivation des protéines et à la perte de leurs activités. Les cibles probables dans les cellules microbiennes sont, en effet les adhésines de surface, les polypeptides des parois cellulaires ainsi que l'inactivation des enzymes [109].

Le mécanisme d'action antibactérien des polyphénols est représenté comme suit :

- Inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne,
- Inhibition du métabolisme microbien,
- Dégradation de la paroi cellulaire et perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN.
- Perturbation de la fonction mitochondriale [110][111][112].

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes, probablement dû à leurs diversités structurales. Le nombre et la localisation des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur toxicité envers les microorganismes. Evidemment, le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [113].

1.3.2 Activité antifongique

Les composés terpéniques (les phénols et les aldéhydes) réagissent avec les enzymes membranaires en dégradant la membrane plasmique des levures [114].

Les quinones possèdent des molécules très réactives, à noyaux aromatiques, avec deux substitutions cétoniques. Bien évidemment, leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires. Ils se complexent irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines [115].

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques pourvus d'une unité C6-C3 liée à un noyau aromatique [116]. Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Aussi, ces métabolites secondaires à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes et augmentent ainsi la fluidité des lipides membranaires des dermatophytes [117].

Les composés phénoliques peuvent exercer une activité antimycosique puissante (**Figure 1.10**) :

- Altération de la structure de la membrane cellulaire du champignon entraînant ainsi des changements de propriétés des fonctions membranaires,
- Inhibition complète de la croissance mycélienne [118] [119].

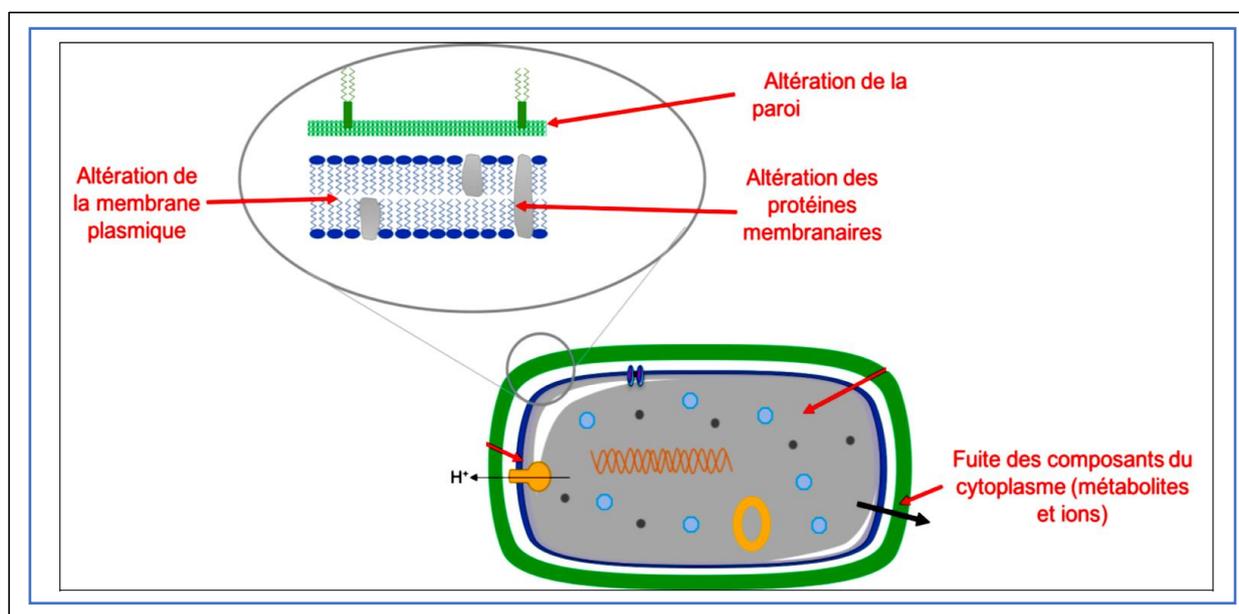


Figure 1.10. Mécanisme d'action antimicrobien [112].

1.3.3. Héματο-toxicité

D'après **Ramchoun et al .**,[121] les flavonoïdes interagissent avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes et s'accumulent ainsi à la surface des membranes ce qui permet de réduire l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique. Par ce mode d'action, les flavonoïdes jouent donc un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité membranaire érythrocytaire.

1.3.4. Activité antioxydante

Actuellement, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Les cellules peuvent être soumises à une grande variété d'agression physique (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plus part de ces agressions sont connues sous le terme stress oxydant [114]. Il s'agit d'un

déséquilibre de la balance entre le système de défenses des antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cela entraîne des altérations biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, à savoir les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de phénomène de la peroxydation lipidique [115]. Ces (ERO) sont susceptibles de provoquer l'accumulation des dommages moléculaires et cellulaires impliquées dans la potentialisation de l'apparition de nombreuses pathologies.

Pour contourner les dommages causés par les (ERO), la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. La majorité des antioxydants naturels sont des composés phénoliques : les flavonoïdes, les acides phénoliques et le α -tocophérol (Vitamine E), car ils participent à la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Figure 1.11).

Les composés phénoliques agissent comme accepteurs des radicaux libres. Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides ainsi que d'autres molécules par donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux : $R + CPH \rightarrow RH + PO^*$ [116].

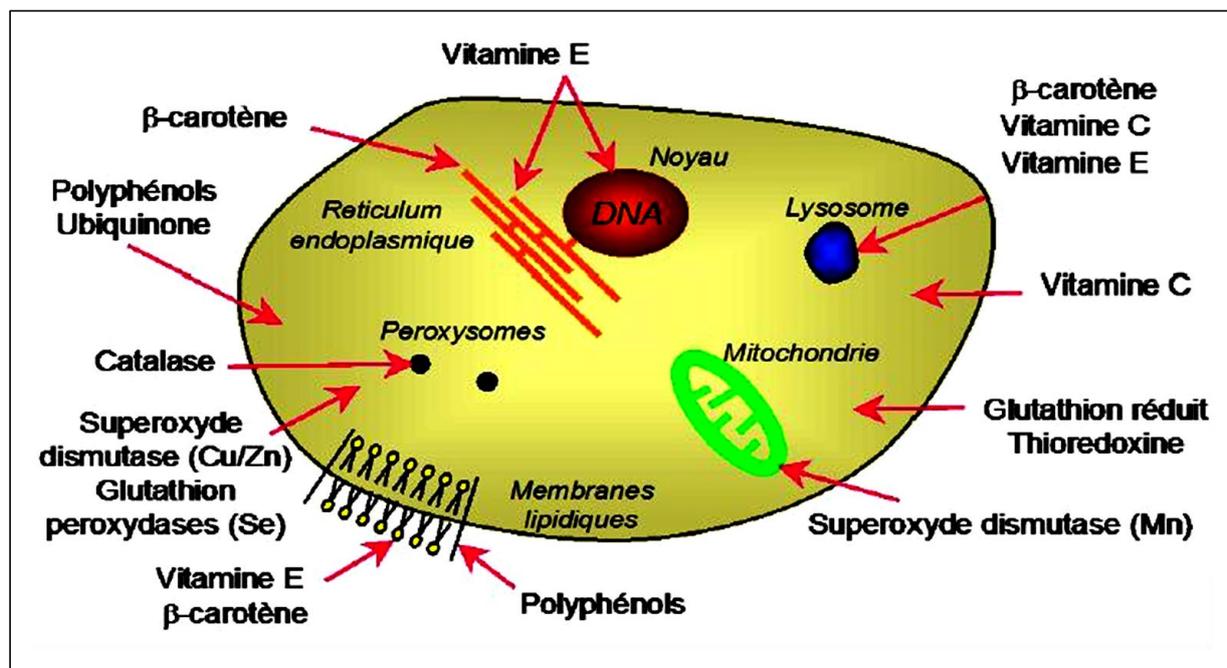


Figure 1.11. Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires [117].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Lieux des expérimentations

La présente étude s'est étalée sur une période allant du mois de Novembre 2018 à Novembre 2021 et a été réalisée au niveau des structures suivantes :

- ✚ Laboratoire de recherche de Biotechnologies, Environnement et Santé, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab, Blida1.
- ✚ Laboratoire d'Analyse de Chromatographie Liquide, Centre de Recherche des Analyses Physico-Chimique, Bousmail, Tipaza.
- ✚ Laboratoire de Recherche et de Développement, de Contrôle Microbiologique et des Analyses Physico-Chimiques, Vague de Fraicheur, Blida.
- ✚ Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologie (Homme /Femme), bloc opératoire septique et central, Centre Hospitalo-Universitaire, Frantz fanon, Blida.
- ✚ Laboratoire Central, Unité de Bactériologie I et II, Centre Hospitalo-Universitaire, Frantz fanon, Blida.
- ✚ Laboratoire Central, Unité de Mycologie et Parasitologie Médicale, Centre Hospitalo-Universitaire, Frantz fanon, Blida.
- ✚ Laboratoire Central, Unité d'Hémobiologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Frantz fanon, Blida.

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Matériel végétal

Les feuilles et les écorces des jeunes rameaux ont été prélevées d'un arbre âgé de 32 ans, originaire de l'atlas Blidéen, (Soumâa), sur deux périodes différentes (octobre 2018 et octobre 2019) en raison du manque du matériel végétal utilisé. Le poids total (feuilles et écorces) récolté est estimé à 2kg pour chaque période.

L'identification de la plante a été faite au département de Biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie par Mr METTAI. M, Maitre-assistant en botanique. Arbre élevé, à écorce lisse et blanchâtre ; feuilles caduques, alternes, pétiolées, imparipennées, à 5-9 folioles ovales-aiguës, entières, glabres, aromatiques, sans stipules ; 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, en comparaison avec les spécimens d'un herbier.

2.2.2. Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur quelques microorganismes. La plupart rencontrés dans diverses pathologies chez l'Homme :

- ✓ Une souche microbienne de *Staphylococcus* productrice de biofilm a été fournie par le Laboratoire de Bio-toxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes de l'université de Saïda Dr-Moulay-Tahar (Algérie), utilisée dans l'expérimentation comme témoin positif.
- ✓ Une souche bactérienne de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) a été fournie par le Laboratoire Central, Unité de Bactériologie I, CHU Frantz fanon Blida, utilisée pour l'évaluation du potentiel anticariogène et le traitement endodontique.

2.2.3. Populations de malades étudiées et prélèvements

2.2.3.1. Etude clinique des malades en chirurgie orthopédique et traumatologie

Des patients en nombre de 100, victimes d'une fracture ouverte ou comminutive, (Hommes -Femmes) de différentes tranches d'âge, ont été hospitalisés au service de chirurgie orthopédique et traumatologie. Tous ces malades ont bénéficié d'une intervention chirurgicale prothétique par la mise en pose d'une prothèse et/ou d'un matériel de fixation externe de fracture (**Figure 2.1**).

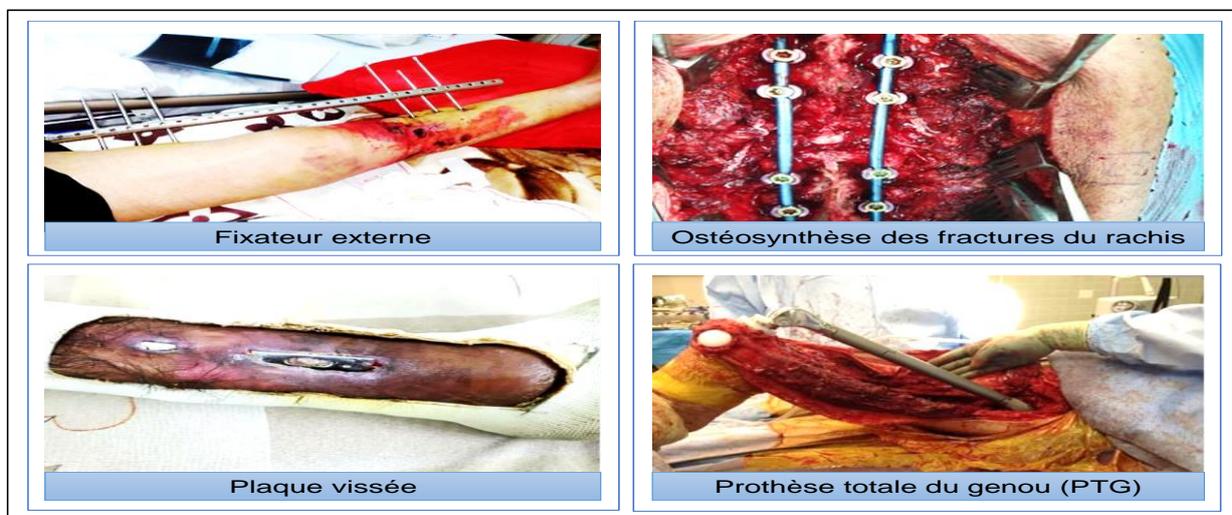


Figure 2.1. Différents types de matériel utilisés en chirurgie orthopédique (Photos originales, 2019).

2.2.3.2. Etude clinique des malades atteints d'une dermatomycose superficielle

Sont concernés par cette étude, des patients (Hommes, Femmes et enfants), en nombre de 16 personnes atteints de dermatomycose superficielle au niveau des ongles des pieds et mains adressés par différents services ou d'autres structures sanitaires publiques ou privées pour un diagnostic et un prélèvement mycologique (Figure 2.2).



Figure 2.2. Onychomycose à dermatophytes (Photos originales, 2021)

2.2.3.3. Etude clinique des malades atteints des infections dentaires

Huit (08) patients de sexe masculin et féminin, ont été admis au niveau du service de stomatologie, clinique Zabana, Blida. Différents prélèvements dentaires ont été effectués par des chirurgiens-dentistes spécialistes par écouvillonnage et sont immédiatement transportés au laboratoire.

2.2.3.4. Etude de la cytotoxicité et la viabilité cellulaire

Trois (03) patients ont été choisis pour la sélection des lignées cellulaires (Polynucléaires Neutrophiles/Lymphocytes) :

a) Un prélèvement d'un Liquide céphalorachidien (LCR) a été effectué chez un patient post- Covid (J 25), âgé de 16 ans, hospitalisé au niveau du service des urgences médico-chirurgicales.

b) Un prélèvement d'un liquide de ponction (Liquide d'Ascite) a été effectué chez une patiente âgée de 34 ans, hospitalisée au niveau du service CAC (centre anti-cancer/ chirurgie).

c) Un prélèvement du liquide articulaire a été effectué chez un patient âgé de 64 ans, hospitalisé au niveau du service de chirurgie générale.

✚ En raison de la pandémie du covid-19, le nombre des patients était assez restreint.

2.2.3.5. Etude de la tolérance et l'innocuité cutanée de la crème dermique formulée

26 personnes volontaires (Hommes, femmes et enfants), de différentes tranches d'âge ont participé à l'étude du Patch test.

2.3. Matériel non biologique

L'ensemble des équipements, des verreries et des produits chimiques utilisés dans cette étude est mentionné en **Appendice C**.

2.4. Méthodes

La figure suivante illustre les différentes étapes suivies lors de cette étude :

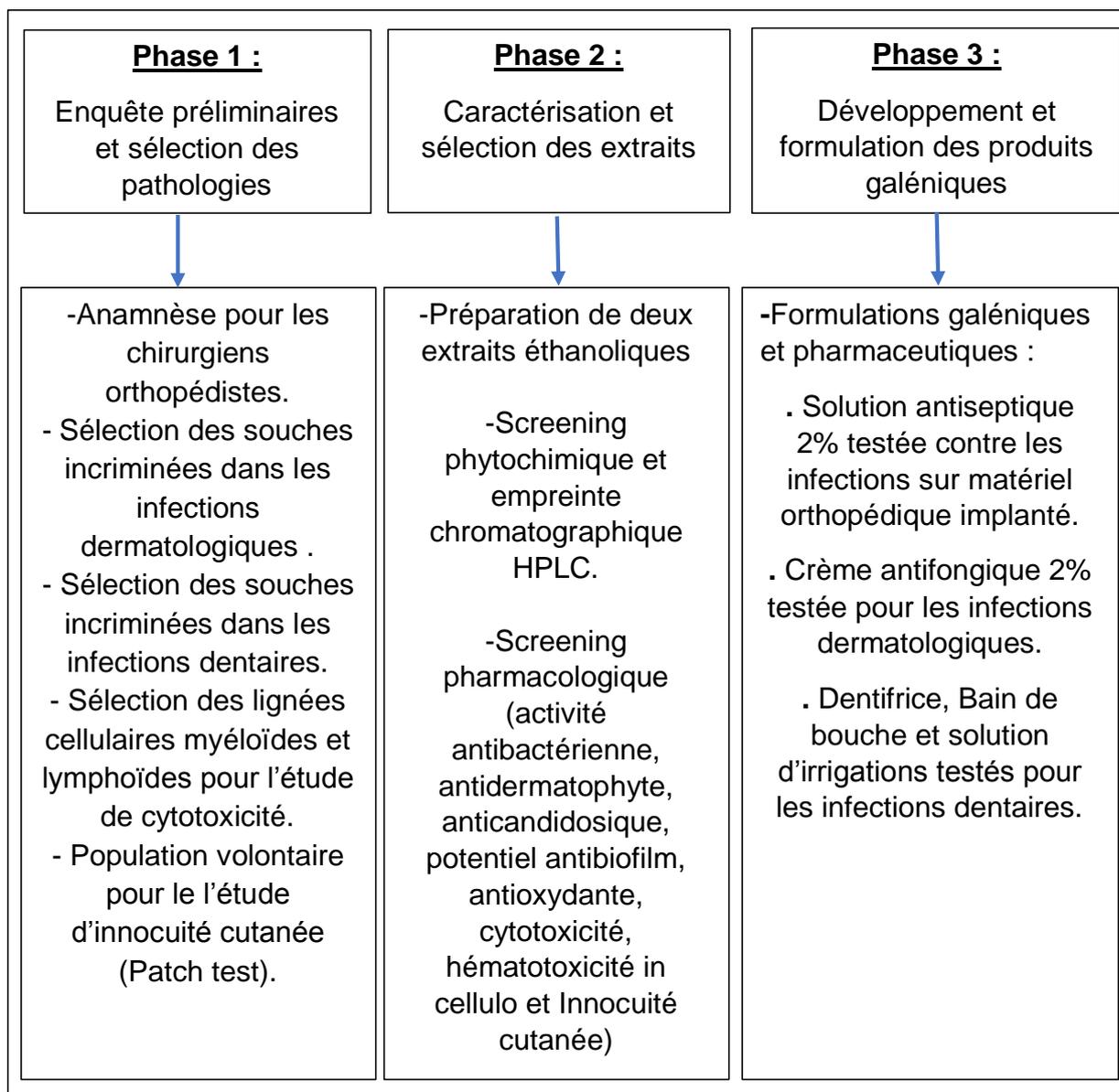


Figure 2.3. Synoptique de la démarche appliquée.

2.4.1. Préparation des extraits

Les feuilles et les écorces des jeunes rameaux ont été lavées puis séchées à l'air libre pendant sur une période de dix jours.

Le matériel végétal séché a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique en une fine poudre homogène puis conservée dans des bocaux hermétiques placés dans un endroit sec à l'abri de la lumière et l'humidité.

2.4.2. Cinétique d'extraction et rendement

Le procédé d'extraction adopté est celui de **Atmani et al.,[122]**. Les deux échantillons (feuilles et écorces) ont été macérés à froid. Une masse de 20 g de drogue a été homogénéisée dans 75 ml d'éthanol à 96 % pendant 48 heures sous agitation à 25 °C. Le choix du solvant éthanol (96%) dans le procédé d'extraction, dépend principalement de sa biodisponibilité, de sa non toxicité, de sa nature biodégradable et de son utilisation majeure dans l'industrie pharmaceutique vu qu'il est issu de produits naturels. L'homogénat a été filtré sur du papier Whatman n° 3. Le filtrat ainsi obtenu est évaporé à 90°C, à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Figure 2.4**).

Le macérat éthanolique des deux échantillons de *Juglans regia* L. recueilli est conservé au frais à 4°C dans un flacon en verre sec et stérile destinés aux tests pharmacologiques.

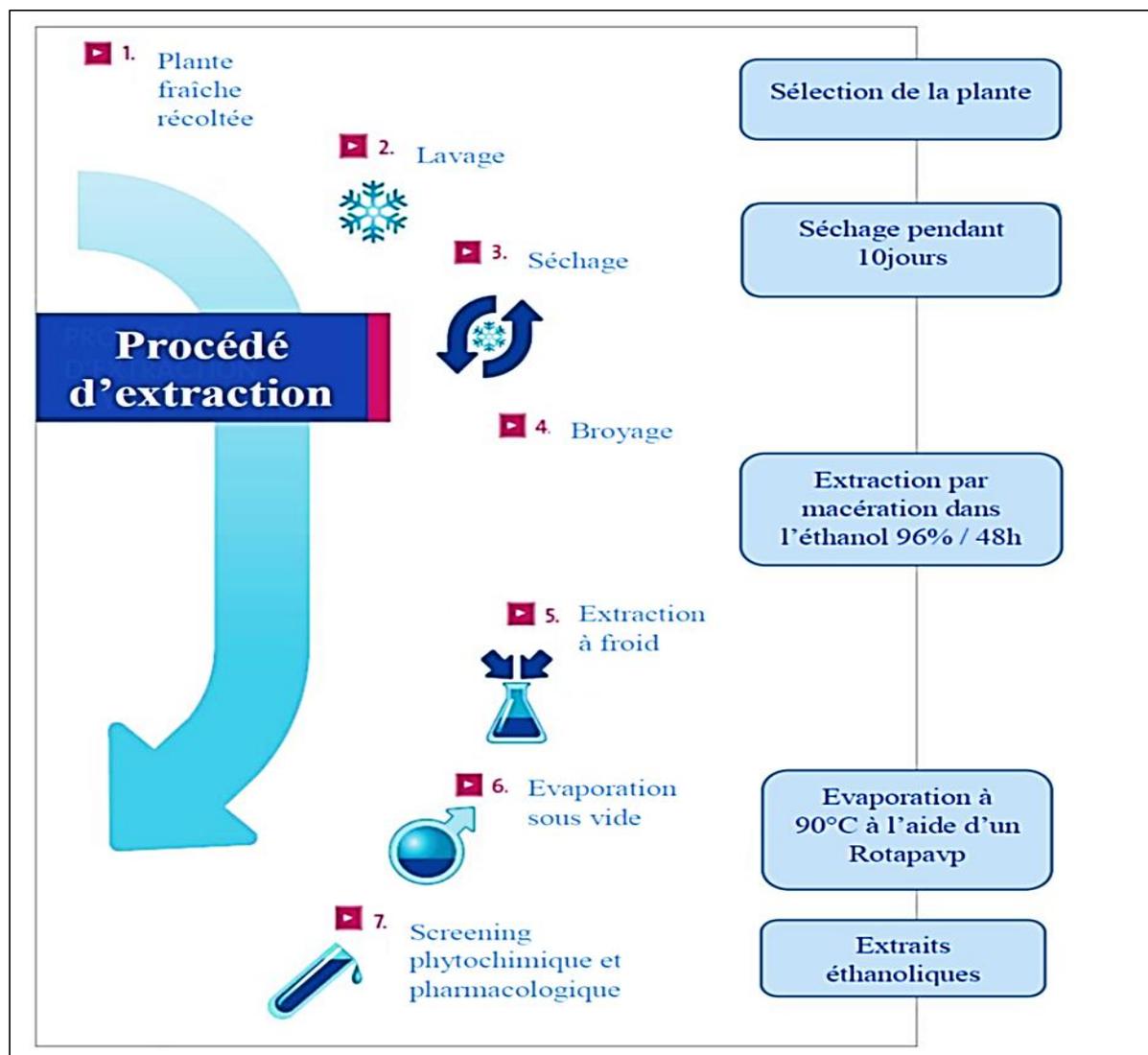


Figure 2.4. Procédé d'extraction.

2.4.3. Calcul du rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenue après l'extraction et la masse végétale traitée. Il est calculé par la formule suivante :

$$R\% = M_{\text{ext}} / M_{\text{ech}} \times 100$$

R = Rendement exprimé en %

M ext = Masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg

M ech = Masse de l'échantillon en mg

2.4.4. Screening phytochimique

Le criblage chimique a pour objectif de déterminer les différents groupements chimiques. Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique des deux échantillons (feuilles et écorces). La recherche des groupes chimiques a été réalisée par des réactions en tubes.

✚ Mise en évidence des coumarines

Dans un tube à essai, 2g de poudre des échantillons a été introduite dans 20 ml d'éthanol pendant 15 min puis est filtrée. A 5ml du filtrat, 10 gouttes de la solution KOH(10%) et quelques gouttes de HCl (10%) sont rajoutées. La disparition de couleur jaune et l'apparition d'un trouble ou d'un précipité indique un résultat positif [123].

✚ Mise en évidence des tanins

Une quantité de 1,5 g de poudre de feuilles et d'écorces, est placée indépendamment dans des tubes à essais, est diluée avec 10 ml de méthanol. Après agitation de 15 mn, quelques gouttes de trichlorure de fer (FeCl₃) à 1% sont ajoutées au filtrat. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques [124].

✚ Mise en évidence des flavonoïdes

La poudre des deux échantillons a été additionnée à 2 ml de NaOH à 2%. Une couleur jaune intense formée et qui devient incolore suite à l'addition de quelques gouttes d'HCl indiquait la présence de flavonoïdes [125].

Mise en évidence des saponines

Une quantité de 2 g de chaque échantillon a été ajoutée à 20 ml d'eau distillée, le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes puis filtré. Après refroidissement, 10 ml du filtrat a été additionnée de 5 ml d'eau distillés, puis agité vigoureusement pendant 2 min. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [126][123].

Mise en évidence des quinones

Les échantillons ont été dissous dans 5 ml d'HCl dilué au (1/5), puis chauffés au bain-marie bouillant pendant 30 min. Après refroidissement 0,5 ml de NH₄OH dilué à 50% ont été additionnés. L'apparition de couleur rouge au violet indique un résultat positif [123].

2.4.5. Analyse chromatographique des extraits par HPLC

Pour connaître les profils et identifier les composés individuels dans les échantillons, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la technique analytique la plus utilisée pour caractériser les composés poly-phénoliques [126].

20 µl de chaque extrait éthanolique (feuilles et écorces) ont été injectés sur une colonne de type C8 (AGILENT XDB ECLIPSE) (**Appendice F**), dotée des dimensions suivantes : longueur: 250 mm, diamètre : 4.6mm et taille de particules mesurant de 5µm. La phase mobile est constituée de deux éluants : phase A : Eau à 1% Ac. acétique et phase B : Méthanol grade HPLC. Le gradient d'éluion appliqué est étalé sur 60 min. Le débit est de 1 ml / min (**Tableau 2.1**).

Tableau 2.1. Gradient d'éluion.

Temps (min)	P.A	P.B
0	95%	5%
55	5%	95%
60	95%	5%

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde entre 254 nm et 280 nm.

2.4.6. Screening pharmacologique

Une solution antiseptique 2% a été testée dans le but de valoriser ses propriétés antimicrobiennes contre les infections ostéoarticulaires (IOA).

2.4.6.1. Elaboration de la solution antiseptique 2%

Une solution antiseptique 2 % a été formulée à partir de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. .Le procédé de fabrication a été inspiré des protocoles effectués au laboratoire Vague de fraîcheur dans la fabrication des solutions hygiéniques et désinfectantes, réalisé à froid sous des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination extrinsèque. En premier temps, une quantité de 0,5 g de propylène glycol (PG) a été ajoutée à 2 g de l'extrait. Dans un second temps, le Plantacare®818 et le reste des excipients ont été additionnés délicatement au mélange tout en assurant l'homogénéisation sous agitation magnétique. Différents essais ont été réalisés pour déterminer les quantités nécessaires des ingrédients à ajouter (**Tableau 2.2**).

Tableau 2.2. Composition de la solution antiseptique 2 % pour 25 ml

Ingrédients	%
Propylène glycol (PG)	0,5
Plantacare®818	0,0625
Vitamine E	0,125
Extrait éthanolique (principe actif)	2
Méthylisothiazolinone	0,025
Parfum	0,075
Eau	22,21

La solution antiseptique 2% préparée est soumise à un contrôle physico-chimique et microbiologique.

A. Contrôle physico-chimique

- Mesure du pH

À l'aide d'un pH-mètre, un volume bien déterminé de la solution antiseptique 2 % a été mesuré .

- Test organoleptique

Un examen macroscopique de la solution antiseptique 2% a été réalisé, fondé sur différentes caractéristiques organoleptiques (Aspect - Couleur - Odeur), le personnel de laboratoire de recherche et de développement, de Contrôle Microbiologique et des Analyses Physico-Chimiques, Vague de Fraicheur, Blida, a participé à l'appréciation de ce test.

B. Contrôle microbiologique

- Conditions opératoires

La préparation des dilutions au 1/10^{ème} a été effectuée en mettant en suspension 1g de la solution antiseptique 2% dans un milieu TSE. Le mélange a été agité pendant quelques minutes.

- Recherche et dénombrement des micro-organismes spécifiés

La recherche des micro-organismes spécifiés a été réalisée par l'utilisation de certains milieux sélectifs :

➤ Recherche des entérobactéries et les germes totaux

Un volume du mélange précédemment préparé a été introduit dans la Gélose Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre (VRBL), qui est ensuite remuée dans le sens circulaire et laissée reposée jusqu'à solidification puis incubée à 35°C pendant 48h.

➤ Recherche des *Staphylococcus aureus*

La même procédure citée précédemment a été suivie en utilisant un milieu gélosé Chapman et incubée à 35°C pendant 24h.

➤ Recherche des levures et des moisissures

La même procédure citée précédemment a été suivie en utilisant cette fois-ci le milieu gélosé Sabouraud liquéfié, incubée à 25°C pendant 5 jours.

Les résultats sont exprimés en colonie formant unité (UFC). Le produit est déclaré conforme si les résultats sont inférieurs aux limites citées par la pharmacopée européenne [127] :

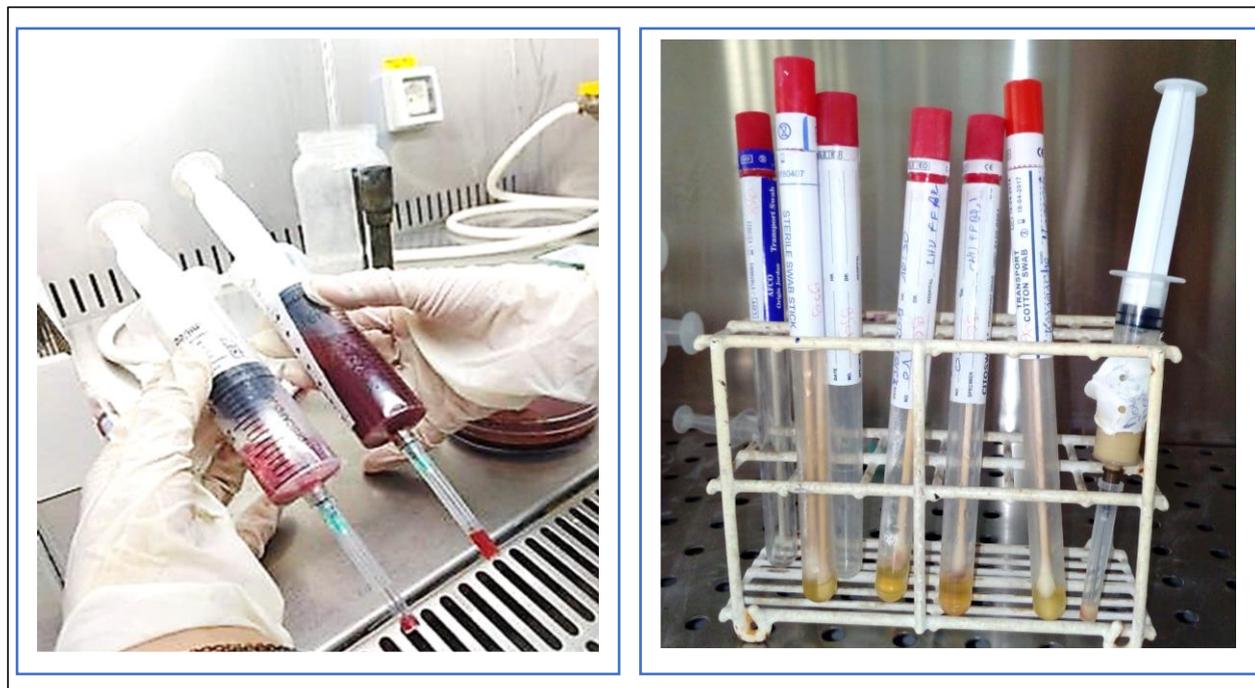
- Germes aérobies viables totaux : ≤ 200 UFC/g
- Levures et moisissures : ≤ 20 UFC/g
- Entérobactéries : ≤ 10 UFC/ml
- Staphylococcus aureus* : absence

2.4.6.1.1. Etude clinique

Des échantillons cliniques ont été prélevés sur pus de plaies post-opératoires, chez des sujets victimes d'une fracture ouverte ou comminutive, hospitalisés au service de chirurgie orthopédique et traumatologie, CHU Frantz Fanon, Blida. L'ensemble des patients en nombre de 100 ont bénéficié d'une intervention chirurgicale prothétique par la mise en pose d'une prothèse et/ou d'un matériel de fixation externe de fracture.

Les prélèvements ont été réalisés en respectant les règles d'asepsie afin d'éviter les résultats faussement positifs, le plus fréquemment par écouvillonnage d'un pus écoulé, d'une fistule ou par ponction (Liquide de drainage post-opératoire) **(Figure 2.5)**.

Au préalable, une enquête concernant les infections sur matériel d'ostéosynthèse a été réalisée au service de la chirurgie orthopédique et traumatologie **(Appendice G)**, destinée à l'ensemble des praticiens pour estimer le degré d'infection et avoir des recommandations pour la valorisation d'un produit naturel contre ces infections.



**Figure 2.5. Différents types de prélèvement de pus orthopédique
(Photos originales, 2019).**

Les prélèvements de pus ont été acheminés rapidement au laboratoire (< 2h) à température ambiante.

a) Examen macroscopique

Cet examen peut nous renseigner sur la couleur, la consistance, l'odeur et le caractère sanglant du pus.

b) Culture et isolement des bactéries

Les prélèvements de pus ont été ensemencés sur différents milieux de culture (Chapman, Hektoen, gélose au sang cuit (GSC), en utilisant la technique de quadrant. Tous ces milieux gélosés sont incubés à 37°C en aérobie, sauf la (GSC) a été incubée en présence de 5% de CO₂ pendant 24h.

c) Identification biochimique

Après incubation, l'identification des bactéries à partir des cultures positives repose sur l'étude des caractères biochimiques d'orientation à la recherche des enzymes respiratoires (test de catalase et oxydase) (**Appendice H**), ainsi que sur l'identification microbiologique en utilisant des galeries API (**Figure 2.6**).

Principe :

- Préparer une suspension bactérienne de 0,5 Mc-Farland (MF) à partir d'une culture pure (de 18 à 24h) d'une entérobactérie ou autre, dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique.
- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Noter les références de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer les galeries dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette pasteur, la suspension bactérienne préparée a été introduite dans les cupules de la galerie en évitant toute formation des bulles d'air.
- Pour les tests CIT, VP, GEL, les cupules doivent être remplies avec la suspension.
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, les cupules sont remplies d'huile de paraffine afin de favoriser une anaérobiose.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Après incubation, la lecture des réactions traduites par des virages colorés a été réalisée après l'ajout des additifs suivants : TDA, IND, VP1 et VP2.



Figure 2.6. Identification par système API20^E (Photo originale, 2019).

L'identification est effectuée par la suite à partir d'une base de données via un logiciel API d'identification (**Appendice I**).

2.4.6.1.2. Activité antimicrobienne

Trois méthodes différentes ont été employées pour la détermination *in vitro* de l'activité antimicrobienne : une technique de diffusion radiale par puits d'agar sur milieu solide, une méthode de dilution en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et une méthode de tissu en plaque (TCP) pour évaluer le potentiel anti-biofilm.

Antibiogramme /Aromatogramme

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de la solution antiseptique 2%, nous avons suivi la méthode des puits, technique standardisée par le **CLSI (2020)**. Une suspension bactérienne a été préparée dans 5ml d'eau physiologique et ajustée à 0,5 MF (10^8 UFC/ml) à partir d'une culture bactérienne de 24 h. Un écouvillon imbibé de la suspension a été ensemencé en surface sur le milieu de culture Muller Hinton (MH) dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Des trous circulaires de 0,6mm ont été creusés dans la gélose et remplis de 90 μ l de la solution antiseptique 2%. Des disques d'antibiotique de référence ont été utilisés pour le contrôle positif.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, l'activité antibactérienne a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

Une analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) a été réalisée (niveau de signification fixé à 5%) afin d'étudier l'homogénéité des zones d'inhibition semblables (**Appendice L**).

Technique de microdilution en milieu liquide

Des microplaques à fond U (Plaque à microtitration 96 puits) ont été utilisées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) [129]. Chaque cupule a été remplie par un volume de 50 μ l de bouillon BHIB à l'aide d'une micropipette réglable à embout stérile. Préalablement préparée, une concentration mère de 12,5 % de la solution antiseptique 2 % a été introduite dans le premier puits puis un volume de 50 μ l du mélange a été reporté d'une cupule à une autre, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 12,5 % jusqu'à 0,19 %. Une suspension bactérienne de 20 μ l a été inoculée. Les puits sans agent antimicrobien ont servi de témoin négatif. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture de la CMI se fait sur l'appréciation visuelle du dépôt de culture trouble observée sur le fond du puits. Elle correspond à la plus faible concentration en agent antibactérien capable d'inhiber la croissance bactérienne (**Figure 2.7**).

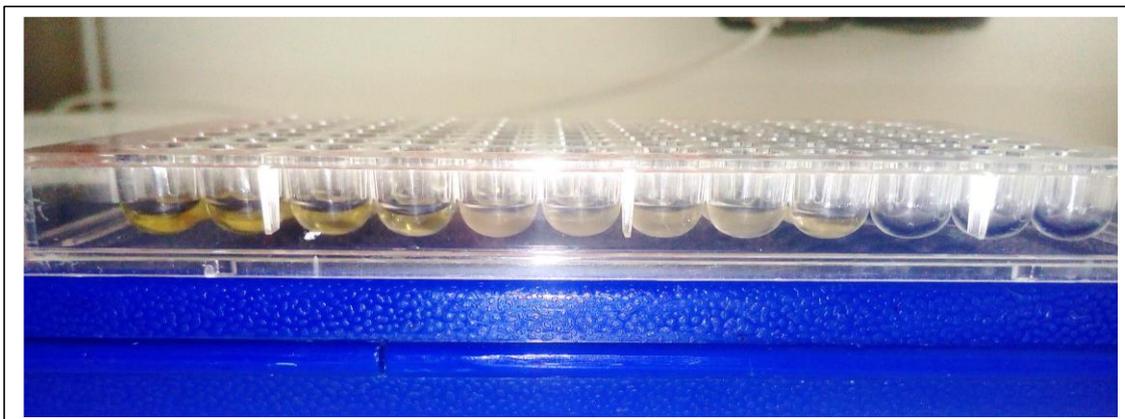


Figure 2.7. Technique de microdilution en milieu liquide (Photo originale, 2019).

✚ Antibiofilmogramme

Dans les infections ostéo-articulaires, il est important de connaître si toutes les souches de *Staphylococcus aureus* prélevées sont capables de former un biofilm pouvant contribuer à l'installation de l'infection sur le matériel d'ostéosynthèse (prothèse, fixateur externe, plaque vissée...).

Une méthode de détection de la production de biofilm *in vitro* a été établie : méthode de tissu en plaque (TCP).

➤ Technique de tissu en plaque (TCP)

La méthode consiste à déposer dans chaque puits de la microplaque un volume de 50µl de milieu de culture additionné à 50 µl de saccharose 2 % pour favoriser la croissance bactérienne et un volume de 20 µl d'une culture à 0,5 MF. Les puits non inoculés sont considérés comme témoin négatif. La microplaque de 96 puits a été par la suite incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, la phase planctonique a été retirée délicatement en lavant les puits quatre fois avec 20 µl de tampon phosphate salin (TPS pH 7,2). Les biofilms potentiellement formés par les micro-organismes sessiles ont été fixés par l'ajout de l'acétate de sodium 2 %. La révélation des cellules adhérentes au support de polystyrène (puits de la microplaque) a été réalisée par la méthode de Crystal Violet [130][131][132]. Afin d'éliminer toute

trace de colorant superficiel, la microplaque a été lavée avec de l'eau distillée stérile et laissée sécher à température ambiante.

La mesure qualitative de la production de biofilm a été fondée sur l'intensité de la couleur de la biomasse adhérente, sous forme d'un anneau de Crystal Violet tapissant la paroi ou d'un point visible recouvrant le fond du puits de la microplaque 96. Les scores de la formation de biofilm ont été notés comme suit :

- absence d'adhérence bactérienne : **(-)** ;
- cellules bactériennes faiblement adhérentes : **(+)** ;
- cellules bactériennes modérément adhérentes : **(++)** ;
- cellules bactériennes extrêmement adhérentes : **(+++)**.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois pour chaque souche bactérienne.

➤ **Évaluation du potentiel antibiofilm de la solution antiseptique 2 %**

Après avoir confirmé la capacité de former le biofilm par toutes les souches staphylocoques isolées. Le procédé a été effectué sur microplaque de 96 puits. Chaque cupule a été remplie par un volume de 50 µl de milieu de culture. Préalablement préparée, une concentration de 12,5 % de la solution antiseptique 2 % a été introduite dans le premier puits puis un volume de 50 µl du mélange a été reporté d'une cupule à une autre, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 12,5 jusqu'à 0,19 %. Une suspension bactérienne a été inoculée et additionnée de saccharose 2 %. Les puits sans agent antimicrobien ont servi de témoin négatif. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, le surnageant a été aspiré et les puits ont été lavés de la même manière précédemment décrite. La révélation d'adhérence cellulaire des bactéries fixées a été réalisée par la méthode de Crystal Violet pendant 45 minutes. Après lavage et séchage, la mesure quantitative de l'inhibition de la formation de biofilm a été fondée sur la plus faible concentration à partir de laquelle il y a absence d'une biomasse sous forme d'un point visible, coloré au centre du puits et/ou un anneau de Crystal Violet autour de la paroi, appelée concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB).

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antiseptique, un antibiogramme a été effectué en parallèle du test antibiofilm sur la totalité des souches *Staphylococcus aureus* prélevées. Des disques d'antibiotiques (Bio-Rad, France) ont

été utilisés comme témoin positif de la famille des β -lactamines : pénicilline (P), céfoxitine (Fox) et oxacilline (Ox), et des aminosides : amikacine (Ak) (**Tableau 2.3**).

Tableau 2.3. Disques d'antibiotiques testés

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge/disque
β -lactamines	Pénicilline (P)	10UI
	Céfoxitine (Fox)	30 μ g
	Oxacilline (Ox)	1 μ g
Aminosides	Amikacine (Ak)	30 μ g

La méthode de diffusion des disques sur milieu solide Mueller-Hinton a été réalisée selon la recommandation de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale [128]. Un écouvillon stérile a été introduit dans la suspension bactérienne préalablement préparée à 0,5 MF, puis ensemencé sur la gélose des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Des disques d'antibiotiques ont été déposés aseptiquement sur la surface de la gélose, et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, l'interprétation des résultats a été réalisée par la mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

2.4.6.2. Elaboration d'une crème dermique antifongique 2%

Une crème dermique antifongique 2 % a été formulée à base de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L., incorporé comme un principe actif dans la formulation.

Le procédé de fabrication a été inspiré des protocoles effectués au laboratoire Vague de fraîcheur dans la fabrication des crèmes à utilisation dermique.

- Sous une agitation magnétique, le Carbomer 980 a été solubilisé dans 50% de la quantité d'eau pour une meilleure consistance en ajoutant délicatement 2% de l'extrait éthanolique.

-Afin de préparer la phase huileuse, les excipients (Vaseline, Akypo, α -tocophérol) ont été liquéfiés à 75°C puis ajoutés au mélange tout en assurant l'homogénéité.

-Enfin, le conservateur, le parfum et le colorant ont été additionnés avec le reste de la quantité d'eau (20,29%). Différents essais ont été réalisés pour déterminer les quantités nécessaires des ingrédients à ajouter (**Tableau 2.4**).

Tableau 2.4. Composition de la crème dermique antifongique 2%.

Ingrédients	
Principe actif	Extrait éthanolique
Excipients	Vaseline
	Akypo
	α- tocophérol (vitamine E)
	Carbomer 980
	Conservateur
	Colorant + Parfum

La crème dermique antifongique 2% élaborée a été soumise à différents contrôles physico-chimiques, microbiologiques, test organoleptique, test de stabilité et d'homogénéité.

A. Contrôle physico-chimique

- Mesure du pH

À l'aide d'un pH-mètre, le potentiel hydrogène d'une quantité bien déterminée de la crème dermique antifongique 2 % a été mesuré.

- Test organoleptique

Un examen macroscopique de la solution antiseptique 2% a été réalisé, fondé sur différentes caractéristiques organoleptiques (Aspect - Couleur – Odeur - dureté, effet hydratant et adoucissant), le personnel de laboratoire de recherche et de développement a participé à l'appréciation de ce test.

- Test d'homogénéité

Afin de vérifier l'homogénéité de la crème formulée, une quantité a été introduite par étalement en couche mince sur une surface plane (paillasse du laboratoire), ou sur une feuille à l'aide d'une spatule. La feuille a été pliée, puis l'étalement a été effectué à nouveau en fine couche. L'absence des agrégats et la bonne répartition de la crème sur toute la surface indique que le produit formulé est parfaitement homogène .

- **Test de stabilité**

Une quantité de la crème élaborée a été introduite dans des tubes coniques et mise en centrifugation à 3000 tr / 10min. L'absence de la formation de deux phases hydrique et l'huileuse bien séparées et distinctes indique la bonne stabilité du produit en fonction de temps.

B. Contrôle microbiologique

Une quantité de polysorbate (Tween 80) a été additionnée à 1g de la crème dermique antifongique 2% formulée. La préparation des dilutions au 1/10^{ème} a été effectuée en mettant en suspension 1g de la crème 2% dans un milieu TSE. Le mélange a été agité quelques minutes.

La recherche et le dénombrement des micro-organismes spécifiés ont été réalisés par utilisation de certains milieux sélectifs de la même manière que la solution antiseptique 2%.

2.4.6.2.1. Etude clinique

Des prélèvements cliniques ont été réalisés sur des lésions unguéales (pieds/mains) et espace interorteils chez sept patients (Homme et femmes), âgés entre 30ans et 67ans atteints d'une onychopathie avec une hyperkératose et qui n'ont bénéficié d'aucun traitement antifongique avant d'effectuer l'examen mycologique.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un matériel stérile (lame de Bistouri) **(Appendice J)** par un simple grattage de la tablette sous-unguéale, basé préalablement sur la désinfection de l'ongle infecté et l'élimination de la partie distale : Onycholyse **[125]**. Les squames ont été recueillies en quantité suffisante dans une boîte de Pétri stérile puis sur une lame propre **[125] (Figure 2.8)**.

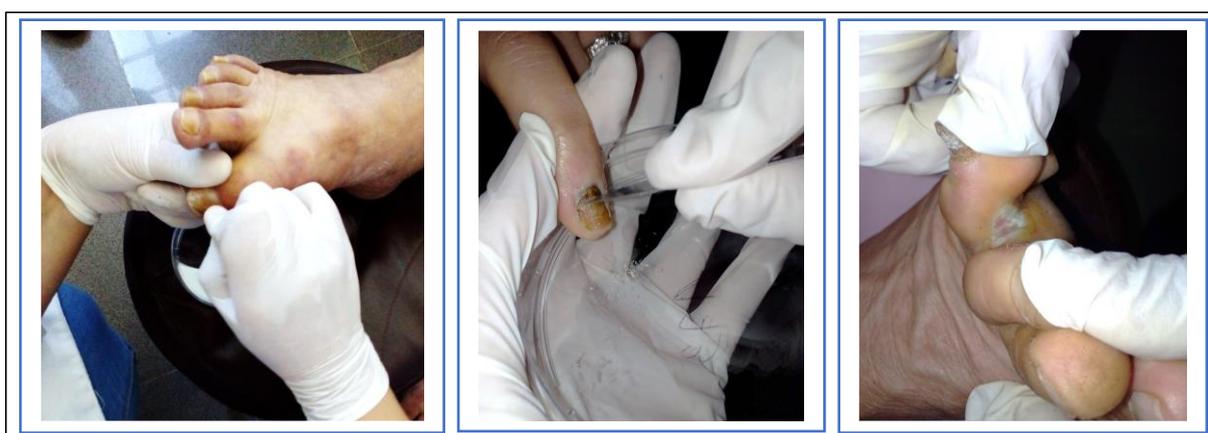


Figure 2.8. Prélèvements mycologiques (Photos originales, 2021).

- Examen direct

L'examen direct des squames des fragments des ongles infectés ou la poudre de la table sous unguéale a été effectué entre lame et lamelle par un simple frottement de l'écouvillon, additionnés d'une goutte de l'hydroxyde de potassium (KOH). Laisser agir 30 minutes et chauffer légèrement par passage à la flamme du bec Bunsen pour accélérer la réaction. Examiner au microscope optique en utilisant l'objectif (x40) **[133]**.

- Milieux d'isolement et ensemencement

Les prélèvements ont été ainsi mis en culture sur milieu Sabouraud, par un dépôt d'une quantité suffisante à la paroi des tubes et au centre de la boîte de Pétri, additionné d'antibiotiques et d'actidionne (cycloheximide) **[133]** pour limiter toute

croissance des moisissures pouvant ralentir la poussée des dermatophytes. Les tubes ensemencés ont été incubés à 27°C pendant une semaine jusqu'à un mois. Après incubation, la collecte des souches fongiques a été réalisée après identification, basée sur l'examen macroscopique des colonies, l'aspect microscopique (x40) de la morphologie du mycélium et les spores (présence ou absence des micros et macroconidies, mode de regroupement et disposition sur le mycélium) [134], ainsi que l'aspect des colonies fongiques (plâtreux, poudreux, cotonneux, glabre...etc.), la couleur des colonies en recto et en verso de la boîte et la diffusion d'une pigmentation sur le milieu pour certaines espèces.

- **Identification microscopique des dermatophytes**

Un fragment d'une colonie fongique a été déposé dans une goutte d'un révélateur (bleu de coton) dilué entre lame et lamelle, pour bien visualiser les conidiospores caractérisant les dermatophytes. L'observation microscopique a été effectuée sous microscope optique au grossissement (x 40).

Une autre technique d'identification a été adoptée dans le but de permettre la mise en évidence de la différenciation entre le *Trichophyton mentagrophytes* et le *Trichophyton rubrum*. Le test Urée Indole a été pratiqué en ensemencant des fragments de la culture sur milieu indole qui contient un indicateur de pH. Après 48h le virage de la couleur traduit l'alcalinisation du milieu suite à l'hydrolyse de l'urée [135] :

-*T. mentagrophytes* : **urée (+)**

-*T. rubrum* : **urée (-)**

2.4.6.2.2. Activité antidermatophyte

➤ Antifongigramme

La partie aérienne de chaque culture a été raclée et suspendue dans 5ml d'eau physiologique stérile. La méthode de diffusion a été réalisée sur milieu Sabouraud Chloramphénicol+ Actidionne. A l'aide d'un écouvillon stérile, les boîtes de Pétri ont étéensemencées avec la suspension fongique. Un volume de 0,1mm³ de la crème dermique antifongique 2% a été déposée aseptiquement au centre de la boîte de Pétri à l'aide d'une seringue stérile sans aiguille pour chaque culture. L'ensemble des boîtesensemencées a été incubé à 27°C pendant 5 à 7jours. Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculé par la formule suivante [136] :

$$I (\%) = (D \text{ test} / D \text{ boîte}) \times 100$$

Avec :

I (%) = Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique

D test = Diamètre de la zone d'inhibition (mm)

D boîte = Diamètre de la boîte de Pétri (mm)

Afin de connaître si la solution antiseptique 2% préparée et testée pour l'activité antibactérienne a un potentiel antifongique. Nous avons testé au préalable son activité antidermatophytique et anticandidosique.

La solution antiseptique 2% a été testées contre 7 souches dermatophytiques du genre *Trichophyton* et *Microsporum*

Le milieu gélosé Sabouraud chloramphénicol + Actidionne a été liquéfié à 95°C puis coulé dans les boîtes de Pétri en même temps que la solution antiseptique 2%, de sorte que cette dernière soit incorporée et mélangée avec le milieu. Les boîtes de Pétri ont été laissées sur la paillasse à température ambiante. Après refroidissement, les milieux de culture ont étéensemencés. Les boîtes sans traitement antifongique servaient de témoin positif. L'ensemencement des souches a été réalisé avec la même quantité du mycélium pour chaque souche (les boîtes contenant la solution antifongique 2% et les boîtes témoins). Les boîtesensemencées (témoins et testées) ont été incubées dans une étuve à 27°C pendant 5 à 7 jours.

Après le temps approprié d'incubation, le diamètre des différentes colonies pour les souches témoins et les souches testées de chaque espèce a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

Avec :

$$I (\%) = [(dC - dE) / dC] \times 100$$

I (%) : taux d'inhibition de la croissance mycélienne exprimé en pourcentage (%).

dC : le diamètre des colonies dans les boites témoins (mm).

dE : le diamètre des colonies dans les boites testées à l'antifongique (mm).

Selon **Hassikou et al., [137]**, un antifongique est dit :

- ❖ **Très actif**, lorsqu'il possède un taux d'inhibition compris entre 75% et 100% et la souche fongique est dite très sensible,
- ❖ **Actif**, lorsqu'il possède un taux d'inhibition compris entre 50% et 75% et la souche fongique est dite sensible,
- ❖ **Peu actif** à 50%, la souche est dite intermédiaire,
- ❖ **Inactif** lorsqu'il possède une inhibition inférieure à 50%, la souche est dite résistante.

2.4.6.2.3. Activité anticandidosique

Des prélèvements cliniques ont été réalisés sur des lésions unguéales (pieds/mains) et espace inter-orteils chez sept patients (Homme et femmes) âgés de 19 mois et 67ans, victimes d'une onychopathie avec une hyperkératose. L'ensemble des patients n'ont bénéficié d'aucun traitement antifongique.

Les prélèvements, l'examen direct et l'ensemencement ont été réalisés de la même manière que précédemment.

- **Identification des levures**

L'identification des levures a été basée sur l'examen macroscopique des colonies et l'examen microscopique entre lame et lamelle révélée par le bleu de coton, et examiné au microscope optique (x40).

Pour la différenciation entre *Candida albicans* et *non-albicans*, on procède au test de Blastèse (test de filamentation) [138] :

Principe :

- Répartir 500µl du sérum dans un tube à hémolyse,
- Ensemencer la souche à tester prélevée à l'anse de platine pour obtenir une suspension d'opacité légère,
- Incuber le tube à l'étuve à 37 °C pendant à 4 heures,
- Déposer une goutte de la suspension entre lame et lamelle,
- Examiner au microscope optique (x40).

En cas de test de blastèse positif, la recherche de chlamydospores et d'un tube germinatif permettait de distinguer *Candida albicans* en comparaison avec le témoin négatif.

Pour identifier *Candida albicans*. Le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance positive des levures a été visualisée par le virage d'un indicateur de pH (**Appendice K**).

Afin d'évaluer l'activité anticandidosique de la solution antiseptique 2%, 9 souches de *Candida* ont été testées en comparaison avec trois traitements antifongiques conventionnels (Terbidal, Loceryl et Econazol 1%) (**Appendice J**). Une concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF) a été évaluée.

La méthode des puits a été inspirée d'une technique standardisée par le **CLSI [128]**, pour l'évaluation du potentiel anticandidosique de la solution antiseptique 2%. Une suspension a été préparée dans 5ml d'eau physiologique à partir d'une culture de 48 h. Un écouvillon imbibé de la suspension a été ensemencé en surface sur le milieu de culture gélosé Sabouraud Chloramphénicol dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Des trous circulaires de 0,6mm ont été creusés dans la gélose et remplis de la solution antiseptique 2%. Des traitements antifongiques ont été testés en parallèle, utilisés comme contrôle positif.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 27°C pendant 48 h. Après incubation, l'activité anticandidosique a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

Une analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) a été réalisée (niveau de signification fixé à 5%) afin de comparer l'efficacité des produits (**Appendice L**).

➤ **Technique de microdilution en milieu liquide**

Des microplaques à fond U (Plaque à microtitration 96 puits) ont été utilisées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) [129]. À l'aide d'une micropipette réglable à embout stérile, chaque cupule a été remplie par un volume de 50 µl de bouillon BHIB. Préalablement préparée, une concentration mère de 12,5 % de la solution antiseptique 2 % a été introduite dans le premier puits puis un volume de 50 µl du mélange a été reporté d'une cupule à une autre, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 12,5 % jusqu'à 0,19 %. Une suspension de la souche *Candida* de 20µl a été inoculée. Les puits sans agent antifongique ont servi de témoin négatif. Les microplaques ont été incubées à 27°C pendant 48h.

Après incubation, la lecture de la CMI a été réalisée sur l'appréciation visuelle du dépôt de culture trouble observée sur le fond du puits. Elle correspond à la plus faible concentration en agent antifongique capable d'inhiber la croissance fongique.

La détermination du profil (fongicide/fongistatique) nécessite l'ensemencement en stries des contenus des puits ayant une concentration supérieure ou égale à la CMI, transférés sur un milieu de culture. L'incubation des boîtes de Pétri a lieu à 27°C pendant 48h.

La CMF désigne la plus faible concentration du produit antimicrobien pour lequel il y'a absence totale de croissance des colonies.

Si :

CMF/ CMI \leq 4 = profil fongicide

CMF/CMI \geq 4 = profil fongistatique

2.4.6.3. Elaboration d'une pâte dentifrice, bain de bouche et solution d'irrigation

Formulation d'une pâte dentifrice

La méthode de préparation de la pâte dentifrice a été effectuée selon les étapes suivantes validée par AFNOR :

Une pâte dentifrice se compose essentiellement d'un solvant : l'eau purifiée, d'excipients, et de substances actives (**Tableau 2.5**).

Les excipients donnent à la préparation ses propriétés galéniques, la rendent agréable d'utilisation et participent au nettoyage des dents.

Tableau 2.5. Composition de la pâte dentifrice formulée à base d'extrait de Siwak

	Composition	Fonction
Phase A	Benzoate de Sodium	Conservateur
	Sorbitol	Humectant
Phase B	Extrait des écorces des jeunes rameaux (Siwak)	Principe actif
	Saccharinate de sodium	Adoucissant
	Sodium fluoride	Antitartre
	Eau déminéralisée	/
Phase C	Silice de reubourg	Abrasif
	Silice coloïdale précipitée	Abrasif
	Oxyde de titane	Agent blanchissant
	Texapon n70	Tensioactif
	Arôme	/

- Préparation du mélange **A** : sous une forte agitation, le benzoate de sodium a été dissout dans le sorbitol liquide.
- Préparation du mélange **B** : tous les additifs présents dans le tableau 2.5 ont été dissouts dans l'eau et agités pendant 10 min.
- le mélange **B** a été ajouté à la phase **A** sous une agitation maintenue pendant 45min jusqu'à l'obtention d'un gel homogène.
- Ensuite, la phase **C** a été ajoutée progressivement dans le mélange (**A+B**) et le tout a été remué légèrement pendant 30min (**Figure 2.9**).

- l'arôme a été ajouté à la fin de la préparation sous agitation pendant 5min.



Figure 2.9. Formulation de la pâte dentifrice à base d'extrait de Siwak
(Photos originales, 2020).

✚ Formulation de bain de bouche

La méthode de préparation d'un bain de bouche a été réalisée suivant le protocole de fabrication CRODA :

Dans un bécher, la quantité d'eau a été mélangée avec la glycérine 10% et l'Akypo sous une agitation magnétique. L'éthanol et le Triclosan ont été additionnés en seconde temps avec 1% de l'extrait de Siwak (**Figure 2.10**). A la fin de la préparation, 0,2% de l'arôme de Menthe a été ajoutée pour aromatiser le bain de bouche (**Tableau 2.6**).



Figure 2.10. Formulation bain de bouche (Photo originale, 2020).

Tableau 2.6. Composition de bain de bouche à base d'extrait de Siwak

Ingrédients	
Principe actif	Extrait des écorces des jeunes rameaux
Excipients	Eau déminéralisée
	Glycérine
	Akypo
	Ethanol
	Triclosan
	Arôme

Elaboration d'une solution d'irrigation SI

La solution d'irrigation testée dans les traitements endodontiques a été formulée par une simple dilution de l'extrait de Siwak dans l'éthanol à raison d'une concentration de 20%.

L'ensemble des trois derniers produits, (pâte dentifrice, bain de bouche et la solution d'irrigation SI) destinés au potentiel antimicrobien et l'hygiène dentaire a été soumis à un contrôle physicochimique et microbiologique, de la même manière que précédemment.

2.4.6.3.1. Activité anticariogène

Des prélèvements cliniques ont été réalisés chez 8 patients (Homme / femme), recrutés au niveau du service de stomatologie, clinique Zabana, CHU Blida. Les différents prélèvements ont été effectués par écouvillonnage et les échantillons ont été immédiatement transportés au laboratoire.

Les prélèvements ont été ensemencés sur milieu gélose au sang cuit (GSC), pour la recherche des *Streptocoques* oraux, en utilisant la technique de quadrant. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C en anaérobiose en présence de 5% de CO₂ pendant 24h.

- Isolement et identification

Après incubation, le diagnostic du genre et l'espèce des bactéries dans la culture positive repose sur l'étude des caractères biochimiques d'orientation à la

recherche des enzymes respiratoires (test de catalase et oxydase), de la coloration de Gram, ainsi sur l'identification microbiologique en utilisant des galeries API 20^{strep} qui est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, *entérocoques*.

- La galerie API 20^{strep} comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.
- Une suspension bactérienne de 0.5 Mc-Farland (MF) a été préparée à partir d'une culture pure (24h) d'un streptocoque ou autre, dans un tube contenant 2ml d'eau physiologique.
- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Noter les références de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer les galeries dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette pasteur, la suspension bactérienne préparée a été introduite dans les cupules : Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH), la suspension a été répartie en évitant la formation de bulles :
 - Pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule ;
 - Pour les tests ADH : remplir uniquement le tube.
 Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RiB à GLYG) :
 - Le reste de la suspension a été transférée dans une ampoule d'APIGP Medium, soit environ 0,5 ml et cette nouvelle suspension a été répartie dans les tubes uniquement.
- Les cupules des tests soulignés **ADH** à **GLYG** ont été recouvertes avec de l'huile de paraffine puis la boîte a été destinée à l'incubation à 37°C en anaérobiose pendant 24h.

Lecture de la galerie :

Après 24 heures d'incubation, les réactifs suivants ont été ajoutés :

- test VP : 1 goutte de VP1 et VP2
- test HiP : 2 gouttes de NIN
- test PYRA, α-GAL, β-GUR, β-GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B.

Après 10 mn, la lecture est effectuée en se référant au tableau de lecture.

Réaction positive = (+)	Réaction négative = (-)
-------------------------	-------------------------

L'identification est effectuée par la suite à partir d'une base de données via un logiciel API d'identification (**Appendice I**).

a) Aromatogramme (pâte dentifrice+ bain de bouche)

Afin d'évaluer le potentiel antimicrobien de la pâte dentifrice et le bain de bouche. Une suspension bactérienne a été préparée dans 2ml d'eau physiologique et ajustée à 0,5 MF (10^8 UFC/ml) à partir d'une culture bactérienne de 24 h. Un écouvillon imbibé de la suspension a été ensemencé en surface sur le milieu de culture gélose au sang cuit (GSC). Un volume de $0,1\text{mm}^3$ de la pâte dentifrice a été déposé aseptiquement au centre de la boîte à l'aide d'une seringue stérile sans aiguille pour chaque culture. En parallèle, des trous circulaires de 0.6mm ont été creusés dans la gélose et remplis de 90 μl de la solution bain de bouche, ainsi qu'un antibiotique prescrit généralement dans les infections dentaires : Bi-orogil (Spiramycine + Métronidazole) préparé en solution à une concentration mesurée de 0,2g/ml. Des disques d'antibiotique d'Amoxicilline (AMX) ont été utilisés comme contrôle positif.

Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobiose, en présence de 5% de CO₂ à 37°C pendant 24 h. A la fin de l'incubation, l'activité antibactérienne a été notée en mesurant la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Le potentiel anticariogène a été réalisé aussi afin d'évaluer la solution d'irrigation (SI) dans les traitements endodontiques *in vitro*, vis-à-vis d'une souche *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), conservée au laboratoire de bactériologie.

Une analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) a été réalisé (niveau de signification fixé à 5%) afin de comparer l'efficacité des deux produits (**Appendice L**).

b) Test de microdilution de la SI

Une microplaque à fond U (Plaque à microtitration 96 puits) a été utilisée pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) [129]. À l'aide d'une micropipette réglable à embout stérile, chaque cupule a été remplie par un volume de 50 μl de bouillon de Müller Hinton (MH). Préalablement préparée, une concentration mère de 150 % de la solution d'irrigation (SI) a été introduite dans le premier puits puis

un volume de 50 µl du mélange a été reporté d'une cupule à une autre, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 150 % jusqu'à 2,34 %. Une suspension bactérienne de 20µl a été inoculée. Les puits sans agent antimicrobien ont servi de témoin négatif. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24h.

Après incubation, la lecture de la CMI a été réalisée sur l'appréciation visuelle du dépôt de culture trouble observée sur le fond du puits. Elle correspond à la plus faible concentration en agent antibactérien capable d'inhiber la croissance bactérienne.

La détermination du profil (bactéricide/bactériostatique) nécessite l'ensemencement en stries des contenus des puits ayant une concentration supérieure ou égale à la CMI, transférés sur une gélose nutritive. L'incubation des boîtes de Pétri a lieu à 37°C pendant 24h.

La concentration minimale bactéricide (CMB) désigne la plus faible concentration du produit antimicrobien pour lequel il y'a absence totale de croissance des colonies.

Si :

CMB/ CMI \leq 4 = profil bactéricide

CMB/ CMI \geq 4 = profil bactériostatique

c) Checkerboard assay test technique de potentialisation de l'activité par recherche de synergie

Ce test a pour objectif d'estimer s'il y a des interactions positives ou négatives de la solution d'irrigation (SI) formulée à base de Siwak avec les désinfectants les plus utilisés dans les soins endodontiques, et également d'affirmer ou infirmer l'effet *in vitro*.

La technique de potentialisation de l'activité par recherche de synergie d'association permet de quantifier l'interaction de deux produits antibactériens, en réalisant l'association d'une gamme de concentration du produit **A** et du produit **B**.

La recherche de la synergie entre la (SI) et la (SI de références) vis-à-vis de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) a été réalisée selon la méthode modifiée de **Vitale et al.**, [139]. Sept concentrations de la SI à base de Siwak et l'agent antimicrobien, soit le NaOCl, ont été préparées suivant des dilutions 1/2. Les

concentrations de la (SI) ont été introduites horizontalement dans sept puits d'une façon décroissante. Tandis que les concentrations de l'antiseptique sont introduites verticalement dans sept puits d'une façon décroissante (**Figure 2.11**).

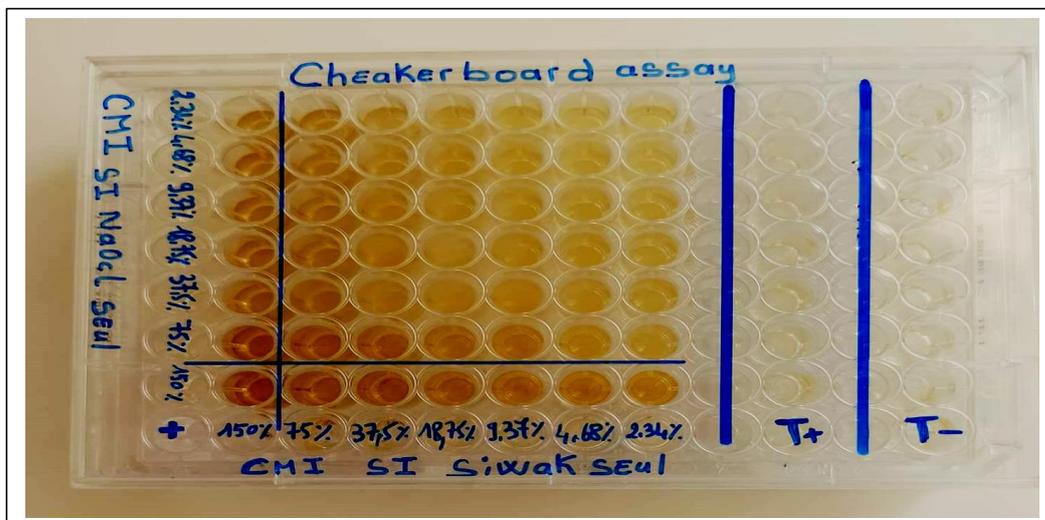


Figure 2.11. Test de l'échiquier de microdilution (Photo originale, 2021).

Après incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h, l'interprétation des résultats est réalisée en calculant la concentration fractionnelle inhibitrice (CFI).

$$\text{CFI} = \text{CFI de l'agent 1} + \text{CFI de l'agent 2}.$$

CFI des agents 1 ou 2 se calcule comme suit :

$$\text{CFI d'agent 1} = \text{CMI de la combinaison} / \text{CMI d'agent 1}.$$

$$\text{CFI d'agent 2} = \text{CMI de la combinaison} / \text{CMI d'agent 2}.$$

La signification des CFIs est déterminée comme suit [139] :

- $\text{CFI} \leq 0,5$: cas de synergie,
- $0,5 \leq \text{CFI} \leq 4$: pas d'interaction entre les deux agents antimicrobiens,
- $\text{CFI} \geq 4$: cas d'antagonisme.

d) Evaluation des solutions d'irrigation préparées

Dans le but de l'évaluation d'une solution d'irrigation préparée à base d'extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux, une expérience *in vitro* semblable aux traitements endodontiques a été effectuée sur des tubes Eppendorf contaminés par des biofilms de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Le Protocole utilisé est celui d'une étude réalisée par **Cheow et al.,[140]**, avec quelques modifications :

- 1) Formation des biofilm de *Enterococcus faecalis* sur des tubes Eppendorf,
- 2) Traitement par les solutions d'irrigation (SI formulée et SI de référence),
- 3) Détermination de l'efficacité de l'irrigation selon la réduction décimale des cellules viables (réalisée par dénombrement à l'œil nu).

La capacité de formation des biofilms chez la souche utilisée dans cette expérimentation a été vérifiée par la méthode en tube Eppendorf.

1) Formation de biofilm

Les biofilms de *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) ont été formés dans des tubes Eppendorf de polypropylène de 1,5 ml. Dans un premier temps, les tubes Eppendorf ont été remplis par 500µl de suspensions bactérienne de *Enterococcus faecalis* à 0,5 MF, puis incubés à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, les tubes Eppendorf ont été vidés et rincés trois fois par tampon phosphate salin (PBS), remplis par du bouillon stérile Müller–Hilton liquide (MHL) puis ré-incubés pendant 24 h dans les mêmes conditions. L'opération a été répétée deux fois pour obtenir à la fin des biofilms matures de 72 h dans les tubes Eppendorf.

2) Traitement par les solutions d'irrigation

Après obtention des biofilms matures dans les tubes Eppendorf (utilisés comme étant des racines dentaires infectées), l'irrigation *in vitro* a été réalisée par remplissage de ces tubes sans agitation par 750 µl des solutions d'irrigations testées (SI à base de Siwak et témoin). Après des contacts de durées déterminées, respectivement de 30 secondes, une minute et cinq minutes, les solutions d'irrigations sont aspirées et les tubes sont ensuite bien rincés trois fois à l'aide d'un tampon phosphate salin (PBS). Après rinçage, les tubes sont remplis par 1 ml d'eau physiologique stérile (**Figure2.12**)

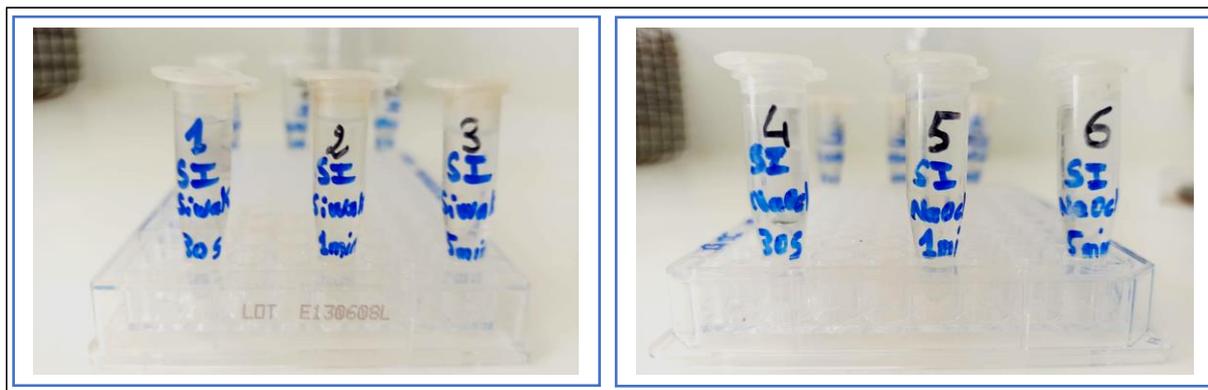


Figure 2.12. Traitement par les solutions d'irrigation (Photos originales, 2021).

3) Détermination de l'efficacité de l'irrigation selon la réduction décimale des cellules viables

Au cours de la troisième étape, les tubes Eppendorf (remplis par 1 ml d'eau physiologique) sont introduits dans un appareil ultrason dans le but de récupérer les cellules de *Enterococcus faecalis* à partir des biofilms. Les cellules récupérées ont été ensemencées par la technique de râteau sur gélose nutritive, puis incubées à 37°C pendant 24h. Leur dénombrement est déterminé par leur réduction décimale Log UFC/ml.

2.4.6.4. Innocuité cutanée de la crème dermique antifongique 2%

Afin de tester la tolérance cutanée chez l'homme de la crème antifongique élaborée, le Patch test humain a été effectué chez 26 personnes volontaires (18 femmes et 8 hommes), leur âge varie entre 12-72 ans, par application topique de la crème antifongique formulée sous patch au niveau du pli du coude (**Figure 2.13**).

Pour évaluer la présence d'éventuelles réactions cutanées au retrait du patch, les tests sont lus après 24h, 48h et 96h. La première lecture a lieu 30 min après le retrait du patch test, [141].



Figure 2.13. Application cutanée de la crème dermique antifongique 2% (Photos originales, 2021).

Les résultats sont interprétés selon les critères établis par « **International Contact Dermatitis Research Group** » (ICDRG) suivants :

- (-)** : négatif ; absence de réaction,
- (+)** : réaction positive faible ; érythème,
- (++)** : réaction fortement positive ; érythème, œdème et vésicules bien visibles,
- (+++)** : réaction violemment positive et vésicules bien visibles,
- IR** : irritant

2.4.6.5. Cytotoxicité érythrocytaire (myéloïde) *in cellulo*

Une étude de la stabilisation de la membrane cytoplasmique des globules rouges humain vis-à-vis de l'attaque par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisée *in cellulo* pour connaître l'effet protecteur des extraits (feuilles et écorces) incorporés comme principes actifs dans la formulation-de Cinq (05) produits valorisés.

L'effet protecteur des extraits a été déterminé selon le protocole décrit par **CHehtit-Hacid [142]** ; **Alinezhad et al.,[143]** et **Ebrahimzadeh et al.,[144]**.

Préparation des érythrocytes

Du sang frais est collecté par ponction de la veine antécubitale d'un volontaire sain n'ayant pas pris d'anti-inflammatoire au cours des 48h précédant le prélèvement. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes héparinés puis centrifugé à 1500 g pendant 10 min. Le surnageant constitué de plasma, de plaquettes et de la couche de globules blancs a été délicatement ôté au moyen d'une micropipette. Les érythrocytes contenus dans le culot ont été repris dans le tampon PBS (pH=7,4). Après mélange par retournement, les échantillons ont été à nouveau centrifugés à 1500 g pendant 10 min et le surnageant a été éliminé à l'aide d'une micropipette. Le lavage du culot a été répété 3 fois dans les mêmes conditions. Les érythrocytes lavés sont ré-suspendus dans le PBS (1 /1), (v/v) et seront conservés à 4° C dans les limites de 6 heures de leur préparation.

2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait (feuilles - écorces), d'une solution isotonique (NaCl 0,9%) utilisée comme témoin négatif et d'une solution vitaminique (acide ascorbique), puis les solutions ont été diluées en les complétant avec le PBS jusqu'à avoir 5 ml dans chaque tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 ml de H₂O₂ à 1M préparés dans du PBS ont été ajoutés à la suspension érythrocytaire comme témoin positif pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes (solution hypotonique) (**Figure 2.14**). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37° C.



Figure 2.14. Préparation des mélanges réactionnels avec la solution érythrocytaire (Photos originales, 2021).

Après incubation, des frottis sanguins de différents échantillons et du témoin positif ont été effectués. La forme normale des globules rouges observée sous microscope assure l'absence d'un effet cytotoxique des extraits comparativement au contrôle positif.

✚ Confection du frottis sanguins

La réalisation manuelle d'un frottis sanguin se fait en plusieurs étapes :

- ✓ déposer une goutte de sang à 1 cm de l'extrémité de la lame,
- ✓ faire glisser la seconde lame à étalement inclinée de 45° vers la goutte de sang jusqu'à la toucher,
- ✓ laisser s'étaler la goutte de sang le long de l'arête de la lame à étalement,
- ✓ glisser la lame en tirant ou en poussant : tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame. Le mouvement doit être rapide, régulier, sans trop appuyer, en maintenant la même inclinaison.

✚ Coloration MGG des frottis

Étapes pré-analytiques : Les frottis sanguins en couche mince doivent être séchés immédiatement après leur réalisation par agitation à l'air ou ventilation sous hotte chimique pendant 3 à 10min.

➤ **Premier temps : fixation par May-Grünwald pur :**

On verse un certain volume de réactif May-Grünwald, nécessaire pour que les frottis soient entièrement couverts puis laisser réagir 3 à 10 min.

➤ **Deuxième temps : coloration par la solution Giemsa :**

On élimine le réactif May-Grünwald dilué puis sans les laver, on passe les lames dans la solution de Giemsa pendant une durée de 10 jusqu'à 45 min. Les frottis sont ensuite lavés sous un fort courant d'eau pendant 1 à 2 minutes puis séchés.

Une étude de la morphologie de la lignée myéloïde (globules rouges) a été effectuée à fort grossissement sous microscope optique (x100).

2.4.6.6. Cytotoxicité lymphoïde *in cellulo*

Deux modèles cellulaires immunitaires ont été choisis afin d'évaluer l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire : les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes. Ces derniers sont extraits de divers liquides biologiques des patients hospitalisés dans différents services (**Figure 2.15**) :

Les différents liquides biologiques ont été choisis selon certains critères :

✚ **Liquide Céphalorachidien (LCR) :**

Aspect : liquide citrin

Examen cytologique : présence de 80% des polynucléaires dans l'échantillon.

✚ **Liquide d'ascite :**

Aspect : liquide jaunâtre

Examen cytologique : présence de 100% des lymphocytes dans l'échantillon.

✚ **Liquide articulaire :**

Aspect purulent

Examen cytologique : présence de 95% des polynucléaires dans l'échantillon.

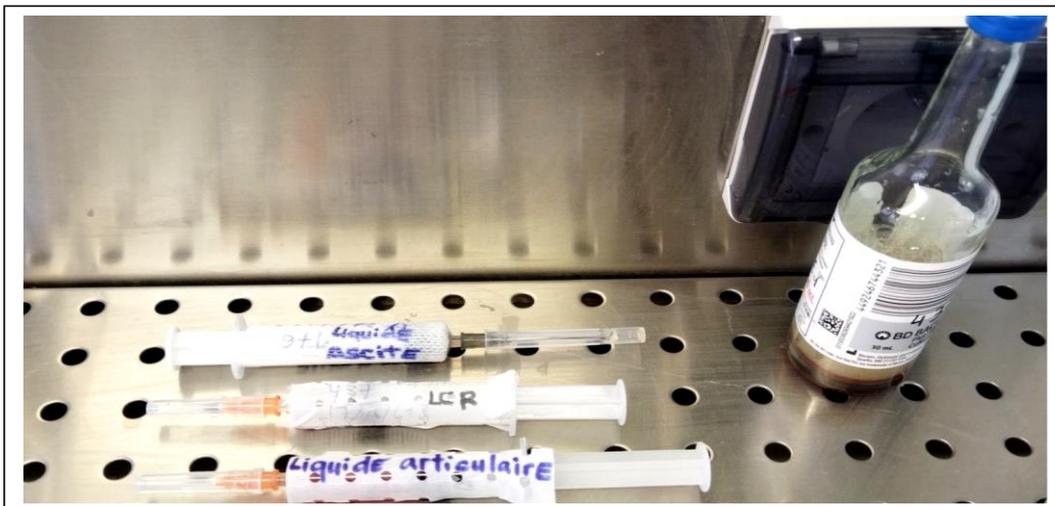


Figure 2.15. Echantillons des liquides de ponction (Photo originale, 2021).

Les différents échantillons (liquides biologiques) ont été mis en contact avec les deux extraits éthanoliques (feuilles et écorces) préparés à des concentrations croissantes (250mg/ml, 500mg/ml, 1000mg/ml et 2000mg/ml). Les lignées cellulaires traitées ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 1h. Après incubation, une coloration de bleu de méthylène est réalisée (**Figure 2.16**).

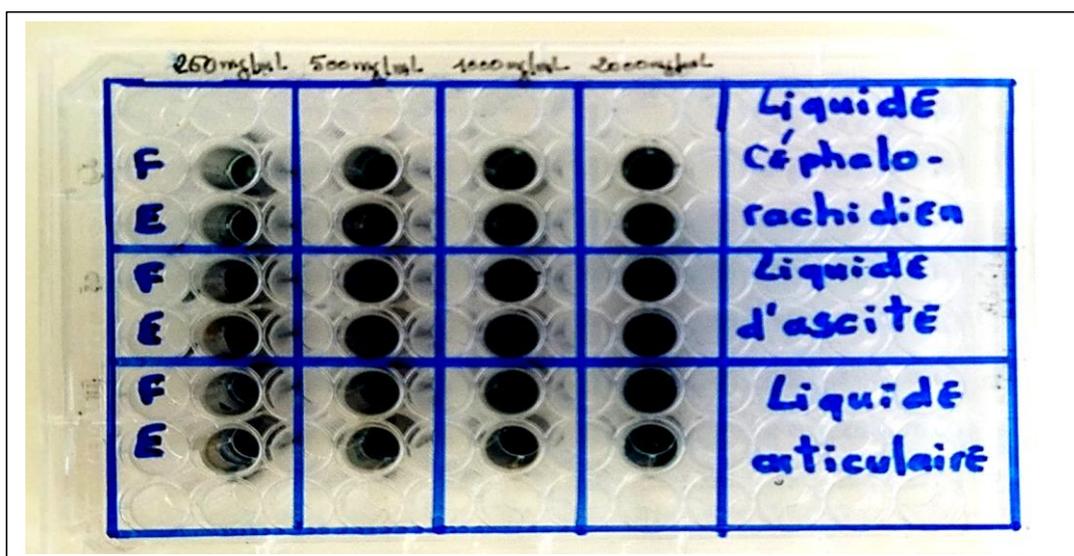


Figure 2.16. Test de viabilité cellulaire (Photo originale, 2021).

F : Feuilles E : Ecorces

Un volume de 20µl de chaque échantillon a été déposé sur une lame de MALASSEZ. Sous microscope optique, les cellules mortes (granulocytes et lymphocytes) apparaissent colorées en bleu foncé suite à la pénétration irréversible du colorant, contrairement aux cellules vivantes qui restent incolores. Sur un champ de 100 cellules, les cellules vivantes non colorées ont été dénombrées.

2.4.6.7. Activité antioxydante *in vitro*

Plusieurs recherches ont montré l'intérêt antioxydant pharmacologique puissant de l'utilisation de *Juglans regia* L. . En effet, des essais *in vitro* par plusieurs méthodes ont dévoilé l'effet des feuilles de noyer contre les radicaux libres vus leur richesse en composés phénoliques [14].

La capacité des extraits à réduire les radicaux libres de la DPPH a été déterminée par la méthode spectrophotométrique décrite par **Rakiatou [145]**. Les antioxydants réduisent le radical DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) ayant une couleur violette en un composé jaune (diphénylpicryl-hydrazine) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [146].

Pour cela, une solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 25 µl des solutions d'extraits éthanoliques et de l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique) sont ajoutés à 975 µl de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc d'éthanol. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal d'éthanol.

L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

- **Ac** : Absorbance à 517 nm du contrôle.
- **At** : Absorbance à 517 nm de l'extrait testé.

La valeur EC50 (appelée aussi IC 50) a été déterminée pour chaque extrait, est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle.

Les valeurs EC50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage [147].

Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée via un logiciel statistique (SPSS Statistics). Dans cette analyse, la comparaison entre l'effet antibactérien des produits valorisés à base des extraits éthanoliques de *Juglans regia* L. et les produits alternatifs, ainsi que l'effet antifongique et anticariogène, est basée sur le test ANOVA (Analysis of variance), avec un seuil de signification $\alpha=0.05\%$:

- Si $p>0.05$: la différence est non significative.
- Si $p<0.05$: la différence est significative.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement d'extraction

Les résultats du rendement sont consignés dans le **tableau 3.1**.

Les extraits éthanoliques obtenus par la macération de la poudre des feuilles et des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. sont caractérisés par deux couleurs vert foncé et jaune foncé respectivement et présentent un aspect visqueux.

Tableau 3.1. Aspect, couleur et rendement des extraits éthanoliques de *Juglans regia* L.

Extraits éthanoliques	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Extrait des feuilles (F)	Visqueux	Vert foncé	13,33
Extrait des écorces (E)	Visqueux	Jaune foncé	25,37

Le déroulement de l'extraction par macération à température ambiante permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou leur modification probable due aux températures élevées, utilisées dans d'autres méthodes d'extraction à chaud [148].

Les résultats obtenus montrent qu'il y'a une différence de couleur entre les différents extraits de feuilles d'écorces, cela dépend probablement de la nature des composés organiques contenus dans les extraits. Les deux extraits ont un aspect visqueux à solide ceci est due à l'absence presque totale des acides gras et des huiles qui sont remplacés par des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des saponines, selon le degré de solubilité de chaque composé organique [149].

Les résultats du rendement ont montré que l'extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. a présenté un rendement plus élevé (25,22%) par rapport au rendement de l'extrait éthanolique des feuilles.

Divers travaux sur *Juglans regia* L. ont rapporté des rendements d'extraction différents. D'après **Diem Do et al., [150]**, le rendement d'extrait méthanolique des feuilles est plus faible que celui de l'extrait méthanolique des écorces. Ceci suggère que les composés bioactifs contenus dans les feuilles et les écorces ont des structures chimiques différentes.

D'une manière générale, les rendements des extraits varient en fonction de plusieurs paramètres tels que : le solvant, la température d'extraction et la composition de l'échantillon **[150]**.

Upadhyay [151] et Raja [152], ont constaté, dans leurs études respectives que le rendement d'extraction des écorces (11%) est meilleur par le méthanol par rapport aux feuilles.

3.2. Résultats de l'étude phytochimique

3.2.1. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique, basé sur des réactions de la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration, s'explique soit par la turbidité, la formation de mousse ou bien par la disparition de couleur qui est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée (**Appendice E**).

Les variations rencontrées dans la composition chimique des feuilles et des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 3.2. Criblage par réactions chimiques

Groupes chimiques	Indicateur (réaction positive)	Feuilles	Ecorces
Coumarines	Apparition d'un trouble	++	++
Tanins galliques	Coloration bleue qui vire au brun noir intense	+++	+++
Flavonoïdes	Incolore	++++	+++
Saponines	Indice de mousse	+++	++++
Quinones	Coloration rouge violette	+++	+++

Réaction fortement positive : ++++ ; Réaction positive : +++ ; Réaction moyennement positive : ++

Les résultats obtenus, indiquent que les feuilles et les écorces de Noyer sont très riches en tanins, en flavonoïdes, en quinones et en saponines. Les coumarines sont présentes mais en quantité moyenne.

La richesse des feuilles de Noyer en métabolites secondaires leur confère des propriétés pharmacologiques importantes, d'où leur utilisation en médecine traditionnelle [153][154].

Les résultats trouvés sur les extraits aqueux sont conformes à celles faites par **Shah et al., [155]** sur divers extraits (méthanoliques, cétoniques, benzéniques et aqueux) de feuilles de noyer ont révélé la présence de nombreux métabolites secondaires.

Les essais phytochimiques effectués sur l'écorce de *Juglans regia* ont révélé la présence de plusieurs constituants phytochimiques avec des concentrations élevées en saponines, ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans l'étude de **Raja [152]**.

Les écorces de *Juglans regia* sont plus riches en constituants phytochimiques que les feuilles, ceci est due probablement aux types d'organes traités. Cette richesse en composés bioactives explique l'utilisation des écorces dans la médecine traditionnelle et spécialement dans l'hygiène orale par rapport à l'utilisation des feuilles [151][156].

En comparaison avec les résultats rapportés par **Akbari et al., [157]**, la teneur en flavonoïdes des péricarpes se trouve élevée avec un taux estimé 10,69 mg EC/100g de PS par rapport à 0,347mgEC/100g MS trouvé par **Rywaniak et al., [158]**.

Par ailleurs, les résultats montrent, que les deux parties aériennes étudiées sont très riches en tanins galliques (réaction très positive), ce qui est en accord avec les travaux de **Fukuda et al., [159]**.

Une étude réalisée en Inde sur le criblage phytochimique des extraits bruts des feuilles de *Juglans regia* L. a révélé la présence d'hydrates de carbone, de glycosides cardiaques, de composés phénoliques, de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de protéines, de stéroïdes et de tanin [155].

3.2.2. Caractérisation des composés phénoliques

A l'issu des résultats du dosage spectrophotométrique des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, qui ont montré une présence prépondérante en composés phénoliques, des analyses chromatographiques quantitatives et qualitatives par HPLC de quelques acides phénoliques et flavonoïdes ont été envisagées.

Au total, 20 composés phénoliques ont été identifiés pour chaque extrait éthanolique. L'identification des principaux constituants est basée sur la comparaison de leur temps d'éluion (tr) et leurs données spectrales (absorbance UV-VIS) avec ceux de certains standards purs. Les deux extraits éthanoliques ont été analysés par le même équipement et sous les mêmes conditions opératoires.

- Caractérisation de l'extrait éthanolique des feuilles

Le profil chromatographique de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. indique la présence d'acides phénoliques, de flavonols, de flavones et de flavanols (**Tableau 3.3**).

Tableau 3.3. Identification des composés phénoliques de l'extrait des feuilles

Pic	Tr (min)	Height [mV]	Composés bioactifs
1	6,670	1,465	Acide tannique
2	11,877	17,851	α -tocopherol (Vitamine E)
3	17,727	11,747	Catecheine
4	18,143	13,575	Rutine
5	21,993	20,679	caféine
6	24,570	0,541	Acide vanillique
7	24,987	2,952	Apéguine
8	25,360	16,688	Flavone
9	30,620	18,498	Hespertine
10	31,737	50,032	Varinigéne
11	33,753	4,352	Myricétine
12	35,637	2,666	Quercétine
13	43,570	0,838	Apéginine
14	47,353	0,476	Galangine

15	48,637	2,692	Acacetine
16	49,577	15,471	Kaemferide
17	49,703	0,849	Diosmine
18	51,703	2,049	Tangeritine
19	52,593	20,158	3. Hydroxy-flavone
20	54,620	17,956	5. Hydroxy-Flavone

- Caractérisation de l'extrait éthanolique des écorces

Le profil chromatographique de l'extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. indique la présence d'acides phénoliques, de flavonols, de flavones et de flavanols (**Tableau 3.4**).

Tableau 3.4. Identification des composés phénoliques de l'extrait des écorces

Pic	Tr (min)	Height [mV]	Tentative d'identification
1	6,727	28,085	Acide tannique
2	11,843	10,081	α -tocopherol (Vitamine E)
3	17,753	35,899	Catechine
4	18,377	1,778	Rutine
5	21,977	14,245	caféine
6	24,310	42,237	Acide vanillique
7	24,977	18,413	Apéguine
8	25,577	3,377	Flavone
9	29,710	141,374	Hespertine
10	32,503	40,226	Varinigéne
11	33,843	3,877	Myricétine
12	35,553	36,443	Quercétine
13	43,593	2,013	Apéguinine
14	47,627	0,529	Galangine
15	48,410	1,510	Acacetine
16	49,603	20,487	Kaemferide
17	49,610	1,562	Diosmine
18	51,643	5,390	Tangeritine
19	52,693	27,004	3. Hydroxy-flavone
20	54,620	244,225	5. Hydroxy-Flavone

On constate que les deux extraits éthanoliques semblent contenir plusieurs composés phénoliques, dont certains tels que : acide caféique et kaempférol ont été cités dans des travaux antérieurs [160][161].

L'allure des chromatogrammes des extraits montrent une bonne richesse en acides phénoliques tel que l'acide caféique et l'acide tannique, et en flavonoïdes tel que la rutine. Dans les deux profils chromatographiques, nous pouvons observer une meilleure résolution et séparation des différents pics (**Appendice F**). Il faut indiquer alors que chaque pic correspond à une molécule, et celui qui présente une forte absorption et possède une grande surface correspond à la molécule majeure (**Figure 3.1 et 3.2**).

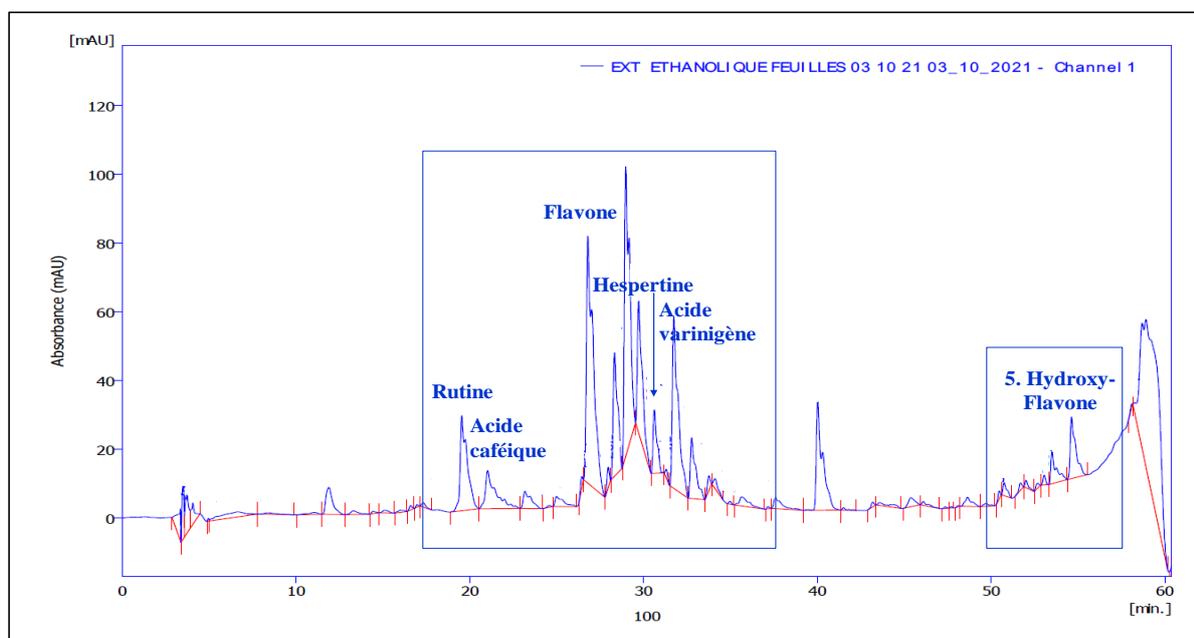


Figure 3.1. Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. visualisé à 254nm.

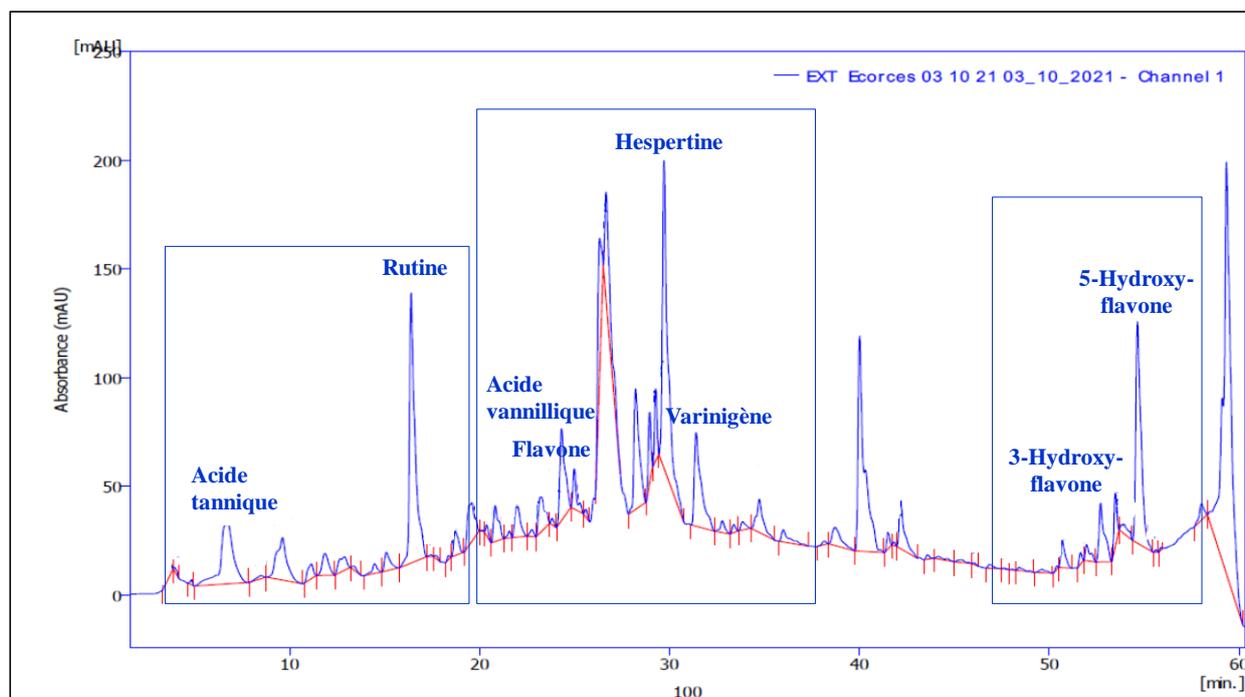


Figure 3.2. Chromatogramme de l'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* L. visualisé à 254nm.

Nous remarquons que les deux extraits éthanoliques obtenus par la méthode de macération à froid semblent contenir les mêmes composés bioactifs. **Boukhari [162]** a constaté que la macération à froid est la meilleure technique d'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Juglans regia* L. .

D'après les deux profils chromatographiques, le composé numéro 1 élué à 6 min pour les deux extraits éthanoliques est identifié en tant qu'acide tannique en comparaison avec le standard commercial. Cette molécule a également été identifiée dans l'étude réalisée au Japon par **Fukuda et al., [159]**.

Les composés n° 3 et 5 élués à 17 min et 21 min respectivement, correspondent à la catechine et l'acide caféique et sont présents dans les deux extraits éthanoliques. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par **Papoutsi et al., [163]** dont l'extrait méthanolique des fruits de *Juglans regia* est riche en catechine et l'acide caféique. Leurs temps de rétention sont de 9.983min et 13.458 min respectivement.

3.3. Résultats du Screening pharmacologique

3.3.1. Etude analytique de la solution antiseptique 2%

Les propriétés organoleptiques et chimiques sont des paramètres indispensables pour vérifier et contrôler la qualité du produit fini. La valeur du pH ainsi que les caractéristiques olfactives de la solution antiseptique 2 % élaborée sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 3.5. Appréciation organoleptique et chimique de la solution antiseptique 2 %.

	Aspect	Couleur	Odeur	pH
Solution antiseptique 2 % à base des feuilles de <i>Juglans regia</i> L. (25 ml)	Liquide	Verdâtre	Prononcée	6,32

L'évaluation de la solution antiseptique 2 % a présenté une valeur du pH neutre, cela est due à l'origine de la nature des feuilles qui, autrefois, étaient utilisées comme un remède topique et préconisées dans le traitement des problèmes de la peau comme l'acné, l'eczéma, les ulcères cutanés, les coups de soleil et les brûlures superficielles ainsi que pour régler une sudation trop importante sans provoquer des irritations [164][165]. Ainsi dans l'enquête ethnobotanique menée par **Idolo et al.**, [166], ces derniers ont montré que les feuilles de *Juglans regia* L. d'Italie sont utilisées pour la cicatrisation des gerçures au niveau des pieds [166].

3.3.1.1. Contrôle de qualité de la solution antiseptique 2%

La solution antiseptique 2% préparée a été soumise à des analyses microbiologiques visant à déterminer le taux de contamination bactérienne et fongique (levures et moisissures) et vérifier l'absence de germes pathogènes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.6. Qualité microbiologique de la solution antiseptique 2%

Germes recherchés	Solution antiseptique 2% (UFC/g)	Normes de la Pharmacopée Européenne (UFC/g) [127]
Germes aérobies viables totaux	00	≤200

Levures et moisissures	00	≤20
Entérobactéries et Gram (-)	00	≤ 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00

Après incubation sur géloses Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre (VRBL), Chapman et Sabouraud, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été détectée.

3.3.2. Résultats de l'étude préclinique et clinique des infections IOA

3.3.2.1. Résultats de l'enquête préclinique

Les résultats de l'enquête concernant les infections et leur degré sur matériel d'ostéosynthèse sont présentés dans l'appendice M.

3.3.2.2. Résultats de l'étude clinique

3.3.2.3 Résultats de l'activité antibactérienne

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al.,[167]**, dont les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont classés comme suit:

- Très fortement inhibitrice : $D \geq 30$ mm ;
- Fortement inhibitrice : $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$;
- Modérément inhibitrice : $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$;
- Légèrement inhibitrice : $11\text{mm} \leq D < 16\text{mm}$;
- Résistant : $D < 10\text{mm}$

Selon l'échelle de **Mutai et al.,[167]**, la solution antiseptique 2% formulée présente une extrême activité inhibitrice *in vitro* sur la plupart des germes isolés des IOA sur matériel orthopédique.

La solution antiseptique 2% présente une très forte inhibition sur deux souches de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Enterobacter cloacae* avec des diamètres de zone d'inhibition très importants dépassant les 30mm. Par contre, elle est modérément active vis-à-vis de six souches de *Pseudomonas aeruginosa* avec un

diamètre moyen d'inhibition égal à 14mm et s'est révélée inefficace sur *Proteus mirabilis* ($D < 6\text{mm}$) (**Figure 3.3**).

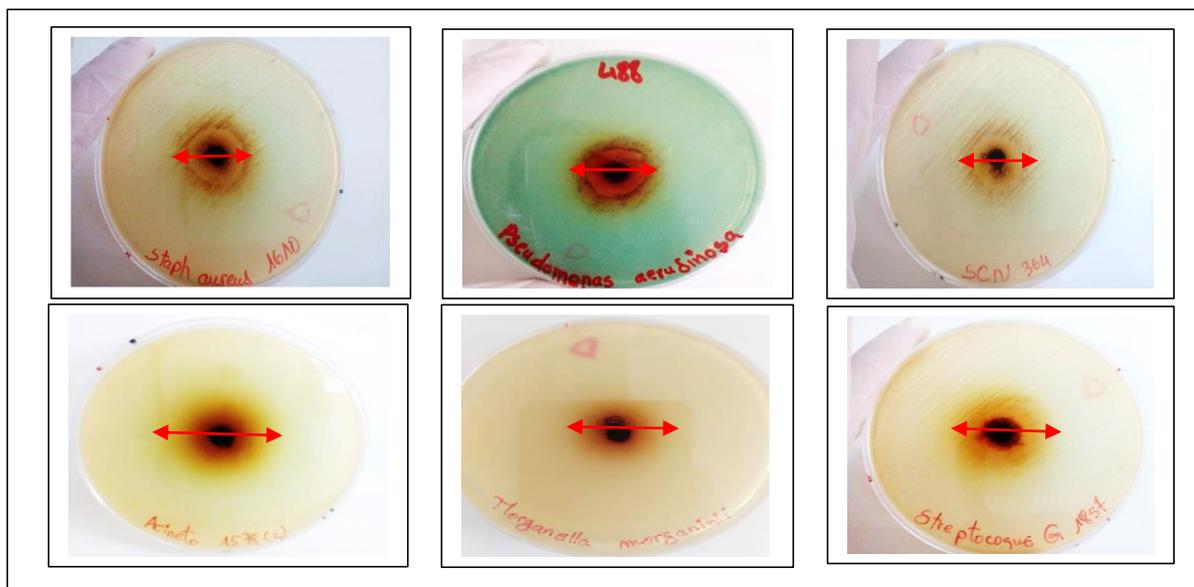


Figure 3.3. Activité antibactérienne de la solution antiseptique 2% (Originale, 2019)

D'autres germes incriminés dans les infections ostéoarticulaires sur matériel orthopédique, tels que les *Entérobactéries*, les *Staphylocoques* et les *Streptocoques*, présentent une forte sensibilité plus marquée vis-à-vis de la solution antiseptique 2%, avec un diamètre d'inhibition localisé dans l'intervalle [21mm – 29mm]. Enfin, on constate la présence de quelques bactéries qui ont présenté une sensibilité moyenne avec un diamètre d'inhibition qui varie entre 16mm et 20mm.

➤ **Activité antibactérienne vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii***

Cinq souches multi-résistantes d'*Acinetobacter baumannii* ont montré une résistance totale aux antibiotiques, par contre elles ont manifesté un degré de sensibilité remarquable vis-à-vis de la SA 2% formulée (**Tableau3.7**).

Tableau 3.7. Résistance et sensibilité des souches d'*Acinetobacter baumannii*

Souches/ ATB (Charge/disque)	Cotrimoxazole (SXT)	Céftazidime (CAZ)	Pépiracilline (PIP)	Ticarcilline (TIC)	SA (2%)
<i>Acinetobacter baumannii</i> 1	<6mm	<6mm	<6mm	<6mm	21mm ±0.82
<i>Acinetobacter baumannii</i> 2	<6mm	<6mm	<6mm	<6mm	21mm ±0.73
<i>Acinetobacter baumannii</i> 3	<6mm	<6mm	<6mm	<6mm	22mm ±0.57
<i>Acinetobacter baumannii</i> 4	<6mm	13mm	/	<6mm	23mm ±0.75
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5	<6mm	14mm	17mm	18mm	23mm ±0.90

D (mm) : Diamètre d'inhibition, <6 = Résistant, antibiotiques : Cotrimoxazole (SXT), Céftazidime (CAZ), Pépiracilline (PIP), Ticarcilline (TIC), Solution antiseptique 2% (SA).

Cette souche pathogène est responsable de nombreuses septicémies, méningites et pneumonies à cause de sa résistance à la pénicilline et vis-à-vis de plusieurs antibiotiques [168]. Le potentiel antibactérien de la solution antiseptique formulée contre *A. baumannii*, confirme la capacité de cette dernière dans l'éradication du problème de la multi-résistance bactérienne dans le secteur médical, ce qui peut diminuer les risques des maladies nosocomiales et permet de réduire le taux de mortalité par les infections causées par ces bactéries multi-résistantes.

L'étude effectuée par **Khalid et al., [169]** et par **Nozohour et al., [170]** sur l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia*, a révélé que ce dernier inhibe légèrement la croissance d'*A. baumannii* avec une zone d'inhibition estimée à 14.3mm±0.45.

Ce pouvoir antimicrobien est probablement dû à la richesse de l'extrait éthanolique en saponines lesquelles possèdent une activité antimicrobienne contre un grand nombre de microorganismes [171].

Les résultats des tests statistiques ANOVA (différence significative entre l'effet antibactérien) , sont figurés dans l'appendice L.

➤ **Activité antibactérienne vis-à-vis des SARM**

Neufs souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline (**SARM**) ont montré une résistance totale aux antibiotiques par contre elles ont manifesté un degré de sensibilité vis-à-vis de la SA 2% formulée (**Tableau 3.8**).

Tableau 3.8. Résistance et sensibilité des SARM

Souches/ ATB(Charge/disque)	Pénicilline (P) 10UI	Céfoxitine (Fox) 30µg	Oxacilline (Ox) 1µg	Amikacine (Ak) 30µg	SA (2%)
SARM1	R	R	R	R	19±0.49
SARM2	R	R	R	R	20±0.50
SARM3	R	R	R	R	17±0.40
SARM4	R	R	R	R	26±0.55
SARM5	R	R	R	R	18±0.41
SARM6	R	R	R	R	21±0.49
SARM7	R	R	R	R	21±0.49
SARM8	R	R	R	R	21±0.37
SARM9	R	R	R	R	22±0.52

D(mm) Diamètre d'inhibition, <6 = Résistant (R), antibiotiques : Pénicilline (P) 10UI, Céfoxitine (Fox) 30µg, Oxacilline (Ox) 1µg, Amikacine (Ak) 30µg, Solution antiseptique 2% (SA).

➤ **Activité antibactérienne vis-à-vis des MRSCN**

Six souches de *Staphylococcus epidermidis* résistant à la Méthicilline (**MRSCN**) incriminées dans les infections ostéo-articulaires sur matériel orthopédique, ont montré un profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques. En revanche, ces mêmes germes ont montré un profil modérément à fortement sensibles à la solution antiseptique 2% formulée (**Tableau3.9**).

Tableau 3.9. Résistance et sensibilité des MRSCN

Souche/ ATB (Charge/disque)	Pénicilline (P) 10UI	Oxacilline (OX1)	Oxacilline (OXA5)	Céfoxitine (FOX)	SA 2%
MRSCN1	<6	<6	<6	<6	23±0.21
MRSCN2	21	10	26	19	18±0.19
MRSCN3	19	10	22	18	18±0.15
MRSCN4	19	<6	22	21	18±0.20
MRSCN5	/	10	25	20	23±0.30

MRSCN6	<6	<6	<6	13	16±0.10
---------------	----	----	----	----	---------

D (mm) Diamètre d'inhibition : (R) = Résistant , antibiotiques : Pénicilline (P) 10UI, Oxacilline(OX1), Oxacilline (OXA5), Céfoxitine (FOX), Solution antiseptique 2% (SA).

➤ **Activité antibactérienne vis-à-vis de *M.morganii***

Deux souches multi-résistantes du genre *Morganella morganii* ont été identifiées dans la présente étude. Elles ont montré un profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques. En revanche, elles se comportent comme modérément à fortement sensibles à la solution antiseptique 2% formulée (**Tableau 3.10**).

Tableau 3.10. Résistance et sensibilité de *Morganella morganii*

Souche/ ATB (Charge/disque)	Amoxicilline (AMC)	Cotrimoxazole (SXT)	Céfazoline (CZ)	Acide nalidixique (NA)	SA 2%
<i>M.morganii1</i>	R	R	R	R	20±0.37
<i>M.morganii2</i>	R	R	R	R	24±0.45

D (mm) Diamètre d'inhibition : (R) = Résistant, antibiotiques : Amoxicilline(AMC), Cotrimoxazole (SXT), Céfazoline (CZ), Acide nalidixique (NA), Solution antiseptique 2% (SA).

Les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à ceux obtenus par **Khalid et al., [169]** qui indiquent que cette bactérie est sensible à l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia*. Cette sensibilité est traduite par des zones d'inhibition estimée à 15.6mm±0.65.

3.3.2.4. Résultats de l'antibiofilmogramme de la SA2%

Dans les IOAM, il est important de connaître si les souches de *Staphylococcus aureus* prélevées (14 souches) sont capables de former un biofilm pouvant contribuer à l'installation de l'infection sur le matériel d'ostéosynthèse (prothèse, fixateur externe, plaque vissée...). Les résultats des tests bactériologiques révèlent une forte contamination par *Staphylococcus aureus* sur pus postopératoire survenu principalement sur prothèse de hanche (6/14) et sur fixateur externe (5/14) respectivement, suivi de la plaque vissée (2/14) et enfin du clou centromédullaire (1/14).

En se fondant sur les résultats du potentiel antibiofilm, les valeurs de CMIB ayant une forte inhibition sur les cellules bactériennes à l'état sessile sont enregistrées dans le **tableau 3.11**.

Tableau 3.11. Criblage des concentrations minimales inhibitrices de biofilm

S.aureus	1	2	3	4	5	6	7	8
CMIB% (v/v)*	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
S.aureus	9	10	11	12	13	14	Souche témoin positive	
CMIB% (v/v)*	6.25	6.25	6.25	3.125	6.25	6.25	0.78	

* (v/v) : µl/ml

D'après les résultats obtenus par la technique de marquage au Crystal Violet, la cinétique d'adhésion des isolats cliniques *in vitro* a permis de classer les souches en trois groupes majeurs bien distincts. Sur les 14 souches de *Staphylococcus aureus* prélevées sur matériel orthopédique, dix ont été placées dans le profil d'adhésion extrême (+++), considérées positives pour leur phénotype de production de biofilm sur le support en polystyrène, en comparaison avec le témoin positif producteur de biofilm, une souche de *Staphylococcus aureus* placée dans le profil d'adhésion moyenne (++) et trois dans le profil d'adhésion faible (+) (Figure 3.4).

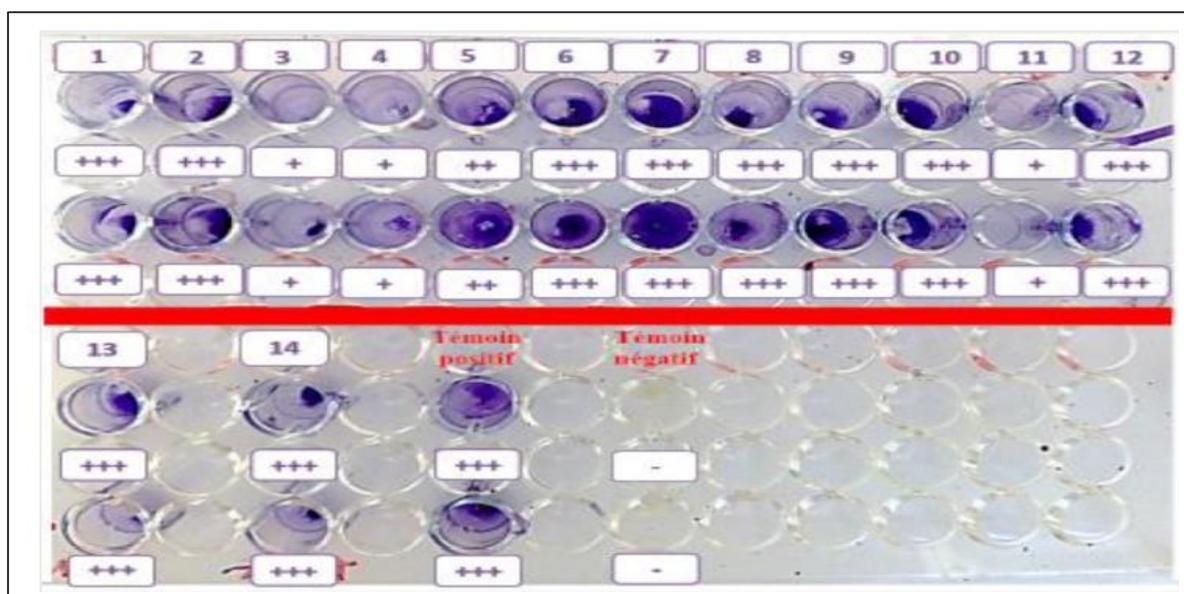


Figure 3.4. Production de biofilm staphylococcique par la technique de tissu en plaque TCP. Absence d'adhérence bactérienne : (-) ; cellules bactériennes faiblement adhérentes : (+) ; cellules bactériennes modérément adhérentes : (++) ; cellules bactériennes extrêmement adhérentes : (+++)

En examinant les résultats obtenus, on remarque une diminution progressive des biofilms formés en fonction de l'augmentation de la concentration de la solution

antiseptique 2 %. Une CMIB à 6,25 % (v/v) s'est avérée suffisante pour empêcher toutes les phases de formation de biofilm sur 13 souches de *Staphylococcus aureus* (13/14) et éliminer efficacement toute trace de biofilm *in vitro*. La souche n° 12 issue d'une infection sur matériel d'ostéosynthèse (fixateur externe) a manifesté un degré de sensibilité antiadhésive très faible 3,125 % (v/v) en comparaison avec la totalité des souches. En revanche, la souche témoin positive a présenté la plus faible CMIB, mesurée à 0,78 % (v/v).

Selon les résultats de l'antibiogramme (**Tableau 3.12**), la majorité des souches *Staphylococcus aureus* ont montré un profil de résistance vis-à-vis des différents antibiotiques testés (**Figure 3.5**).

Tableau 3.12. Effet de sensibilité des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(P)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(Fox)	R	R	28	R	27	26	R	27	26	R	29	26	R	22
(Ox)	R	R	21	R	21	12	R	12	20	R	18	20	R	12
(Ak)	R	R	R	R	19	/	R	/	23	R	24	R	R	R

R : résistante ; (P) : pénicilline ; (Fox) : céfoxitine ; (Ox) : oxacilline (Ak) : amikacine

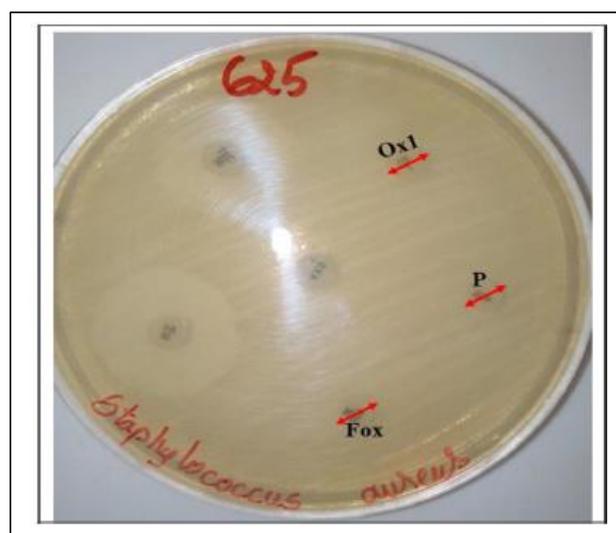


Figure 3.5. Antibiogramme *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) (Photo originale, 2020).

D'après les résultats obtenus de test antibiofilmogramme, on peut témoigner que toutes les souches *Staphylococcus aureus* soumises à l'essai biologique antibiofilm *in vitro* sont très sensibles au traitement anti-adhésif de la solution

antiseptique 2 % testée. En revanche, elles ont montré un profil de résistance vis-à-vis de certains antibiotiques. Ces résultats sont identiques à ceux rapportés par plusieurs auteurs [172][173] qui montrent que les feuilles de *Juglans regia* L. possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*.

Selon l'étude menée par **Quave et al., [174]** , l'utilisation des extraits aqueux des feuilles de *Juglans regia* empêchent *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) de former le biofilm, et cela est en rapport avec la richesse de la plante en molécules bioactives telles que les naphthoquinones et les flavonoïdes qui sont responsables de cette activité antibactérienne.

Des investigations récentes sur la prévention et l'inhibition de la production de biofilm, menées par **Dolatabadi et al.,[9]** et **Abidi et al.,[175]** sur les extraits de *Juglans regia* additionnés aux antibiotiques, ont montré une activité antibiofilm contre les *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*.

3.3.3. Etude analytique de la crème dermique antifongique 2%

Les propriétés organoleptiques et chimiques sont des paramètres indispensables pour vérifier et contrôler la qualité du produit fini.

3.3.3.1 Contrôle de qualité de la crème dermique antifongique 2 %

La valeur du pH ainsi que les caractéristiques olfactives de la crème dermique antifongique 2% élaborée sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3.13. Appréciation organoleptique et chimique de la crème dermique antifongique 2%

	Aspect	Couleur	Odeur	Stabilité	Homogénéité	pH
Crème dermique antifongique 2 % à base des feuilles de <i>Juglans regia</i> L.	Assez épaisse	Verdâtre	Vanille	Stable	Homogène	5,20

La crème dermique antifongique 2 % préparée a été soumise à des analyses microbiologiques visant à déterminer le taux de contamination bactérienne et fongique (levures et moisissures) et vérifier l'absence de germes pathogènes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.14. Qualité microbiologique de la crème dermique antifongique 2 %

Germes recherchés	Solution antiseptique 2% (UFC/g)	Normes de la Pharmacopée Européenne (UFC/g) [127]
Germes aérobies viables totaux	00	≤200
Levures et moisissures	00	≤20
Entérobactéries	00	≤ 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00

Après incubation sur géloses Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre, sur Chapman et sur Sabouraud, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été détectée.

3.3.3.2. Résultats de l'activité antidermatophyte

Les résultats de l'examen direct dans les squames ou les fragments des ongles ont montré la présence de filaments mycéliens, plus ou moins réguliers, septés, (Figure 3.6).

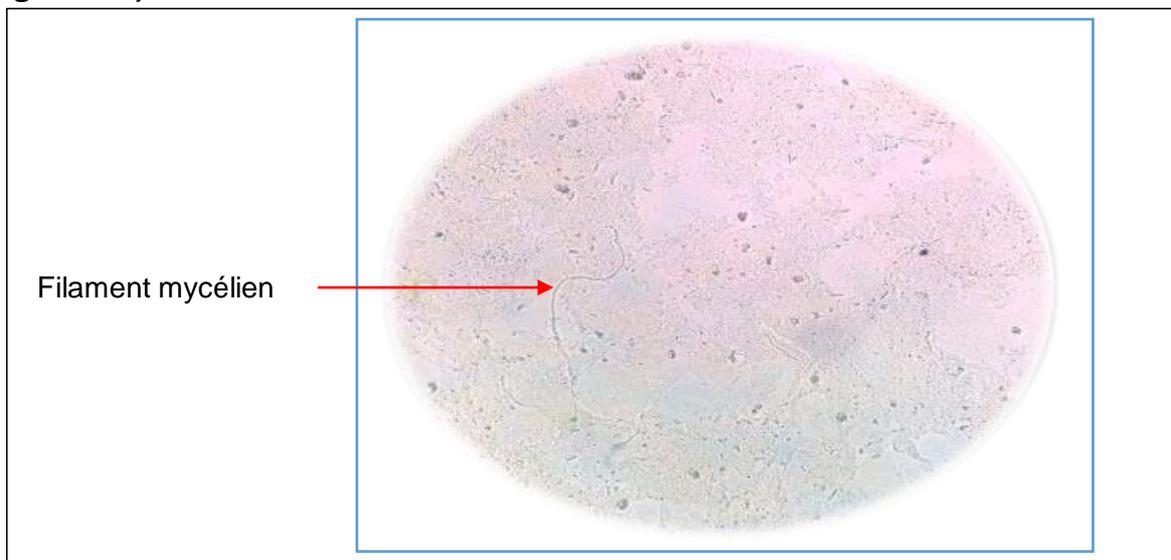


Figure 3.6. Observation microscopique des filaments mycéliens à Gx40 (Photo originale, 2021).

Après une culture de 10 jours jusqu'à un mois, les différentes souches isolées ont été identifiées selon les caractères macro et microscopiques [134] :

❖ Identification de l'espèce *Trichophyton rubrum*.

Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
Croissance lente à modérément rapide (05 à 10 jours) Aspect des colonies : duveteuse, poudreuse avec dôme centrale. Couleur des colonies : En recto : blanchâtre, rose, jaune, cotonneuses, plissées, bombées au centre En verso : rouge foncé, brun, jaune.	Filaments mycéliens grêles. Microconidies : périformes en acladium. Macroconidies : en fuseaux

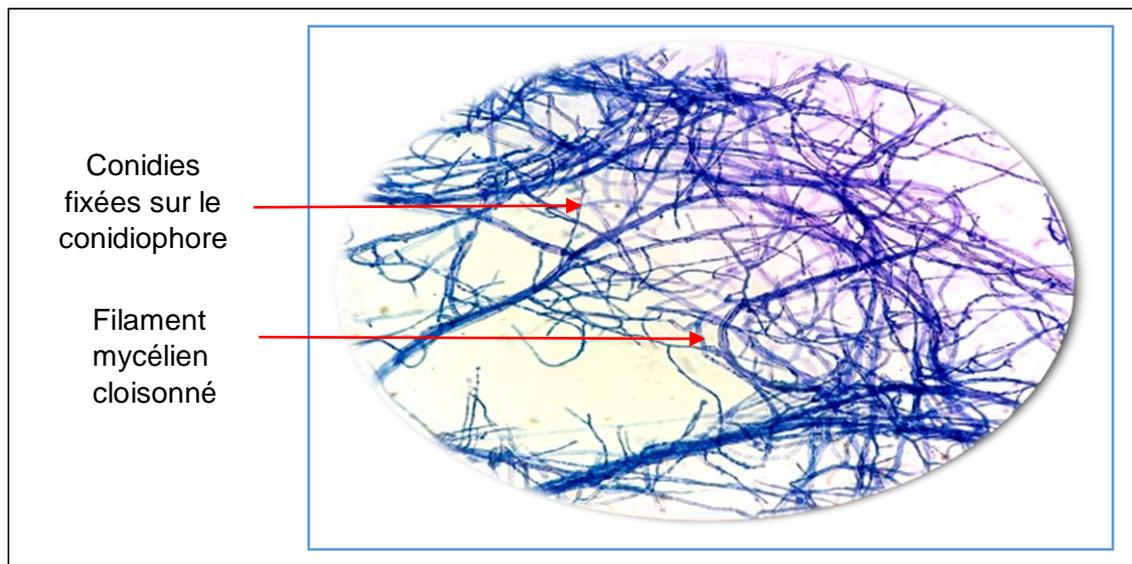


Figure 3.7. Aspect microscopique de l'espèce *Trichophyton rubrum* x40 (Photo originale, 2021).

❖ Identification de l'espèce *Trichophyton mentagrophytes*.

Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
<p>Croissance rapide (après 05 jours)</p> <p>Aspect des colonies : plâtreux, granuleuses, duveteuses, poudreuses.</p> <p>Couleur des colonies : Recto : blanc neige à crème, beige. Verso : jaune à brun.</p>	<p>Présence des filaments septés, articulés.</p> <p>Présence des vrilles,</p> <p>Microconidies : rondes et périformes et en acladium,</p> <p>Macroconidies : en forme de massue le plus souvent absentes.</p>

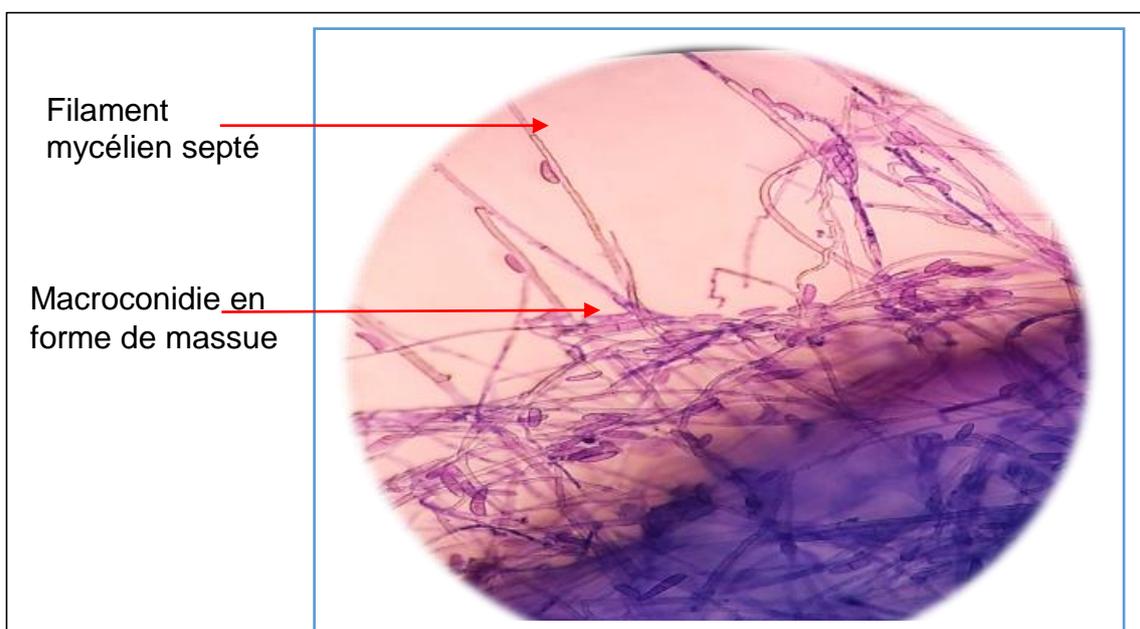


Figure 3.8. Aspect microscopique de l'espèce *Trichophyton mentagrophytes* x40 (Photo originale, 2021).

❖ **Identification de l'espèce *Microsporium canis***

Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
Colonies étoilées, duveteuses ou laineuses, blanchâtres au recto, jaune orangé au verso.	Filaments mycéliens, fins et réguliers, cloisonnés ou mycelium en raquette. Macroconidies à parois épaisses, échinelées, en forme de fuseaux avec des extrémités pointues, comportent de 6 à 12 logettes. Microconidies : piriformes, peu abondantes.



Figure 3.9. Aspect microscopique de l'espèce *Microsporium canis* x40 (Photo originale, 2021).

❖ **Résultats du test urée indole**

Après deux jours d'incubation, nous avons constaté que les tubes qui contenaient des fragments des souches de *T. mentagrophytes* virent le milieu vers le rose clair, ce qui indique que le test est positif. Tandis que les tubes qui contiennent des fragments des souches de *T. rubrum* restent rose violet, le test est considéré négatif.

❖ **Répartition des espèces identifiées**

D'après les caractères cités précédemment, nous avons pu identifier **7** souches dermatophytiques appartenant aux genres : *Trichophyton* et *Microsporium* isolés à partir de différents ongles (**Tableau 3.15**).

Tableau 3.15. Espèces isolées et origine de leur infection.

Espèces isolées	localisation	Sexe (H/F)	Age (ans)	Examen direct	Test d'urée indol
<i>T.mentagrophytes</i>	Ongle main et pieds	Homme	30ans	Filaments mycéliens	Urée (+)
<i>T.rubrum</i>	Ongle main	Femme	67ans	Filaments mycéliens	Urée (-)
<i>T.soudanense 1</i>	Ongle pieds	Femme	30ans	Filaments mycéliens	/
<i>T.soudanense 2</i>	Ongle pieds	Homme	30ans	Filaments mycéliens	/
<i>M.canis 1</i>	Ongle main	Femme	40ans	Filaments mycéliens	/
<i>M.canis 2</i>	Ongle de gros orteil	Femme	30ans	Filaments mycéliens	/
<i>M.canis 3</i>	Ongle pieds	Homme	47ans	Filaments mycéliens	/

3.3.3.3. Résultats de l'antifongigramme de la crème dermique 2%

Après 10jours d'incubation à 26°C, les diamètres de la zone d'inhibition observés autour de la crème dermique 2% formulée sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3.16. Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de la crème dermique antifongique 2%

Souches dermatophytes	Diamètre d'inhibition (mm)	Diamètre de la boite de pétri (mm)	% d'inhibition
<i>T.mentagrophytes</i>	58mm	90mm	64,44%
<i>T.rubrum</i>	78mm	90mm	86,67%
<i>T.soudanense 1</i>	65mm	90mm	72,22%
<i>T.soudanense 2</i>	59,5mm	90mm	66,11%
<i>M. canis 1</i>	63mm	90mm	70%
<i>M.canis 2</i>	54,5mm	90mm	61%
<i>M.canis 3</i>	53,5mm	90mm	59,44%

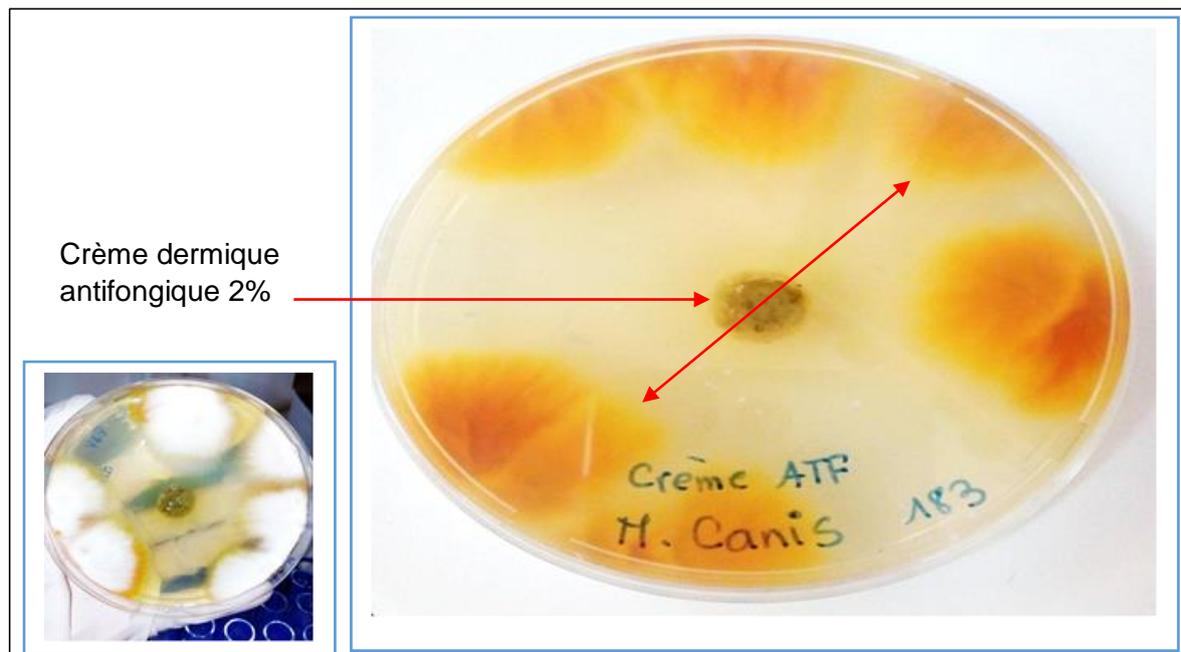


Figure 3.10 : Activité antifongique de la crème dermique antifongique 2% contre *Microsporium canis* (Photo originale, 2021).

L'action de la crème dermique vis-à-vis des isolats dermatophytiques a montré des pourcentages d'inhibition très importants dépassant les 50%, ceci nous amène à supposer que l'activité antifongique de l'ensemble des principes actifs (extrait éthanolique) est liée directement à sa teneur en molécules bioactives tel que : la famille chimique des naphtoquinones (Juglone) considérées comme composés majoritaires, en plus des composés phénoliques.

Pour connaître le potentiel antifongique de la solution antiseptique 2% préparée, nous avons testé son activité antidermatophytique et anticandidosique.

Les résultats des pourcentages d'inhibition de la solution antiseptique 2% calculé à partir de la formule : $I (\%) = [(dC - dE) / dC] \times 100$ sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3.17. Valeurs des diamètres des colonies et le % d'inhibition de la solution antiseptique 2%

Souches dermatophytes	diamètre des colonies sans traitement	Diamètres des colonies avec traitement (SA2%)	Pourcentage d'inhibition (%)
<i>T. mentagrophytes 1</i>	50mm	00mm	100%

<i>T.mentagrphytes 2</i>	14mm	00mm	100%
<i>T.mentagrphytes 3</i>	44mm	00mm	100%
<i>T.soudanense 1</i>	32mm	00mm	100%
<i>T.soudanense 2</i>	43mm	00mm	100%
<i>M.canis 1</i>	49mm	00mm	100%
<i>M.canis 2</i>	52mm	00mm	100%

D'après les résultats, on constate que l'activité antifongique de la solution antiseptique 2% formulée inhibe à 100% la croissance de toutes les souches dermatophytes testées (**figure 3.11**).

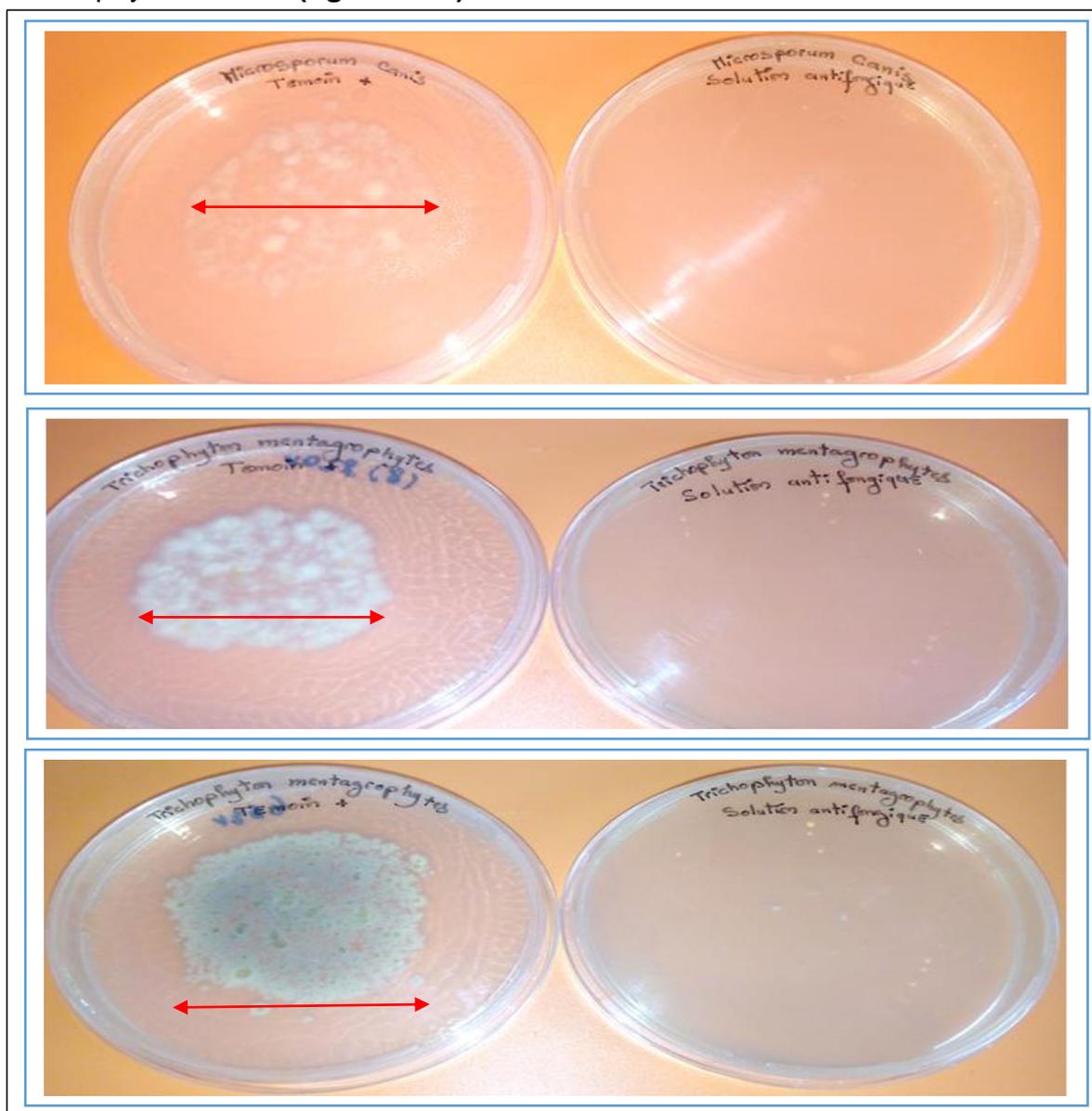


Figure 3.11. Résultats de l'activité antidermatophyte de la solution antiseptique 2% (Photo originale, 2021).

La crème dermique formulée à base d'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. peut être ainsi utilisée comme produit antimicrobien efficace dans le traitement des mycoses superficielles. La richesse de cette plante médicinale en constituants bioactifs, lui confère des propriétés pharmacologiques importantes.

L'enveloppe verte charnue (mésocarpe et épicarpe) du fruit de la noix a été utilisée dans la médecine traditionnelle arabe palestinienne pour traiter plusieurs affections humaines, notamment les maladies de la peau causées par des champignons [176]. L'extrait éthanolique de l'enveloppe des fruits de *Juglans nigra* s'est avéré actif contre les champignons dermatophytes [177].

D'après les travaux de **Li et al.**, [178], les analyses phytochimiques réalisées sur les différentes parties de *Juglans regia*, présentent une richesse en composés phénoliques tels que les naphthoquinones et les flavonoïdes. Ces molécules sont connues par leur pouvoir inhibiteur de la croissance fongique.

Selon l'étude de **Mansour-Djaalab et al.**, [179] menée à Constantine, l'extrait hydro-alcoolique des écorces de *Juglans regia* montre un potentiel antifongique élevé vis-à-vis de *Trichophyton rubrum* (13,67mm), *Trichophyton mentagrophytes* (14,33mm) et *Microsporum canis* (14,67mm).

L'étude de **Husein et al.**, [180] menée en Palestine, a montré que l'extrait éthanolique de la coquille verte du noyer non mature présente des pourcentages d'inhibition importants vis-à-vis de *T. mentagrophytes* (30%), *T. rubrum* (30%) et *M. canis* (58%) à la concentration 3,8mg/ml, à (50%), (38%) et (78%) à la concentration 7,5mg/ml et à (100%), (58%) et (81%) à la concentration 15mg/ml respectivement. Par contre, l'extrait chloroformique présente un potentiel antidermatophyte plus efficace à la concentration de 2,1mg/ml avec un pourcentage d'inhibition estimé à 100% sur la croissance des trois souches *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* et *M. canis*.

Dans une autre étude réalisée par **Mansour-Djaalab et al.**, [181] à Constantine l'extrait d'éther d'éthylque des écorces de *Juglans regia* n'a montré aucune activité pour la plupart des souches testées, principalement *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* et *Microsporum canis*.

3.3.3.4 Résultats de l'activité anticandidosique

Le diagnostic de candidose cutané-unguéale était retenu par la mise en évidence de levures bourgeonnantes ou de filaments mycéliens.

Concernant l'identification des espèces de *Candida*, seulement *C. albicans* a été identifiée des autres espèces « non *albicans* » par le test de filamentation sur sérum (test de blastèse). Si le test de blastèse est positif, la recherche de tubes germinatifs permettait de distinguer *C. albicans* (Figure 3.12).

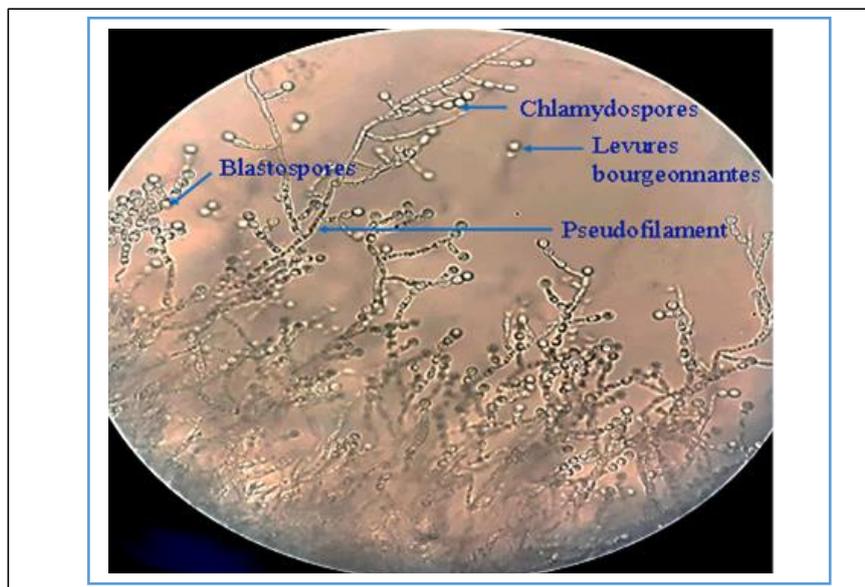


Figure 3.12. *Candida albicans* x40 (Photo originale, 2021).

Dans la présente étude, 9 souches de *Candida* ont été isolées à partir des ongles des patients (Tableau 3.18).

Tableau 3.18. Espèces candidosiques isolées et origine de leurs infections.

Espèces isolées	localisation	Sexe (H/F)	Age (ans)	Examen direct	Test de blastèse
<i>Candida albicans</i>	Ongle pieds	H	60ans	Filaments mycéliens+ spores fongiques	Présence de tube germinatif
<i>Candida albicans</i>	Ongle main	H/F	19 mois	Filaments mycéliens+ spores fongiques	Présence de tube germinatif
<i>Candida sp</i>	Ongle main	H/F	2.5ans	spores fongiques	/
<i>Candida sp</i>	Ongle main	H	49ans	spores fongiques	/
<i>Candida sp</i>	Espace inter-orteil	F	61ans	spores fongiques bourgeonnantes	/

<i>Candida albicans</i>	Ongle pieds	F	30ans	Filaments mycéliens+ spores fongiques	Présence de tube germinatif
<i>Candida albicans</i>	Ongle main	F	67ans	spores fongiques bourgeonnantes	Présence de tube germinatif
<i>Candida albicans</i>	Espace inter-orteil	F	24ans	Filaments mycéliens	Présence de tube germinatif
<i>Candida albicans</i>	Ongle main	H/F	03ans	Négatif	Présence de tube germinatif

3.3.3.5. Résultats de l'antifongigramme de la solution antiseptique 2%

Après 48h d'incubation à 26°C, les diamètres de la zone d'inhibition observée autour de la solution antiseptique 2% formulée en comparaison avec trois traitements antifongiques conventionnels (Terbidal 1%, Loceryl 5% et Econazol 1%) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3.19. Diamètre des zones d'inhibition des souches *Candida*

Souche	SA 2%	Terbidal 1%	Loceryl 5%	Econazol 1%
<i>Candida albicans</i>	28±0.12mm	54±0.1mm	R	42±0.1mm
<i>Candida albicans</i>	28±0.1mm	R	8±0.1mm	36±0.15mm
<i>Candida sp</i>	29±0.17mm	R	8±0.1mm	32±0.1mm
<i>Candida sp</i>	27±0.14mm	56±0.18mm	R	50±0.12mm
<i>Candida sp</i>	26±0.2mm	54±0.2mm	R	18±0.11mm
<i>Candida albicans</i>	23±0.15mm	R	13±0.11mm	10±0.12mm
<i>Candida albicans</i>	38±0.12mm	R	35±0.14mm	24±0.15mm
<i>Candida albicans</i>	35±0.13mm	36±0.14mm	40±0.12mm	12±0.1mm

<i>Candida albicans</i>	38±0.12mm	48±0.1mm	28±0.12mm	28±0.11mm
--------------------------------	-----------	----------	-----------	-----------

D (mm) Diamètre d'inhibition, R : résistant <6mm, SA : solution antiseptique

La SA 2% formulée à base d'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. possède des propriétés inhibitrices plus élevées que celles des trois autres produits antifongiques (Terbidal 1%, Loceryl 5% et Econazole 1%) tant sur la germination des spores que sur la croissance mycélienne (**Figure 3.13**).

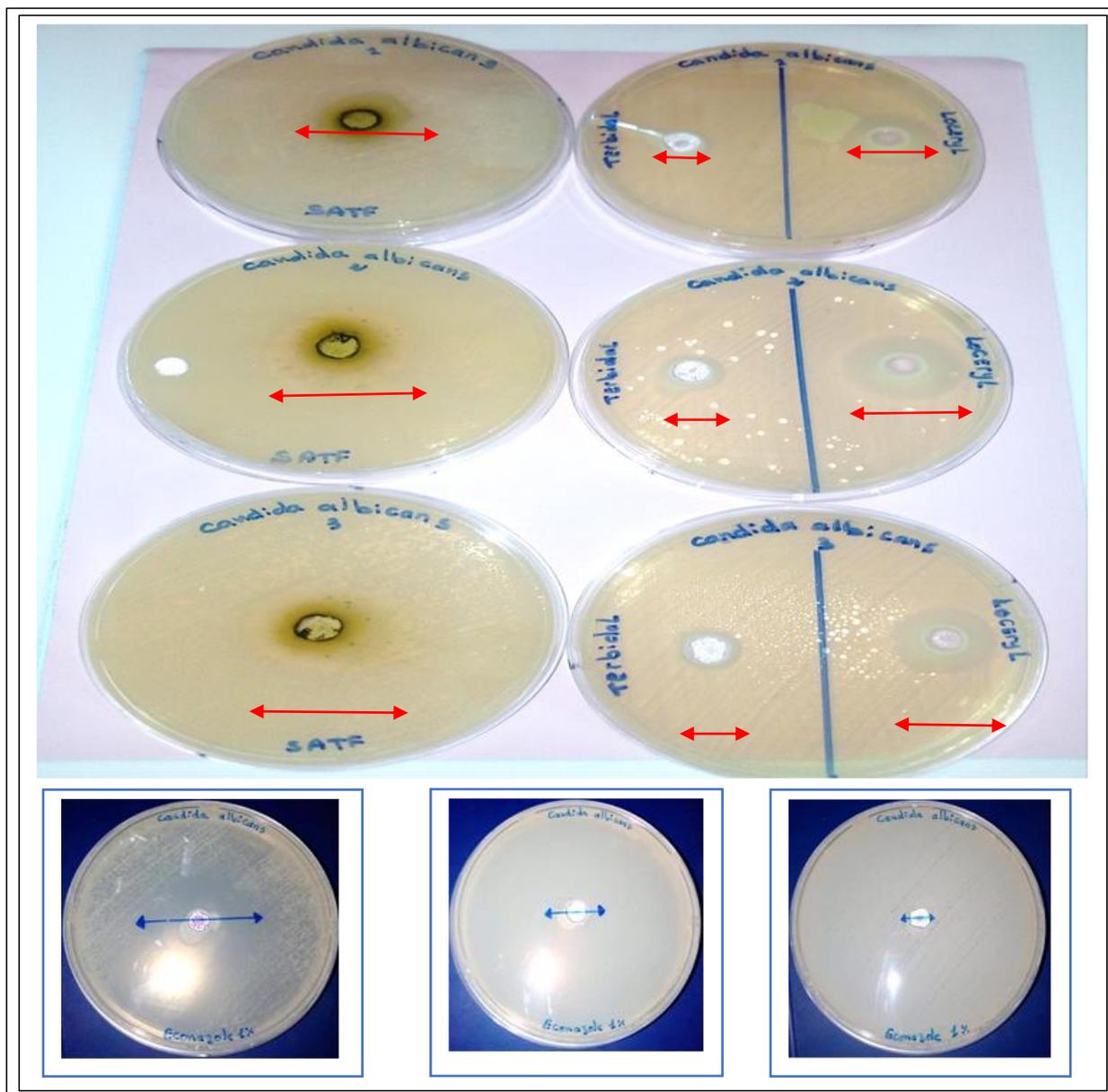


Figure 3.13 : Activité anticandidosique de la solution antiseptique 2% contre les souches *Candida albicans* comparés aux traitements antifongiques (Photos originales,2021)

L'efficacité fongitoxique constatée est probablement liée à la richesse de l'extrait éthanolique en molécules bioactives identifiées chimiquement.

Les résultats de l'étude de la sensibilité des levures par des tests de microdilution, sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.20. Concentration minimale inhibitrice et profil fongicide ou fongistatique des souches *Candida*

Souches	SA 2%		Terbidal 1%		Loceryl 5%		Econazol 1%	
	CMI	Profil fongicide ou fongistatique	CMI	Profil fongicide ou fongistatique	CMI	Profil fongicide ou fongistatique	CMI	Profil fongicide ou fongistatique
<i>Candida albicans</i>	6,25%	Fongicide	0,19%	Fongistatique	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida albicans</i>	6,25%	Fongicide	0,19%	Fongistatique	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida sp</i>	3,125%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida sp</i>	6,25%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida sp</i>	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida albicans</i>	6,25%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongistatique	12,5%	Fongicide
<i>Candida albicans</i>	6,25%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide
<i>Candida albicans</i>	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide
<i>Candida albicans</i>	6,25%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide	12,5%	Fongicide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des levures évaluées par la méthode de dilution en milieu liquide, montrent une activité anticandidosique avec une importante différence en comparaison avec les CMI des traitements antifongiques conventionnels qui atteignent souvent 12,5% (v/v).

L'étude de **Noumi et al., [182]** menée en Tunisie contre les souches de référence du genre *Candida ATCC*, a révélé que les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle des écorces de *Juglans regia* L. présentent des diamètres des zones d'inhibition estimés à $10,33 \pm 0,57$ mm, $15,66 \pm 1,15$ mm, $11,66 \pm 0,57$ mm et $18,33 \pm 0,57$ mm pour *Candida ATCC 90028* et *Candida ATCC 2091*.

Cependant, la plus forte activité anticandidosique de l'extrait d'acétate d'éthyle des écorces de *J. regia* L., a été observée contre deux *Candida albicans* avec respectivement une CMI : 3,125 mg/ml ; CMF : 12,5 et 6,25 mg/ml.

Nos résultats se rapprochent de ceux publiés par **Noumi et al., [183]** et **Pereira et al. (2008)** qui ont mis en évidence une activité anticandidosique des extraits méthanoliques de *Juglans regia* contre les souches *Candida*.

Concernant les profils fongicides/fongistatiques (**tableau 3.20**), la solution antiseptique 2% élaborée présente une activité fongicide aux concentrations minimales inhibitrices. En effet, elle a manifesté un pouvoir fongicide sur toutes les souches en comparaison avec les traitements antifongiques commercialisés qui présentent parfois un profil fongistatique. Ce qui confirme l'importante place qu'occupe *J.regia* dans la médecine traditionnelle et même dans les industries pharmaceutique et parapharmaceutique **[184]**.

Les résultats de notre étude, nous permettent de relier l'activité antifongique de nos produits à la richesse de la plante en métabolites mis en évidence lors du criblage phytochimique, caractérisant les molécules naturelles responsables de cette activité antifongique. Les résultats de l'étude statistiques sont répertoriés dans l'appendice L.

3.3.4. Etude analytique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation

Les caractéristiques olfactives de la pâte dentifrice formulée et le bain de bouche sont présentés dans le **tableau 3.21**

Tableau 3.21. Appréciation organoleptique et chimique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation

	Aspect	Couleur	Odeur	Homogénéité	pH
pâte dentifrice	Molle	Crème	Menthe	Homogène	7,91
Bain de bouche	Liquide	Beige	Menthe	/	neutre
Solution d'irrigation	Liquide	Marron	/	/	neutre

3.3.4.1. Contrôle de qualité de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la SI

Les trois produits formulés ont été soumis à des analyses microbiologiques visant à déterminer le taux de contamination bactérienne et fongique (levures et moisissures) et vérifier l'absence de germes pathogènes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.22. Qualité microbiologique de la pâte dentifrice, le bain de bouche et la solution d'irrigation

Germes recherchés	pâte dentifrice, bain de bouche et SI (UFC/g)	Normes de la Pharmacopée Européenne (UFC/g) [127]
Germes aérobies viables totaux	00	≤200
Levures et moisissures	00	≤20
Entérobactéries	00	≤ 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00

Après incubation sur géloses Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre, Chapman et sur Sabouraud, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été détectée, de même pour les colonies concernant les germes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

3.3.4.2. Résultats du potentiel anticariogène en stomato- parodontologie

Il s'agit d'une étude phénotypique de la flore bactérienne de la plaque supra-gingivale buccale et lésions carieuses chez 8 adultes (Homme et femme) (sous la responsabilité des chirurgiens-dentistes spécialistes).

Dans cette étude, les résultats de cette étude montrent l'abondance des cocci à Gram positif aéroanaérobies facultatifs dans la plaque supra-gingivale avec une

prédominance du genre *Streptococcus* (**Tableau 3.23**). Ces données corroborent avec celles signalées par **Hoceini et al., [185]** ; **Ziouani et al., [186]** ; **Sixou et al., [187]** et **Aas et al., [188]** qui ont retrouvé la présence de ces bactéries dans la plaque dentaire supra-gingivale chez les adultes présentant des caries.

Après 24h d'incubation, les diamètres de la zone d'inhibition observée autour de la pâte dentifrice et le bain de bouche en comparaison avec l'amoxicilline et Bi-orogyl (Spiramycine + Métronidazole) sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 3.23. Diamètre des zones d'inhibition des germes oraux

Souches	Pâte dentifrice	Bain de bouche (Siwak)	Amoxicilline (AMX)	Bi-orogyl
<i>Entrococcus faecalis</i> ATCC 29212	65±0.1mm	60±0.23mm	30±0.12mm	30±0.18mm
<i>Streptococcus oralis</i>	41±0.4mm	31±0.12mm	42±0.25mm	38±0.1mm
<i>Streptococcus mitis</i>	41±0.1mm	25±0.25mm	41±0.27mm	30±0.21mm
<i>Aerococcus viridans</i>	38±0.2mm	18±0.12mm	27±0.12mm	26±0.23mm
<i>Aerococcus viridans</i>	27±0.2mm	21±0.14mm	29±0.17mm	23±0.2mm
<i>Streptococcus mitis</i>	37±0.3mm	26±0.21mm	28±0.25mm	30±0.5mm
<i>Streptococcus oralis</i>	39±0.1mm	22±0.14mm	09±0.1mm	23±0.11mm
<i>Streptococcus mitis</i>	37±0.1mm	22±0.3mm	20±0.26mm	23±0.14mm
<i>Streptococcus mitis</i>	37±0.2mm	18±0.14mm	20±0.5mm	24±0.2mm

D'après les résultats obtenus, la pâte dentifrice et le bain de bouche présentent un effet inhibiteur contre la totalité des germes pathogènes de la cavité buccale avec des zones d'inhibition qui varient entre 18mm et 41mm (**Figure 3.14**).

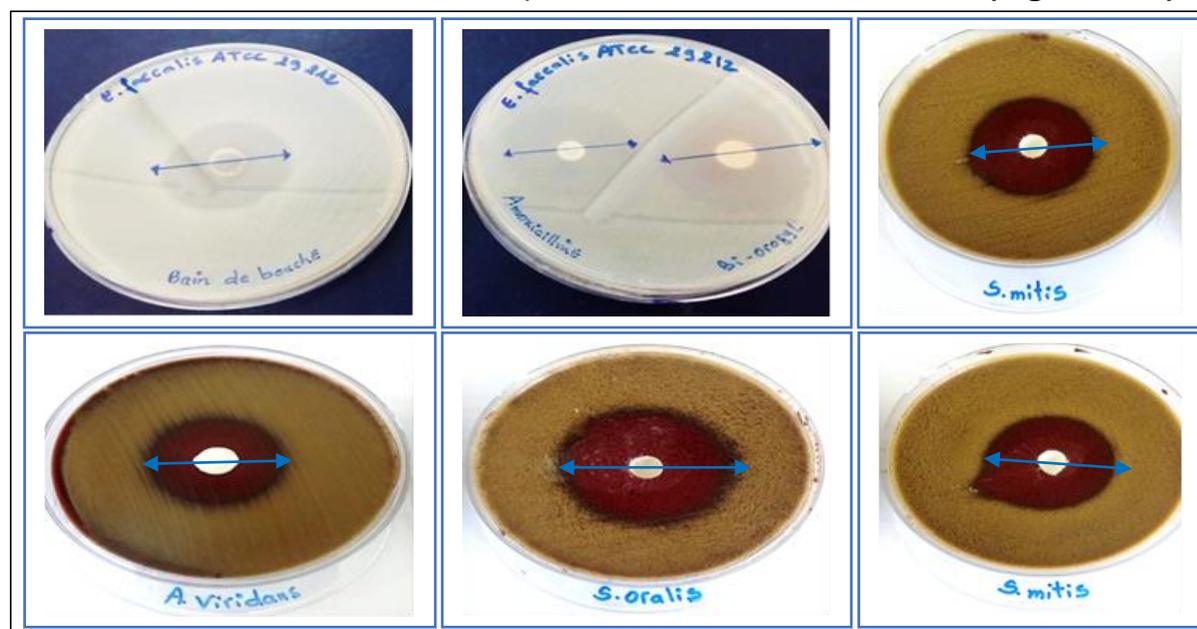


Figure 3.14. Sensibilité des germes oraux contre la pâte dentifrice (Photos originales,2021)

Nos résultats diffèrent de ceux publiés par **Mutha et al., [189]** en Inde, qui indiquent que l'extrait d'écorce de *J. regia* présente un potentiel inhibiteur contre les germes de la microflore salivaire. Une évaluation dose-dépendante a été analysée et enregistrée. En effet, **Mutha et al., [189]** ont mis en évidence que le diamètre de la zone est augmentée de 100 µg (8,75mm) à 250 µg (10,75mm). L'étude a également montré les potentiels antimicrobiens de la plante à différentes concentrations et peut être utilisée comme mesure préventive et thérapeutique en dentisterie.

Selon l'étude réalisée en Iran par **Sharafati-Chaleshtori et al., [190]**, l'extrait éthanolique des feuilles de noyer a été testé pour ses propriétés antimicrobiennes contre les micro-organismes de la plaque dentaire (*Streptocoques*).

Aussi, **Sharafati-Chaleshtori et al., [190]** montrent que les feuilles de noyer pourraient être utilisées comme une source de composés bioactifs naturels pour inhiber la croissance de différentes bactéries de Gram positives responsables de plaques dentaires et problèmes d'hygiène buccale. Les feuilles de noyer peuvent également constituer une bonne source de composés, à savoir les phénols, suggérant ainsi qu'ils peuvent être utiles dans la prévention des maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués [190].

Une autre étude réalisée par **Sudhanshu et al., [191]** sur l'efficacité antimicrobienne des dentifrices à base des herbes commercialisés en Inde, montrent que la pâte dentifrice "Dabur" connue sous le nom Miswak présente un effet antibactérien contre *Streptococcus salivarius ATCC 13419*, *Streptococcus mutans MTCC 890* et *Streptococcus mitis MTCC 2696* avec des zones d'inhibition qui varient entre (4,53mm ± 0,01 et 2,94mm ± 0,01), (4,95mm ± 0,01 et 3,08mm ± 0,01) et (6,33 mm ± 0,01 et 3,84mm ± 0,01) pour les concentrations 100% et 50% respectivement.

Une étude effectuée en Arabie Saoudite par **Al-sieni [192]**, indique que la plante *Salvadora persica* L., communément appelée miswak ou bâtonnet à mâcher a été utilisée par de nombreuses communautés islamiques comme bâtons à mâcher. L'extrait méthanolique de cette plante présente un pouvoir antibactérien remarquable contre les microorganismes suivant : *Streptococcus mutans* et *Streptococcus salivarius* avec un effet inhibiteur estimé à 29mm ± 6,2 et 23mm ± 4,4 respectivement.

L'étude statistique (Test ANOVA) est répertoriée dans l'appendice L.

En outre, la littérature scientifique a confirmé le potentiel antimicrobien des extraits de différentes plantes médicinales tel que : *Clou de girofle*, *Salvadora persica*..., indiquées comme remède préventif pour diverses maladies microbiennes des tissus durs de la cavité buccale en médecine traditionnelle.

3.3.4.3. Résultats du traitement endodontique

Les parodontites apicales sont parmi les lésions bucco-dentaires les plus compliquées qui nécessitent une prise en charge appropriée. Ce sont des infections au niveau des racines dentaires causées par un ensemble de microorganismes d'origine endodontique. Le traitement consiste alors à nettoyer, désinfecter ou obturer les racines des dents infectées. La désinfection des racines dentaires est une étape décisive dans laquelle des antiseptiques chimiques, surnommés solutions d'irrigation (SI), sont ordinairement utilisées. L'échec du traitement endodontique induit la persistance et l'aggravation de l'infection des tissus péri-apicaux ce qui est connu sous le nom d'infection endodontique persistante [98].

Enterococcus faecalis s'est présenté comme l'agent étiologique responsable de ce type d'infection [193]. L'émergence de *Enterococcus faecalis* dans les infections endodontiques est due à plusieurs facteurs, particulièrement sa résistance vis-à-vis des solutions d'irrigation utilisées [194].

Face aux problèmes des infections endodontiques et afin de remplacer les solutions d'irrigation chimiques appliquées actuellement, la recherche de nouveaux produits antiseptiques est indispensable.

Dans cette optique nous sommes intéressé à évaluer et à valoriser l'extrait de Siwak de *Juglans regia* L. sous forme d'une solution d'irrigation alternative vis-à-vis de la souche de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

a). Résultats du test de micodilution de la SI

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la solution d'irrigation préparée à base d'extrait ethanologique des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.24. Effet inhibiteur exprimé par les concentrations minimales inhibitrices (CMI en % v/v).

Espèce	CMI (SI) Siwak (v/v) %	CMI(SI) NaOCl (v/v)	CMB(SI) Siwak	CMB (SI) NaOCl
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	150	150	Bactéricide	Bactéricide

D'après le tableau 3.24, les deux solutions d'irrigation (Siwak et NaOCl) montrent un profil bactéricide contre *E. faecalis* ATCC 29212.

b). Résultats de Checkerboard assay test ou test de synergie antimicrobiens

La mesure de l'effet association des deux solutions d'irrigation a été obtenue en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICFI). Les résultats de cette étude sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 3.25. Indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICFI)

	CFI (SI Siwak)	CFI (SI NaOCl)	ICFI	Interprétation
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	0,01	0,51	Effet synergique

Ces résultats nous permettent de déduire que :

- Les deux solutions d'irrigation testées ont agi d'une manière synergique sur *E. faecalis* ATCC 29212.
- Pas d'effet d'antagonisme ont été détectés dans la combinaison des deux solutions d'irrigation.
- Les résultats obtenus se traduisent par une interaction positive de la solution d'irrigation formulée à base de Siwak de *Juglans regia* L. et la SI utilisée dans les soins endodontiques en dentisterie.

c). Evaluation des solutions d'irrigation préparées

L'efficacité du traitement a été déterminée selon la réduction décimale des cellules viables (UFC) de *Enterococcus faecalis* récupérées à partir des biofilms. Les résultats de cette expérience *in vitro* sont illustrés par la **figure 3.15**.

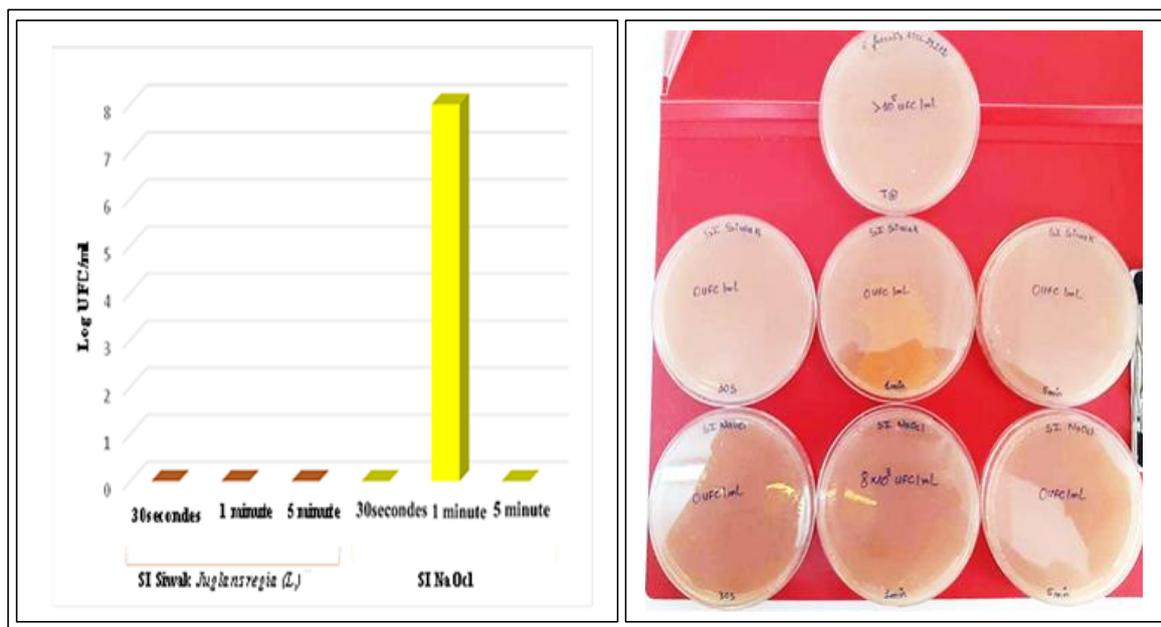


Figure 3.15. Réduction du Log UFC de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 par les solutions d'irrigations

D'après les résultats obtenus, on constate que la solution d'irrigation à base de Siwak de *Juglans regia* L. a totalement réduit le nombre du Log UFC de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 dans les trois temps d'exposition par rapport au témoin positif ($>10^5$ UFC/ml). Il convient de signaler, que la SI NaOCl n'a pas pu éradiquer les cellules de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 pendant 1minute d'exposition. Cela indique que probablement le temps de contact n'était pas suffisant pour détruire les cellules bactériennes.

En effet, la résistance des microorganismes en biofilm vis-à-vis des antiseptiques chimiques est attribuée, soit à l'inhibition de leur accès, soit à la neutralisation de ces agents antimicrobiens comme le NaOCl par la matrice extracellulaire (EPS) [195], ce qui influe sur son activité et élargit le temps de son action [196].

Il existe peu de travaux sur l'évaluation des métabolites secondaires issus de plantes comme des alternatifs dans les traitements endodontiques. Parmi ces travaux, on cite l'étude de **Samadi et al., [197]**, qui ont évalué l'effet de l'huile essentielle de *Satureja khuzistanica* vis-à-vis de *E. faecalis* par rapport à la Chlorhexidine à 2% et le NaOCl à 2,5%.

3.3.5. Résultats de l'innocuité cutanée de la crème dermique antifongique 2%

Le Patch test humain ou test épicutané est le test phare en dermatologie de contact qui permet d'étudier la tolérance cutanée. Ce test consiste à appliquer localement un produit sous patch occlusif ou semi occlusif dans le bras ou le dos du volontaire. Le protocole utilisé a été établi pour chaque volontaire.

Le suivi de l'essai clinique permet de relever la tolérance de la crème à base d'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. . Dans notre étude, le test a été réalisé chez 26 volontaires (18 femmes et 8hommes) dont l'âge varie entre 12-72 ans, par application topique de la crème formulée sous patch au niveau du pli du coude pendant 24h, 48h et 96 heures. D'après les résultats obtenus, la crème est dépourvue de tout effet inducteur d'irritabilité ou de sensibilisation de la peau (**Tableau 3.26**).

Tableau 3.26. Réactions cutanées après application de la crème antifongique 2% (Patch test).

Volontaires	Sexe	Age (ans)	Antécédents allergiques	Erythème	Œdème	Prurit	Vésicules	Lecture totale 96h
1	F	28	RAS	-	-	-	-	-
2	F	36	Dermatite atopique	-	-	-	-	-
3	H	28	RAS	-	-	-	-	-
4	F	44	RAS	-	-	-	-	-
5	F	45	RAS	-	-	-	-	-
6	F	28	RAS	-	-	-	-	-
7	H	30	RAS	-	-	-	-	-
8	H	50	RAS	-	-	-	-	-
9	F	37	RAS	-	-	-	-	-
10	F	26	RAS	-	-	-	-	-
11	F	37	Allergique aux pistaches	-	-	-	-	-
12	F	29	RAS	-	-	-	-	-
13	F	29	RAS	-	-	-	-	-
14	F	28	RAS	-	-	-	-	-
15	F	29	Acariens	-	-	-	-	-
16	H	28	Dermatite atopique	-	-	-	-	-
17	H	29	RAS	-	-	-	-	-
18	F	24	RAS	-	-	-	-	-
19	F	35	RAS	-	-	-	-	-
20	H	72	RAS	-	-	-	-	-
21	H	62	RAS	-	-	-	-	-
22	F	56	RAS	-	-	-	-	-

23	F	37	RAS	-	-	-	-	-	
24	F	28	RAS	-	-	-	-	-	
25	H	12	RAS	-	-	-	-	-	
26	F	31	RAS	-	-	-	-	-	
Irritation totale									-
Résultats									Non irritante

RAS : rien à signaler ; - : négatif, absence de réaction

La crème dermique 2% formulée n'a provoqué aucune réaction allergique à l'ensemble des volontaires qui ont participé à l'étude de la toxidermie (**Figure 3.16**). Cela peut être en rapport avec la nature chimique des feuilles de noyer qui, autrefois, étaient utilisées comme remède topique dans le traitement des problèmes de la peau tel que, l'eczéma, les ulcères cutanés, les coups de soleil et les brûlures superficielles, sans provoquer des irritations [164][165].

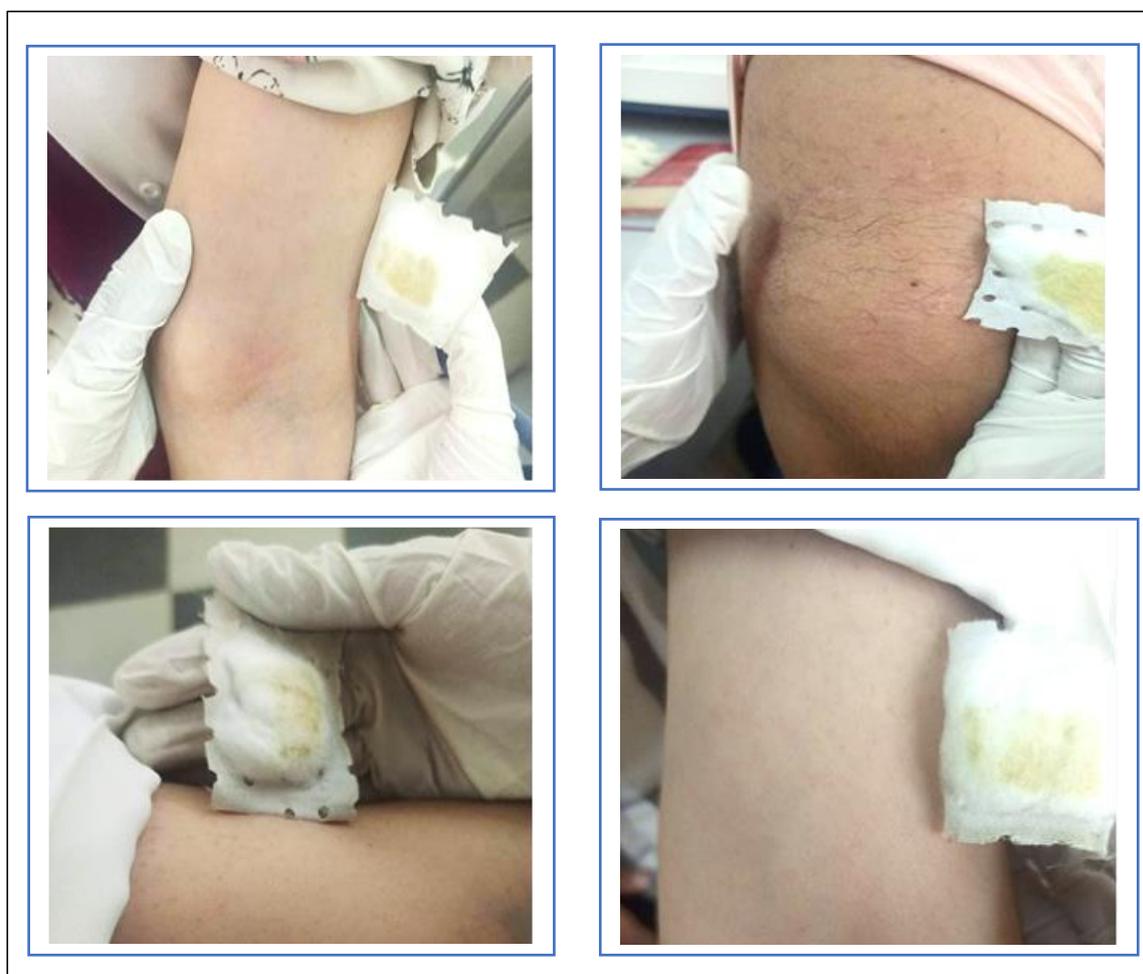


Figure3.16 : Résultats du Patch test (Photos originales, 2021).

3.3.6. Résultats de la cytotoxicité érythrocytaire (myéloïde) *in cellulo*

Selon **Haddouchi *et al.*, [198]**, une plante pourvue d'un pouvoir antioxydant puissant, son utilisation en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques sera impossible en présence de son effet hémolytique, connu comme un indicateur de cytotoxicité. Ainsi, le test d'hématotoxicité *in cellulo* a été évalué.

L'observation microscopique (Gx100) des différents échantillons des cellules érythrocytaires (frottis sanguins) et de témoin positif sont présentés dans la **figure 3.17**.

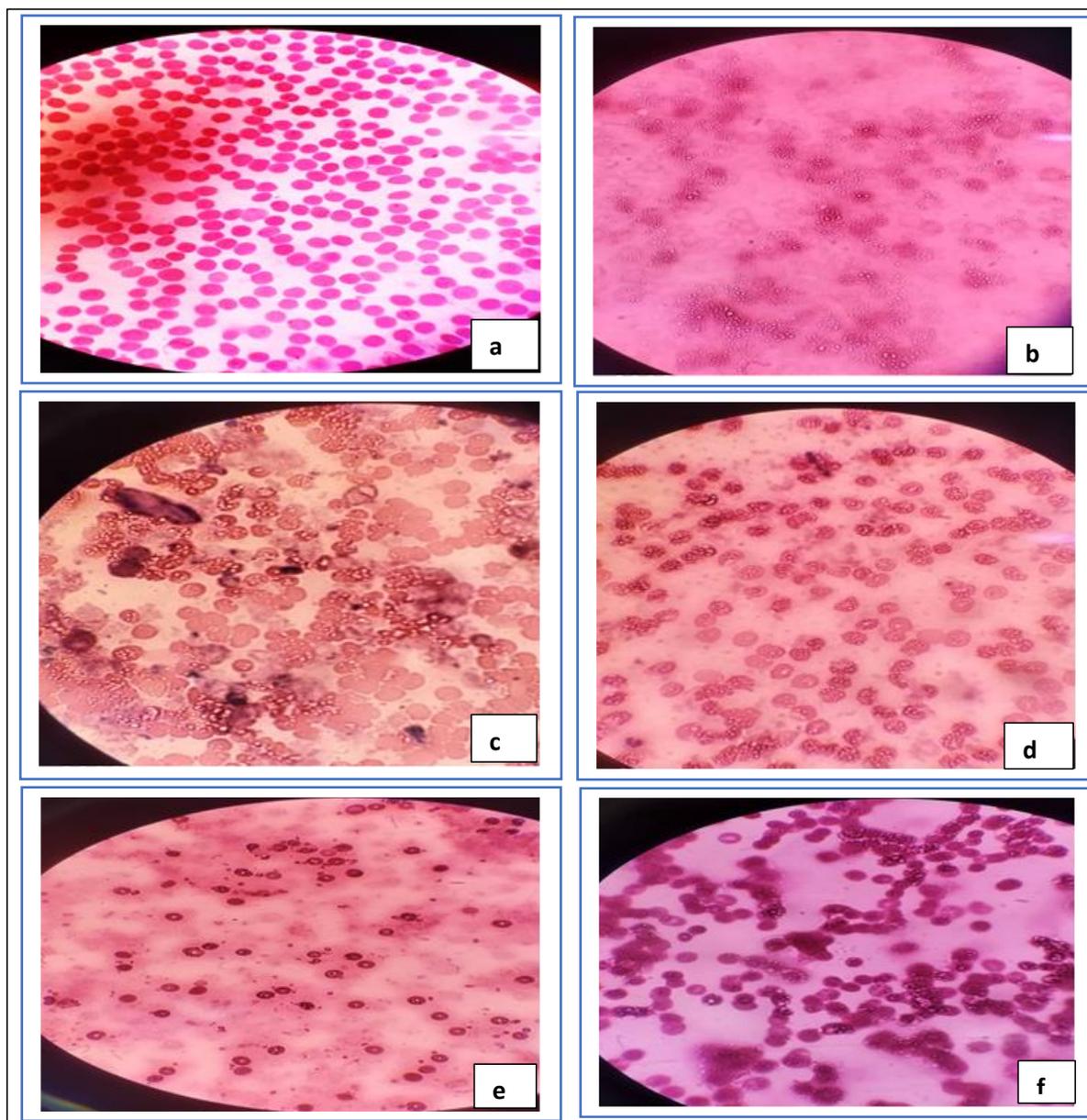


Figure3.17 : Toxicité érythrocytaire sous microscope x100 (Photos originales, 2021).

a : sang total, b : H₂O₂, c : NaCl, d : vitamine C, e : extrait écorces, f : extrait feuilles

D'après la figure ci-dessus, la forme normale des globules rouges observés sous microscope optique indique l'absence d'un effet cytotoxique des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces de *Juglans regia* L. contrairement au contrôle positif (H₂O₂), où les cellules érythrocytaires ont perdu leur morphologie normale en raison de la déstabilisation membranaire.

L'efficacité de la protection contre l'effet hémolytique des extraits éthanoliques de *Juglans regia* L. serait due à la capacité des composés phénoliques, dont les flavonoïdes, à neutraliser les radicaux libres générés par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), protégeant ainsi les membranes érythrocytaires contre la lyse.

En effet, certains auteurs notent que les flavonoïdes sont des composés bioactifs généralement cytotoxiques. Cette toxicité dépend d'une part de leur glycolisation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation [199]. On suppose que la structure des flavonoïdes présents dans nos extraits ne correspondrait pas à celle des flavonoïdes à activité cytotoxique.

Ramchoun et al., [121] ont montré que les flavanols et les procyanidines (classe des flavonoïdes) peuvent interagir efficacement avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes en s'accumulant à la surface de la membrane formant ainsi une barrière, ce qui permet de réduire l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique. Par ce mécanisme les flavonoïdes pourraient donc maintenir l'intégrité membranaire.

3.3.7. Résultats de la cytotoxicité lymphoïde *in cellulo*

Le test de cytotoxicité a été réalisé en utilisant le bleu de méthylène. En microscopie optique, les granulocytes morts apparaissent colorés en bleu foncé suite à la pénétration irréversible du colorant, contrairement aux cellules vivantes qui restent transparentes non colorées (**Figure 3.18**).

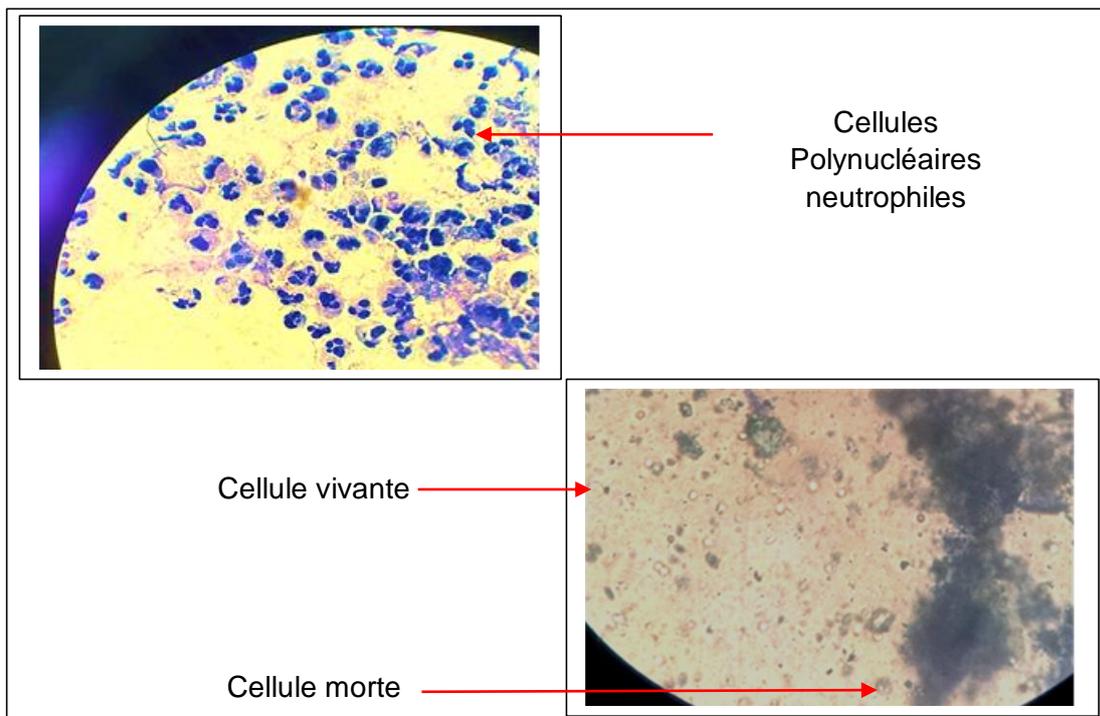


Figure 3.18. Morphologie des neutrophiles observés sous microscope photonique au grossissement x 40 (Photo originale, 2021).

Le taux de viabilité cellulaire est déterminé par dénombrement sous microscope optique à Gx40. Un comptage a été établi pour chaque échantillon biologique (Liquide céphalo-rachidien, liquide d'ascite et liquide articulaire). Les figures suivantes représentent le pourcentage de viabilité cellulaire pour les deux extraits éthanoliques utilisés comme source de principes actifs dans les formulations.

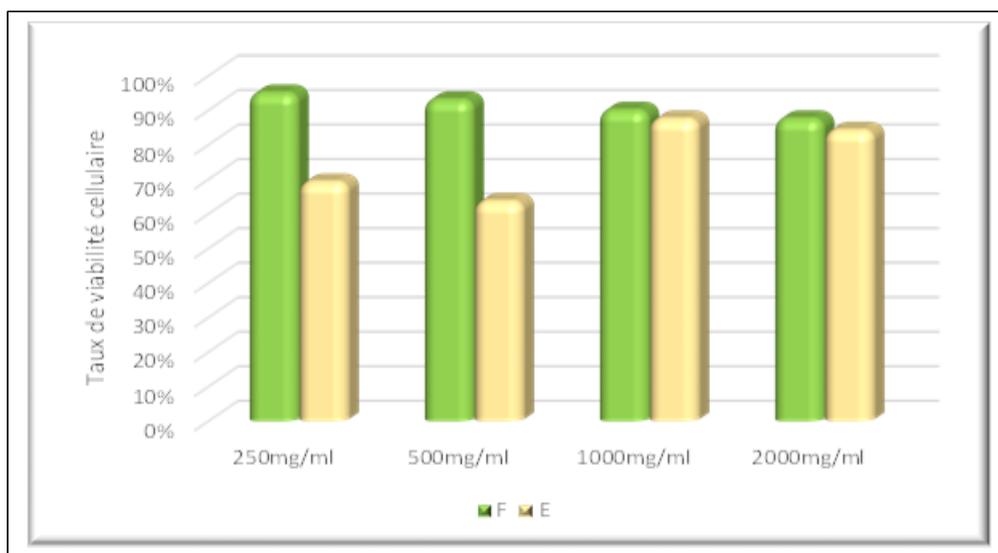


Figure 3.19. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide céphalo-rachidien

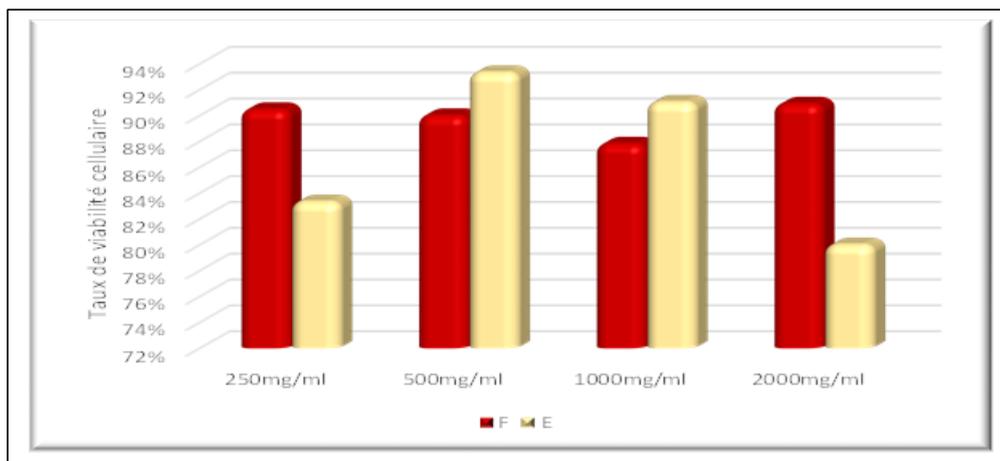


Figure 3.20. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide d'ascite

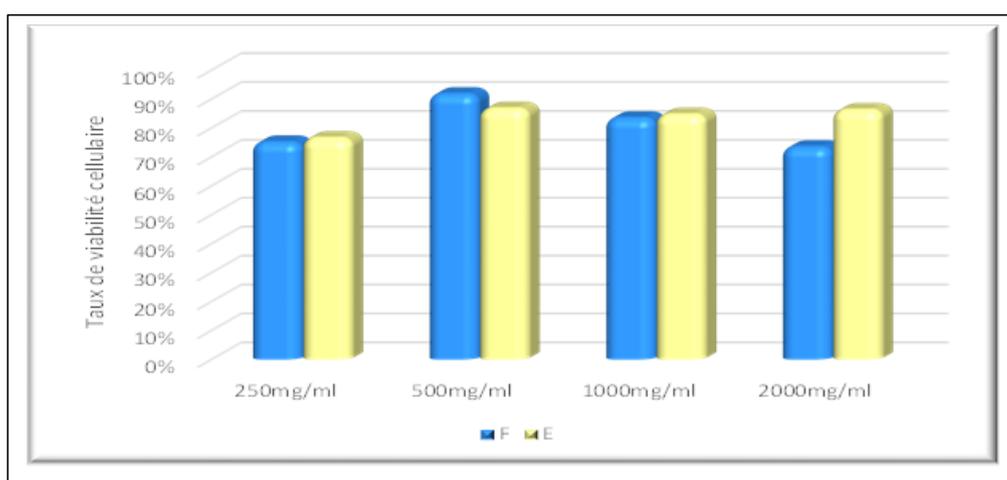


Figure 3.21. Taux de viabilité cellulaire dans le liquide articulaire

Les taux de viabilité des granulocytes et des lymphocytes issus de différents liquides biologiques, dépasse les (80%) pour l'extrait éthanolique des feuilles et les (76%) pour l'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* L. . Ce qui signifie que le taux de mortalité des cellules de la lignée lymphoïde est négligeable.

Ces résultats ont montré que les deux principes actifs incorporés dans l'ensemble des formulations pharmacologiques valorisées ne présentent aucun effet toxique sur les cellules même à fortes concentrations.

La non toxicité des deux extraits éthanoliques confirme l'usage très intéressant de cette plante en médecine traditionnelle.

3.3.8. Résultats de l'activité antioxydante

Les activités antiradicalaires des extraits éthanoliques de *Juglans regia* L. et de témoin positif (acide ascorbique) ont été déterminées par la méthode au DPPH

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits éthanoliques (**Figures 3.22 et 3.23**) sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH (IC50), correspondant ainsi à la concentration des extraits capables de piéger 50% de DPPH.

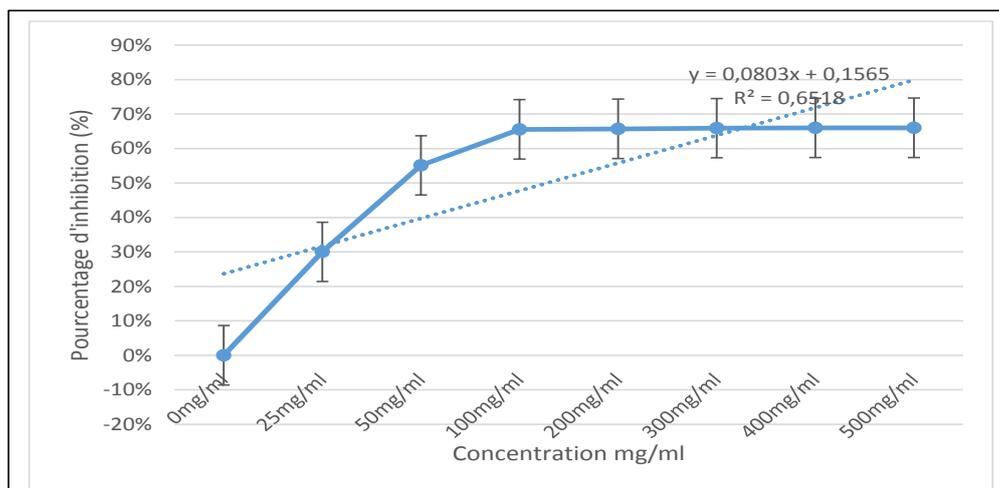


Figure 3.22. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L.

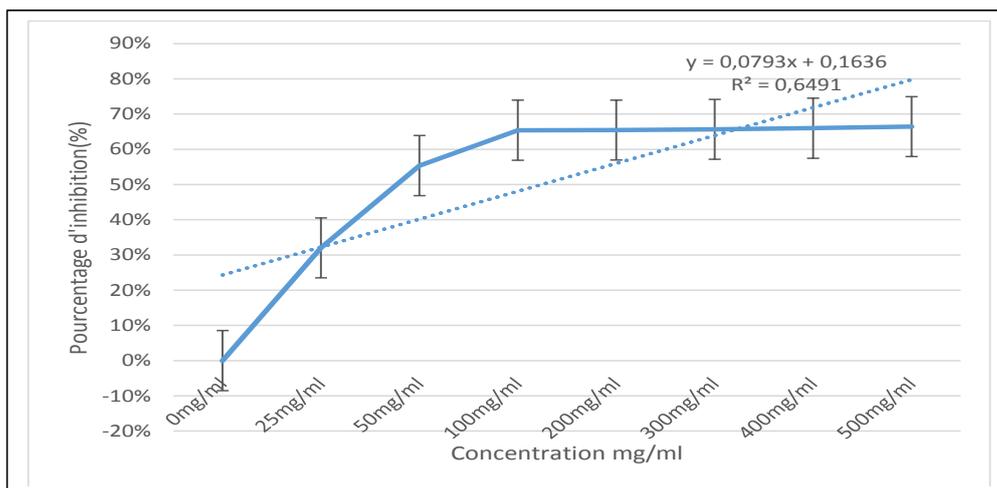


Figure 3.23. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L.

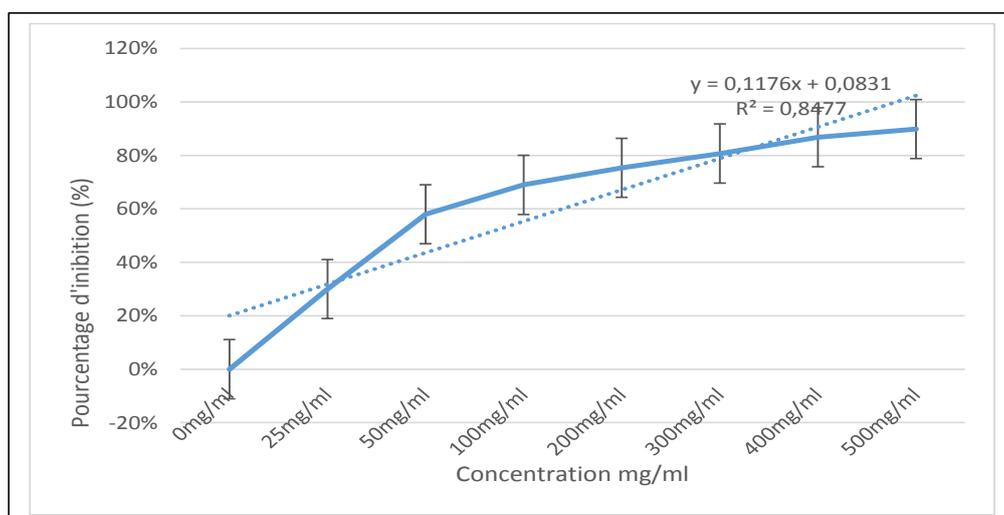


Figure 3.24. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine C .

D'après les figures, on remarque que la vitamine C (**Figure 3.24**) présente une forte capacité réductrice de la forme radicalaire du DPPH. On note aussi une activité antioxydante remarquable dans les deux extraits éthanoliques, qui à faible concentration estimée de 50mg/ml, ils réduisent plus de 50% ($EC_{50} = 50\text{mg/ml}$) des radicaux DPPH.

Selon **Qamar et Sultana [64]**, l'acétate d'éthyle, du butanol, extrait de méthanolique, d'éther et de méthanol aqueux des cerneaux, des coques et des feuilles de noix a montré une forte activité antiradicalaire.

En Algérie, l'étude de **Bennacer et Cherif [165]** a montré qu'à la concentration de 0,4 mg/ml de l'extrait aqueux des feuilles de *Juglans regia* L., le pourcentage d'inhibition radicalaire est plus élevé estimé à 73,14%.

Au Japon, **Fukuda et al., [159]** a trouvé que les extraits du fruit de *Juglans regia* L. possèdent une activité antioxydante puissante. Cette activité pourrait être liée, en partie, à leur richesse en composé phénoliques.

Conclusion et Perspectives

Au terme de cette étude de recherche, les travaux entrepris ont permis de mettre en valeur *Juglans regia* L. par la caractérisation phytochimique de divers métabolites secondaires et l'évaluation de son potentiel thérapeutique.

L'analyse de la composition chimique par HPLC a permis d'identifier 20 composés contenus dans chaque extrait (Feuilles et écorces). Cette investigation phytochimique a mis en évidence la richesse de cette espèce en molécules bioactives tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et leurs dérivés.

La formulation des produits pharmaceutiques (solution antiseptique 2%, crème dermique 2%, pâte dentifrice, bain de bouche et solution d'irrigation) a permis de mettre en exergue certaines propriétés thérapeutiques au profit des soins et l'hygiène humaine.

Concernant les contrôles galéniques, l'ensemble des produits formulés à base des extraits éthanoliques ont révélés une bonne stabilité physico-chimiques et une conformité microbiologique.

Un tel criblage biologique et pharmacologique nous a permis de sélectionner des pathologies humaines qui présentent un véritable problème de santé publique.

Ainsi, l'incorporation des extraits éthanoliques comme agents antimicrobiens dans la préparation des produits pharmaceutiques était nécessaire afin d'évaluer leur propriétés antibactériennes et antifongiques *in vitro*, d'une manière qualitative par les techniques : aromatoigramme, antibiofilmogramme, antifongigramme, puis quantitative par la méthode de micro dilution sur microplaques et par le checkerboard assay test.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* L. incorporé comme principe actif antimicrobien dans la formulation de la solution antiseptique 2%, a montré une grande action inhibitrice (>30mm) sur la croissance des germes pathogènes incriminés dans les infections ostéoarticulaires sur matériel (IOAM) en chirurgie orthopédique éliminant ainsi toute trace de formation de biofilm.

La crème dermique 2% formulée à base d'extrait éthanolique des feuilles de *J.regia* L. a dévoilé une excellente tolérance cutanée avec une absence totale d'irritation dermique, formation d'érythème ou d'œdème, révélant ainsi *in vitro* d'intéressantes propriétés antifongiques contre les maladies dermatologiques superficielles (onychopathies), avec des pourcentages d'inhibition très importants dépassant les 50%.

Aussi, la solution antiseptique 2% formulée a manifesté un pouvoir fongicide sur toutes les souches *Candida* en comparaison avec les traitements antifongiques commercialisés qui présentent parfois un profil fongistatique.

La pâte dentifrice et le bain de bouche formulés à base de Siwak de *J.regia* L. ont montré également un potentiel anticariogène sur la croissance des germes pathogènes des infections bucco-dentaires avec des zones d'inhibition très importantes qui varient entre 18mm et 60mm.

Concernant l'étude *In vitro*, la solution d'irrigation à base de Siwak de *J.regia* s'est montré très efficace vis-à-vis des biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pendant 30 secondes de contact. La potentialisation de l'activité par la combinaison de la SI avec les antiseptiques les plus utilisés en endodontie (NaOCl) envers *E. faecalis* a montré un effet synergique. L'utilisation de cette solution d'irrigation présente une bonne alternative aux antiseptiques chimiques pour les soins profonds en dentisterie.

Les deux principes actifs incorporés dans l'ensemble des produits pharmaceutiques formulés ne présentent aucune toxicité cellulaire (myéloïde et lymphoïde), avec un taux de viabilité dépassant les 76%.

L'activité anti-oxydante des différents extraits éthanoliques a présenté un pouvoir anti-radicalaire excellent, qui à faible concentration estimée de 50mg/ml, les deux extraits piègent plus de 50% des radicaux DPPH (EC50= 50mg/ml). Ceci nous permet de suggérer que nos produits pharmaceutiques formulés pourraient être utilisés comme une bonne source d'antioxydants naturels, utiles pour prévenir ou ralentir la progression de diverses maladies liées au stress oxydant, qui pourraient avoir des applications diététiques.

A la lumière de ces résultats encourageants, il serait intéressant de poursuivre d'autres investigations : sur le plan phyto-chimique, pharmacologique et activités biologiques par :

- Des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs (extraits éthanoliques) pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques ;
- L'étude des mécanismes d'action et des facteurs influençant l'efficacité des extraits obtenus ;
- Elucidation des interactions possibles entre les composés isolés et les autres classes de métabolites secondaires.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADH :	Argénine déshydrogénase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AFNOR :	Association française de normalisation
AGMI :	Acide gras mono-insaturé
AGPI :	Acide gras poly-insaturé
Ak :	Amikacine
Amos :	Ablation du matériel d'ostéosynthèse
Amx :	Amoxicilline
APG III :	Angiosperm Phylogeny Group
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC:	American Type Culture Collection
AtIA :	Autolysine A
AtIE:	Autolysine E
BHIB :	Bouillon Cœur-Cervelle
CAC :	Centre anti-cancer
CFI :	Concentration fractionnelle inhibitrice
CHU :	Centre hospitalo-universitaire
CHX :	Chlorehexidine
CLSI :	Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale
CMF :	Concentration minimale fongicide
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CMIB :	Concentration minimale inhibitrice de biofilm
Covid:	Corona Virus Disease
Cz:	Céfazoline
DPPH :	1,1-Diphényl-1,2picryl-hydrazyl
EC₅₀ :	Efficient concentration 50
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène

FeCl₃	Trichlorure de fer
Fox	Céfoxitine
GLYG	Glycogène
GSC	Gélose au sang cuit
H₂S	Sulfate d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
Hip	Acide hippurique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
ICDRG	International Contact Dermatitis Research Group
IND	Indole
IOAM	Infection ostéo-articulaire sur matériel orthopédique
KOH	Hydroxyde de potassium
LAP	L-leucine-β-naphthylamide
LCR	Liquide céphalorachidien
LDC	Lactate décarboxylase
MEC	Matrice extracellulaire
MF	Mc-Farland
MGG	May-Grünwald Giemsa
MH	Müller Hinton
MHL	Müller–Hilton liquide
MRSCN	<i>Staphylococcus epidermidis</i> résistant à la Méthicilline
MTCC	Microbial Type Culture Collection
NA	Acide nalidixique
NaOCl	Hypochlorite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH₄OH	Ammoniaque
ODC	Ornithine décarboxylase
Ox	Oxacilline
P	Pénicilline
PAL	2-naphthyl Phosphate

PBS :	Tampon phosphate salin
PG :	Propylène glycol
pH :	Potentiel d'hydrogène
PTG :	Prothèse total de genou
PTH :	Prothèse totale de hanche
PYRA :	Acide pyroglutamique- β -naphthylamide
RiB :	Ribose
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SA 2% :	Solution antiseptique 2%
SARM :	<i>Staphylococcus aureus résistant à la Méthicilline</i>
SI :	Solution d'irrigation
SXT :	Cotrimoxazole
TCP :	Technique de tissu en plaque
TDA :	Tryptophane désaminase
TPS :	Tampon phosphate salin
TSE :	Tryptone sel
UFC :	Colonie formant unité
URE :	Urée
UV-Vis :	Ultra violet visible
VP :	Pyruvate de sodium
VRBL :	Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre
α-GAL :	6-bromo-2-naphthyl- α D-Galactopyranoside
β-GAL :	2-naphthyl - β D-Galactopyranoside
β-GUR :	β -Gurose
ω3:	Oméga 3
ω6:	Oméga 6

APPENDICE B

Glossaire

Arthralgie : est une pathologie caractérisée par une douleur et inflammation d'une articulation et du tissu environnant.

Clou centromédullaire : est une tige métallique enfoncée dans la cavité médullaire d'un os.

Exanthème : est une éruption cutanée qui apparaît de façon brusque sur le corps. Elle se manifeste par une rougeur transitoire de la peau due à une vasodilatation des vaisseaux cutanés superficiels, pouvant s'accompagner d'un œdème.

Fixateur externe : Matériel utilisé en chirurgie orthopédique, et consistant à maintenir l'alignement des os cassés au moyen de barres métalliques munies de tiges qui traversent la peau. Cette chirurgie lourde est réservée aux traumatismes graves ayant entraîné de multiples fractures sur un seul os.

Herpès simplex : est une maladie virale pouvant affecter la peau et les muqueuses. Le virus est transmis par contact direct des muqueuses buccales provoquant alors une infection oro-faciale ou labiale.

Infection nosocomiale : désigne une infection associée aux soins. Elle se manifeste au cours ou au décours d'une hospitalisation. Elle doit donc impérativement être absente à l'admission du patient dans l'établissement et se déclarer au minimum 48h après l'admission.

Intertrigo : est une dermatose localisée aux plis cutanés, qu'ils soient atteints isolément ou ensemble, grands (plis inguinaux, interfessier, axillaires, sous-mammaires) ou petits (interdigito-palmaires, interorteils, ombilic, rétro-auriculaires).

IOAM : Une infection ostéo-articulaire est une infection à bactéries, beaucoup plus rarement à champignons qui se développe au dépend d'un os et/ou d'une articulation, en présence ou non de matériel étranger (prothèse de hanche, de genou, d'épaule, mais aussi plaque, clou, vis, fixateur externe...)

LCR : Le liquide céphalorachidien, aussi connu sous le nom de liquide cérébrospinal est un liquide biologique clair et incolore dans lequel baigne le système nerveux central, encéphale et moelle épinière.

Liquide articulaire : L'épanchement de synovie est une accumulation de liquide qui se caractérise par un gonflement de l'articulation. Il se localise généralement au niveau du genou et engendre douleurs et difficultés à bouger.

Liquide d'ascite : L'ascite est une accumulation de liquide dans l'abdomen. A l'origine généralement, un problème au niveau du système digestif (et notamment la cirrhose ou l'hépatite alcoolique). Si elle n'est pas une condition mortelle, elle peut toutefois être le signe d'une atteinte hépatique sévère.

Maladie parodontale : C'est une maladie d'origine infectieuse (bactéries) qui touche et détruit les tissus de soutien des dents (gencives et os).

Matériel d'ostéosynthèse : Il s'agit de l'utilisation d'un matériel orthopédique (clous, vis, broches, plaques de métal, fixateurs externes, etc.) destiné à maintenir en place les différents fragments d'une fracture le temps que celle-ci se consolide ou à fixer une articulation instable.

Muguet buccal : est une mycose de la bouche causée par la prolifération d'un type de champignon unicellulaire appelé "*Candida albicans*". En présence de certains facteurs, les levures se multiplient de manière incontrôlable et entraînent une infection fongique. Dans le cas du muguet, l'infection siège dans la cavité oro-pharyngienne.

Onychomycose : appelée aussi mycose unguéale est une mycose des ongles. Une mycose de l'ongle peut être due à plusieurs espèces de champignons microscopiques ; le plus souvent ce sont des dermatophytes (surtout aux pieds), puis des levures du genre *Candida* (surtout aux mains) et plus rarement encore des moisissures.

Prionyxis : est une inflammation des tissus qui entourent l'ongle.

Teigne de cheveux : La teigne est une mycose infectant les cheveux ou les poils. Elle est due à des champignons appelés "dermatophytes". On désigne également les teignes sous le nom de dermatophyties du cuir chevelu. Ce n'est pas une maladie grave, mais elle est très contagieuse.

APPENDICE C

Instruments, Appareillages et réactifs utilisés

▪ Verreries et consommables

Micropipettes	Tubes à vis
Tubes à essai	Microplaques à 96 puits
Boites de Pétri	Papier filtre
Eppendorf	Poupinelle/ Autoclave
Embouts	Ecouvillons
Pipettes pasteur	Lames /lamelles
Cuve de développement	Becher, Erlenmeyers, ballon
Tubes coniques	Spatule métallique
Tubes vacutiner	Lame bistouri
Flacons en verre	

▪ Appareillage

Etuve	Microscope optique
Plaque chauffante	Agitateur magnétique
Balance de précision	Chromatographe HPLC
Evaporateur rotatif	Centrifugeuse
Vortex	pH mètre
Bain marie	Bec bunsen

▪ Solvants et réactifs

Ethanol 96%	NaOH
DPPH	NH ₄ OH
L'eau physiologique	Eau à 1% acide acétique
KOH	Méthanol grade HPLC
HCl	Propylène glycol (PG)
FeCl ₃	Plantacare®818
TPS	Méthylisothiazolinone
	Crystal violet

Akypo

Carbomer 980

Tween 80

Benzoate de Sodium

Saccharinate de sodium

Sodium fluoride

Eau diminéralisée

Silice de reubourg

Silice colloïdale

Oxyde de titane

Texapon n70

Triclosan

H₂O₂

PBS

Acide ascorbique

α- tocophérol

May-Grünwald

Solution Giemsa

Huile à émulsion

APPENDICE D

Composition des milieux de culture

Gélose nutritive (GN) Peptone : 6g Extrait de viande : 1g Extrait de levure : 2g NaCl: 5g Agar : 20g Eau distillée : 1000mL pH : 7,2	Bouillon nutritif Peptone : 6g Extrait de viande : 1g Extrait de levure : 2g NaCl: 5g Eau distillée : 1000 mL pH : 7,2
Milieu Mueller Hinton (MH) Extrait de viande : 3g Acide hydrolysa de caséine 17g Amidan 1,5g Agar 20g Eau distillée : 1000mL pH : 7,2	Solution de KOH à 30% KOH10g Glycérol10ml Eau distillée80ml
Sabouraud chloramphenicol Glucose40g Peptone10g Agar17g Chloramphénicol0, 5g Eau distillée.....1000ml	Sabouraud gentamicine Glucose40g ou 20 g Peptone10g Agar17g Gentamicine1ml Eau distillée.....1000ml

APPENDICE E
Screening phytochimique

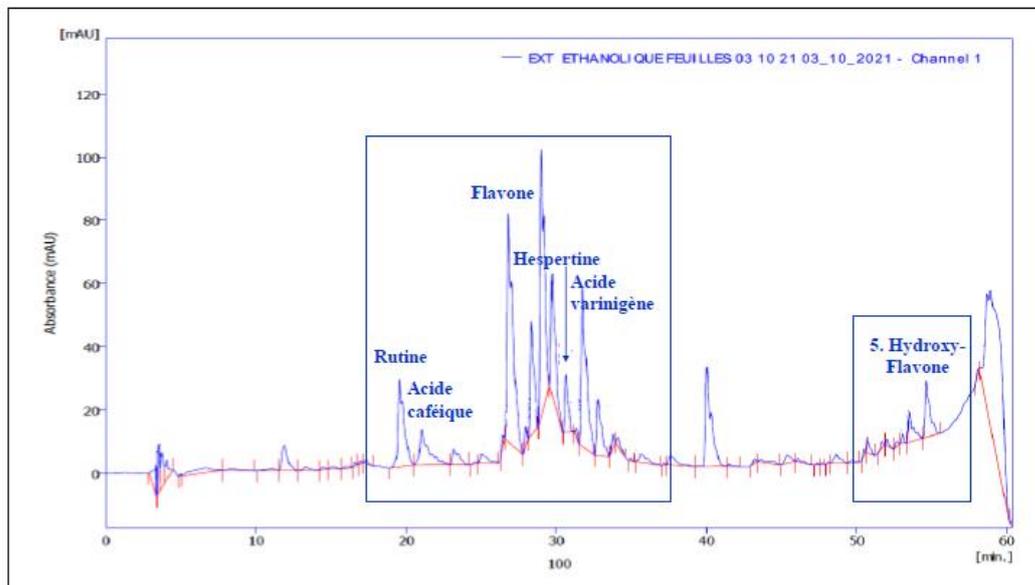


APPENDICE F

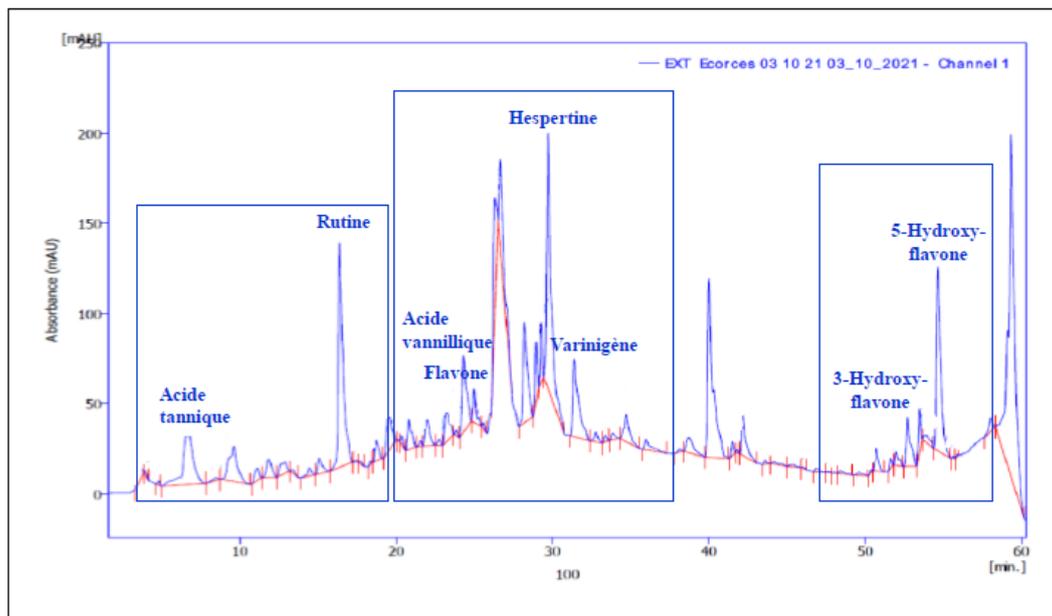
Empreinte chromatographique HPLC



Profils chromatographiques des extraits par HPLC



Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* (L.) visualisé à 254nm.



Chromatogramme de l'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* (L.) visualisé à 254nm.

APPENDICE G

Enquête sur les infections en chirurgie orthopédique

Enquête sur les infections en Chirurgie Orthopédique



Q1 : Quel est le type du matériel d'ostéosynthèse le plus utilisé en chirurgie orthopédique ?

.....
.....

Ainsi que les prothèses ?

a) PTH

d) P. de coude

b) PTG

e) P. de la cheville

c) P. Cervico-céphalique

f) P. d'épaule

Q2 : Est-ce que l'implantation orthopédique peut conduire à des complications ?

Oui

Non

Si oui, trouvez-vous que l'infection sur matériel est la plus grave ?

Oui

Non



Pourquoi ?

Q3 : En cas de sepsis précoce :

Si vous suspectez une infection, qu'elles sont les mesures d'hygiène à prendre en cas d' ?

- Infection aigüe :
- Tissu nécrosé :
- Plaie chirurgicale perforée :
- Infection chronique :

Q4 : Trouvez-vous que les produits d'asepsie suivants : (Sérum salé – Dakin- Bétadine 10% - L'eau oxygénée) possèdent une activité antiseptique suffisante pour éradiquer le germe en cause ?

.....

Q5 : Bétadine 10% (Providone iodée) et effet oxydant sur le métal :

Conseillez-vous d'éviter l'utilisation de la solution Bétadine 10% et la remplacer par un autre produit antiseptique pour les soins des infections sur matériel d'ostéosynthèse ?

Oui

Non

Q6 : Que pensez-vous d'un produit antiseptique naturel à base de molécules à activités thérapeutiques sans effets secondaires qui peut répondre aux traitements locaux des infections ostéo-articulaires ?

.....



Merci Pour Votre
Participation



APPENDICE H

Technique de coloration de Gram

- ❖ Réaliser un frottis ou un étalement.
- ❖ Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60°C (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- ❖ Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mn.
- ❖ Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- ❖ Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- ❖ Laver à nouveau à l'eau.
- ❖ Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- ❖ Laver à l'eau.
- ❖ Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- ❖ Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- ❖ Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

APPENDICE H

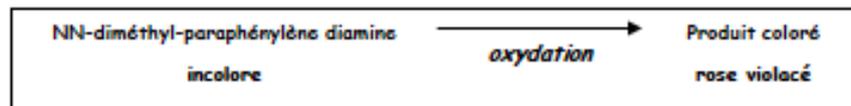
L'OXYDASE

1. Intérêt

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

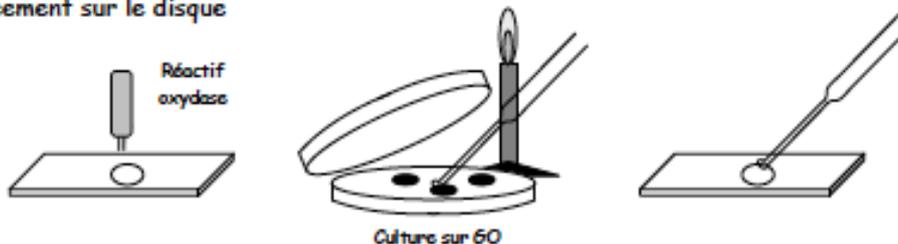
2. Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



3. Technique

- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque

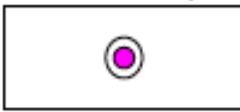


Remarques :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

4. Lecture

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase + 	Oxydase - 

Causes d'erreurs :

- réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cacher une respiration)
- humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif
- quantité de bactéries insuffisante
- réactif périmé (l tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- utilisation d'un instrument « oxydase + »
- lecture trop tardive : au delà de 30 secondes

APPENDICE H

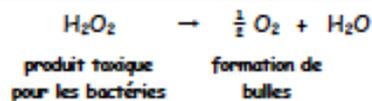
LA CATALASE

1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

2. Principe

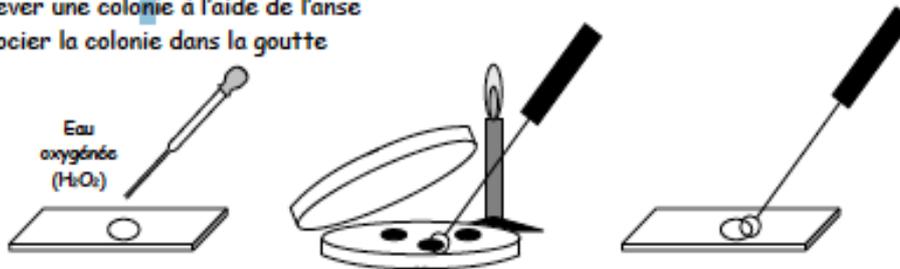
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + 	Catalase - 

Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu contenant la catalase
Exemple : réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- o quantité de bactéries insuffisante
- o eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

APPENDICE J

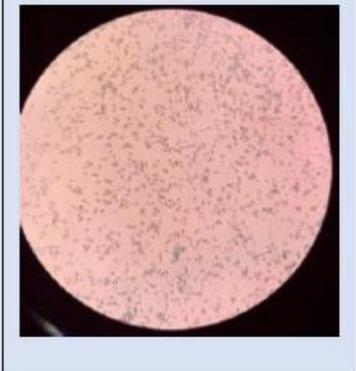
Matériel de prélèvement mycologique



Antifongiques de référence



Caractères macroscopiques et critères d'indentification des levures

Espèce	Duré de poussé	Macroscopie	Microscopie
<i>Candida sp</i>	24-48h	Colonies blanchâtres, crémeuses 	Levures rondes ou ovales isolées ou bourgeonnantes de 2 à 4 μ de diamètre 

APPENDICE K

Technique d'identification par Auxacolor™₂

Principe :

- Amener les réactifs à température ambiante avant utilisation,
- Ensemencement de la microplaque : Préparer l'inoculum à partir d'une culture de 24 à 48h,
- Dans des conditions stériles, ensemercer le milieu de suspension (R2) avec des colonies de souche pure en quantité suffisante (1 à 5 colonies identiques) pour obtenir une opacité équivalente au témoin d'opacité fourni dans le kit (opacité égale à 1,5 McFarland).
- Il est nécessaire de respecter l'opacité de l'inoculum pour garantir la qualité des résultats.
- Remplir les puits de la microplaque avec 100µl de la suspension préparée ;
- Recouvrir la microplaque avec l'adhésif en s'assurant que l'adhésion est parfaitement uniforme. Incuber à 48h (72h si nécessaire) à 27°C (± 2°C).

La lecture définitive doit s'effectuer à 48H. Même si une première lecture à 24H peut déjà donner un code correct et permettre l'identification de certaines levures, il est recommandé de réaliser l'interprétation définitive à 48H.

Guide d'interprétation des réactions colorées :

Pour le glucose, maltose, saccharose, galactose, lactose, raffinose inositol, cellobiose, tréhalose, adonitol, melezitose, xylose, et arabinose :

- Bleu-gris et bleu-vert sont considérés comme négatifs.
- Jaune pâle et jaune-vert sont considérés comme positifs.

Pour l'activité phénoloxydase (POX) :

- Incolore est considéré comme négatif.
- Marron est considéré comme positif.

Pour l'activité proline-arylamidase (PRO) :

- Incolore est considéré comme négatif.
- Jaune est considéré comme positif.

Méthodologie pour le codage :

Les 16 caractères biochimiques, répartis dans 15 cupules (les tests POX. et PRO. étant associés dans une même cupule), sont utilisés pour l'identification des *Candida sp.*

- Un profil numérique à 5 chiffres est obtenu en regroupant par 3 les valeurs des 15 tests,
- On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet (**Figure**).
- L'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres correspondants à une espèce spécifique du genre *Candida*.

AUXACOLOR™ 2

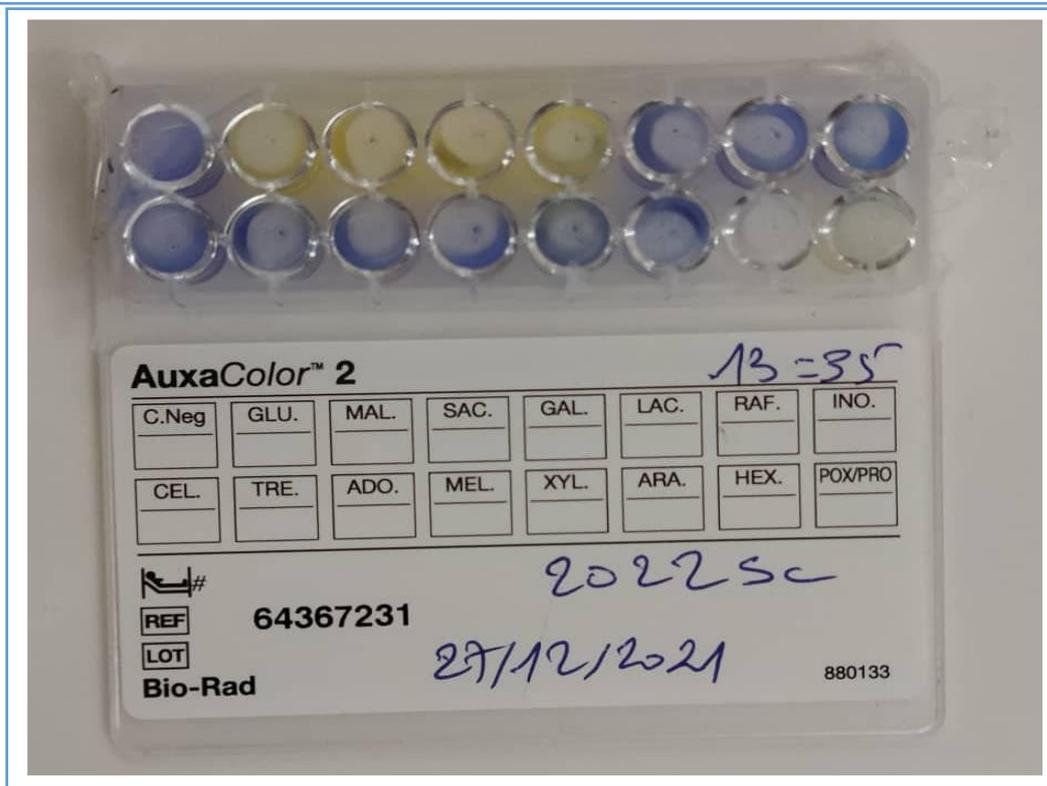
137
1710112020 REF

	C.Neg	GLU	MAL	SAC	GAL	LAC	RAF	INO	CEL	TRE	ADO	MEL	XYL	ARA	HEX	POX/PRO	PL	AR	CA	MY	PS	MY	CEL	PRO	
24 h	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+								
48 h	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72 h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 ⊕/⊖ 1 2 4 1 2 4
 7 1 4 5 2 + / ○ ○

Identification / Identificación / Identifizierung : 71400 = 24h - Duplicata
 Identificazione / Identificação / Identifikation : 71452 = 48h - C. albicans

BIO-RAD 880133



APPENDICE L

Etude statistique

Analyse de la variance ANOVA

- H₀ : il n'y a pas de différence significative entre l'effet anticandidosique de la SA2% et Terbidal.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	1,2109014	1,2109014	0,0014	0,970401424
Résidus	7	68	68	7851	
Total	8	5733,0113	819,00161		
		21	73		
		5734,2222			
		22			

Sig= 0.970 > 0.05 donc H₀ est retenue de ce fait la SA2% et Terbidal ont un effet anticandidosique semblable

- H₀ : il n'y a pas de différence significative entre l'effet anticandidosique de la SA2% et Loceryl.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	1329,736321	1329,736321	14,53800	0,006603174
Résidus	7	640,2636792	91,46623989	137	
Total	8	1970			

Sig =0.0066 <0.05 donc H₀ est fortement rejetée de ce fait il existe une différence hautement significative entre l'effet anticandidosique de la SA2% et locéryl.

H₀ : il n'y a pas de différence significative entre l'effet anticandidosique de la SA2% et Econazol.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	15,2830189	15,2830189	0,0742554	
Résidus	7	1440,71698	205,816712	8	0,793101893
Total	8	1456			

Sig = 0.793 > 0.05 donc H₀ est retenue de ce fait la SA2% et Econazol ont un effet anticandidosique semblable.

H₀ : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Acinetobacter baumannii* de la SA2% et Céfotaxime.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	182,25	182,25	14,79702	
Résidus	3	36,95	12,3166667	3	0,03100932
Total	4	219,2			

Sig = 0.031 < 0.05 donc H0 est fortement rejetée de ce fait il existe une différence hautement significative entre l'effet antibactérien de la SA2% et Céfotaxime.

H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Acinetobacter baumannii* de la SA2% et Pénicilline.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression				1,3636363	
n	1	72,25	72,25	6	0,32727613
Résidus	3	158,95	52,9833333		
Total	4	231,2			

Sig= 0.327 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait la SA2% et Pénicilline ont un effet antibactérien semblable

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Acinetobacter baumannii* de la SA2% et Ticarcilline.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression				1,3636363	
n	1	1,25	1,25	6	0,32727613
Résidus	3	2,75	0,91666667		
Total	4	4			

Sig= 0.327 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait la SA2% et Ticarcilline ont un effet antibactérien semblable.

H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Enterococcus faecalis* de la pâte dentifrice et Bi-oro-gyl.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression				1,215183	
n	1	30,208393	30,208393	6	0,30675973
Résidus	7	174,013829	24,8591185		
Total	8	204,222222			

Sig= 0.306 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait la pâte dentifrice et Bi-oro-gyl ont un effet antibactérien semblable.

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Enterococcus faecalis* de bain de bouche et Bi-oro-gyl.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression				1,7220587	
n	1	40,3210604	40,3210604	1	0,23081844
Résidus	7	163,901162	23,4144517		
Total	8	204,222222			

Sig= 0.230 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait le bain de bouche et Bi-orogyl ont un effet antibactérien semblable.

H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Enterococcus faecalis* de la pâte dentifrice et Amoxicilline.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régressio					
n	1	21,8057197	21,8057197	0,182979	0,68167741
Résidus	7	834,19428	119,170611		
Total	8	856			

Sig= 0.681 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait la pâte dentifrice et l'Amoxicilline ont un effet antibactérien semblable.

H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérien contre *Enterococcus faecalis* de bian de bouche et Amoxicilline.

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régressio				0,6132528	
n	1	68,9513991	68,9513991	5	0,45923535
Résidus	7	787,048601	112,435514		
Total	8	856			

Sig= 0.459 > 0.05 donc H0 est retenue de ce fait la pâte dentifrice et l'Amoxicilline ont un effet antibactérien semblable.

Rendement d'extraction

Extraits éthanoliques	1er essai	2eme essai	3eme essai	Rendement (%)	Ecartype
Extrait des feuilles (F)	13,5	13,1	13,29	13,33	0,20008332
Extrait des écorces (E)	25,5	25,1	25,51	25,37	0,23388031

Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de la crème dermique antifongique 2%

Souches dermatophytes	Diamètre d'inhibition (mm)	% d'inhibition	% d'inhibition	% d'inhibition	MOYENNE	ecartype
T.mentagrophytes	58mm	63,44%	64,44%	64,50%	64,13%	0,00595427
T.ruburum	78mm	86,59%	86,67%	85,90%	86,39%	0,0042336
T.soudanense 1	65mm	72,20%	72,22%	72,10%	72,17%	0,00064291
T.soudanense 2	59,5mm	66,10%	66,11%	66,13%	66,11%	0,00015275
M. canis 1	63mm	69,99%	70%	70,01%	70,00%	1E-04
M.canis 2	54,5mm	61,01%	61%	61%	61,00%	5,7735E-05
M.canis 3	53,5mm	59,40%	59,44%	59,50%	59,45%	0,00050332

Souches dermatophytes	Diamètre d'inhibition (mm)	% d'inhibition	% d'inhibition	% d'inhibition	MOYENNE	ecartype
T.mentagrophytes	58mm	63,44%	64,44%	64,50%	64,13%	0,00595427
T.ruburum	78mm	86,59%	86,67%	85,90%	86,39%	0,0042336
T.soudanense 1	65mm	72,20%	72,22%	72,10%	72,17%	0,00064291
T.soudanense 2	59,5mm	66,10%	66,11%	66,13%	66,11%	0,00015275
M. canis 1	63mm	69,99%	70%	70,01%	70,00%	1E-04
M.canis 2	54,5mm	61,01%	61%	61%	61,00%	5,7735E-05
M.canis 3	53,5mm	59,40%	59,44%	59,50%	59,45%	0,00050332

58mm	63,44%	64,44%	64,50%	64,13%	0,00595427
78mm	86,59%	86,67%	85,90%	86,39%	0,0042336
65mm	72,20%	72,22%	72,10%	72,17%	0,00064291
59,5mm	66,10%	66,11%	66,13%	66,11%	0,00015275
63mm	69,99%	70%	70,01%	70,00%	1E-04
54,5mm	61,01%	61%	61%	61,00%	5,7735E-05
53,5mm	59,40%	59,44%	59,50%	59,45%	0,00050332

APPENDICE M

3.3.2. Résultats de l'étude préclinique et clinique des infections IOA

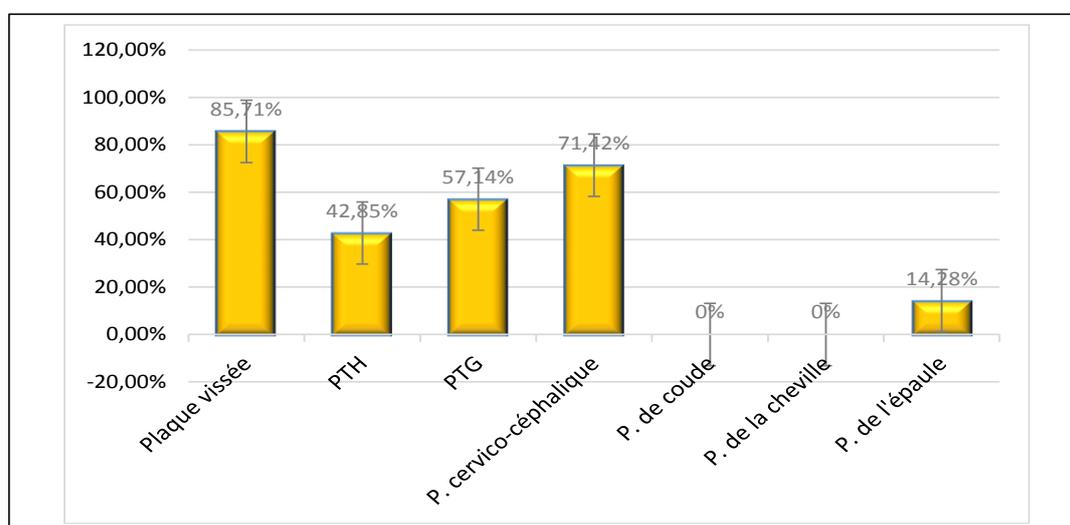
3.3.2.1. Résultats de l'enquête préclinique

Les résultats de l'enquête concernant les infections et leur degré sur matériel d'ostéosynthèse sont présentés dans l'appendice G.

✚ Répartition selon le type du matériel implanté

Q1 : Quel est le type du matériel d'ostéosynthèse le plus utilisé en chirurgie orthopédique ?

Selon le type du matériel d'ostéosynthèse implanté en chirurgie orthopédique, les personnes questionnées (médecins et infirmiers(es)) indiquent que généralement les plaques vissées sont les plus utilisées au service de traumatologie avec une prédominance estimée à 85,71%.



Répartition selon le type de matériel implanté.

✚ Répartition selon la gravité de l'infection

Q2 : Trouvez-vous que l'infection sur matériel est la plus grave ?

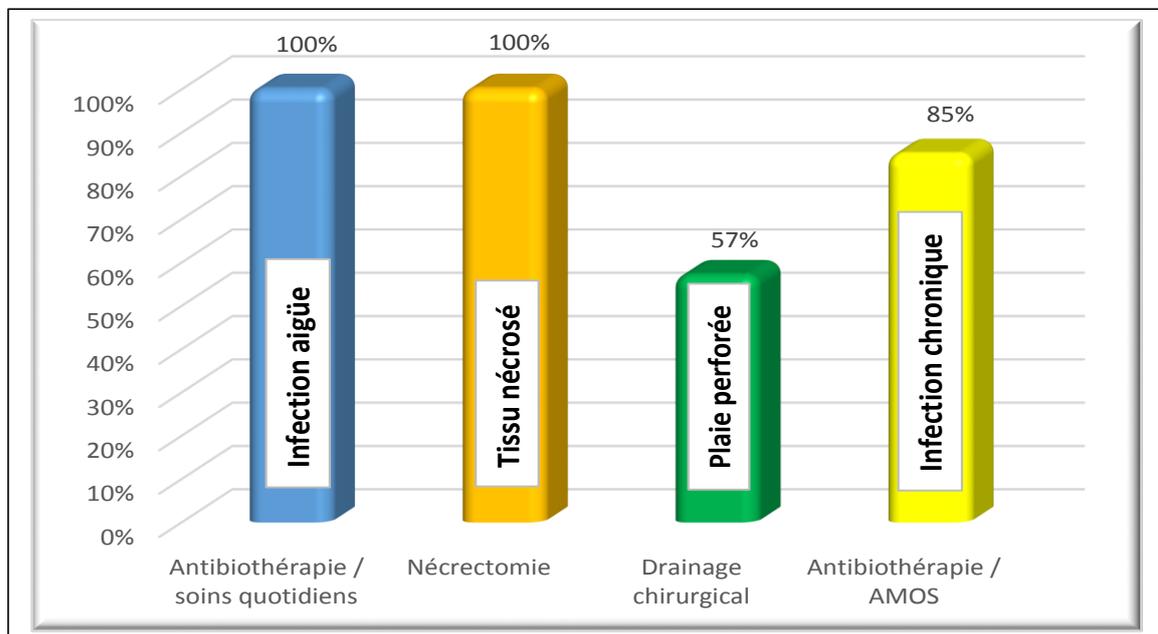
La totalité des participants du staff hospitalier (service d'orthopédie et traumatologie de l'hôpital Frantz Fanon), trouvent que l'infection est la plus grave dans le cas d'une implantation d'un matériel orthopédique dont la cause principale est due à la présence des germes multi-résistants.

✚ Répartition selon le type d'infection

Q3 : Si vous suspectez une infection, quelles sont les mesures d'hygiène à prendre en cas de :

- Infection aigüe
- Tissu nécrosé
- Plaie chirurgicale perforée
- Infection chronique

Afin d'assurer une meilleure prise en charge, la totalité des participants (100%) trouvent qu'une surveillance à l'antibiothérapie avec des soins quotidiens en cas d'infection aigüe est nécessaire, ainsi qu'une réalisation d'une nécrectomie en faveur d'un tissu nécrosé est souhaitable. (57%) des intervenants à l'enquête préfèrent effectuer un drainage chirurgical en cas d'une plaie perforée et (85%) d'entre eux prescrivent impérativement une antibiothérapie avec ablation du matériel d'ostéosynthèse si l'infection évolue vers la chronicité.



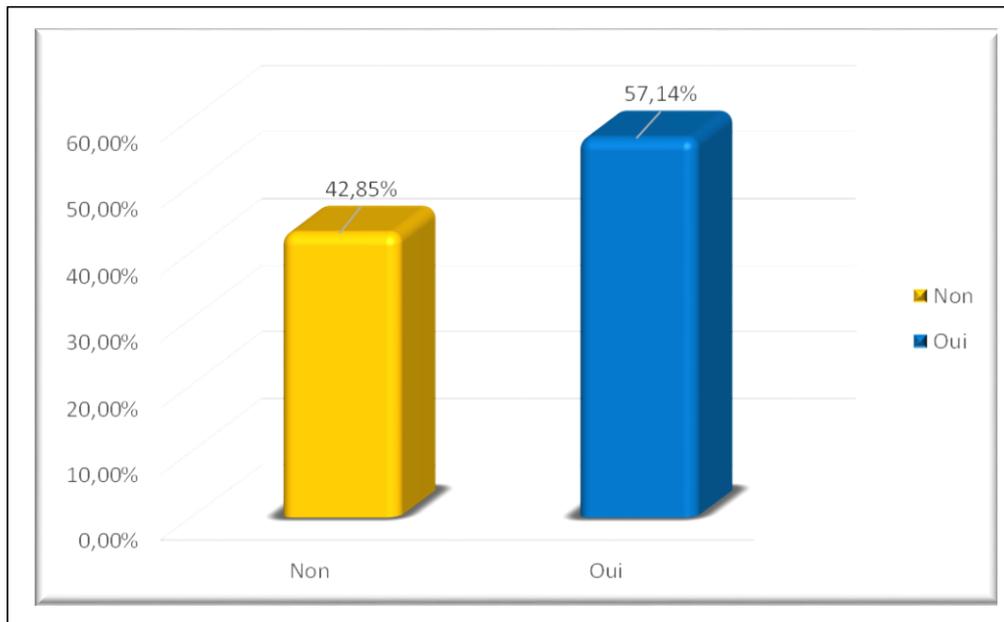
Répartition selon le type d'infection.

✚ Répartition selon les produits d'asepsie

Q4 : Trouvez-vous que les produits d'asepsie suivants : Sérum salé- Dakin- Bétadine 10%- Eau oxygénée possèdent une activité antiseptique suffisante pour éradiquer le germe en cause ?

D'après les résultats de l'enquête, les produits d'asepsie sont utilisés systématiquement au service de chirurgie orthopédique et traumatologie comme des

moyens pour les soins locaux. (57,14%) des participants trouvent que ces produits peuvent éradiquer suffisamment les germes qui causent l'infection.

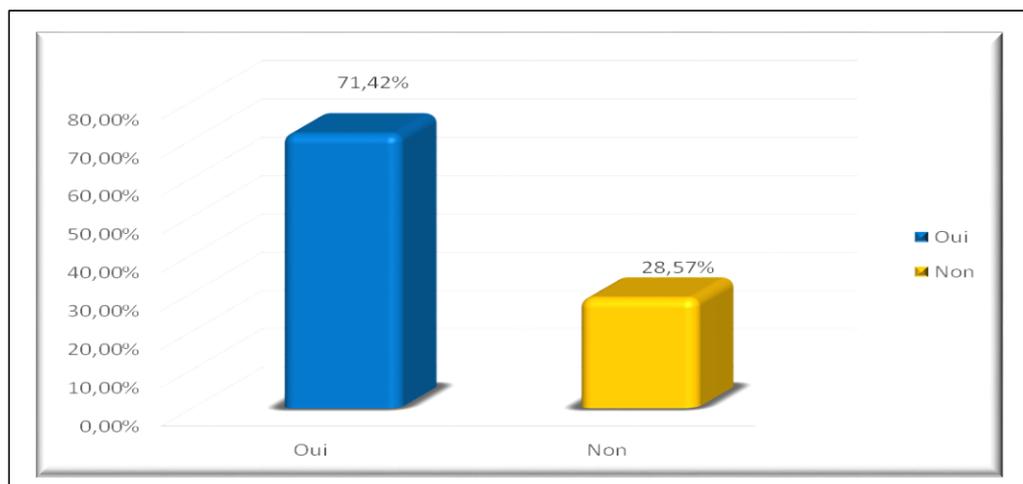


Répartition selon les produits d'asepsie.

✚ Répartition selon le remplacement de la solution polyvidone iodée

Q5 : Conseillez-vous d'éviter l'utilisation de la solution polyvidone iodée 10% (Bétadine) et la remplacer par un autre produit antiseptique pour les soins des infections sur matériel d'ostéosynthèse ?

Concernant l'utilisation de la solution polyvidone iodée pour les soins locaux, (74,42%) des participants souhaitent remplacer la bétadine 10% par une autre solution naturelle sans effets indésirables, afin d'éviter toute réaction d'oxydation sur le métal du matériel d'ostéosynthèse.

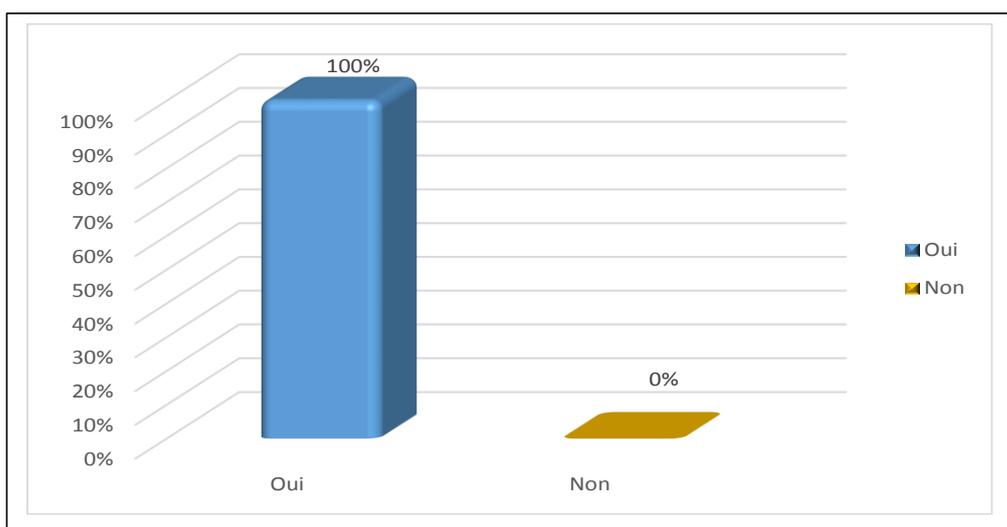


Répartition selon le remplacement de la solution polyvidone iodée.

✚ Répartition selon le choix d'un produit antiseptique naturel

Q6 : Que pensez-vous d'un produit antiseptique naturel à base de molécules à activité thérapeutique sans effets secondaires répondant aux traitements locaux des infections ostéo-articulaires ?

Dans l'objectif de réussir les traitements locaux en cas d'infections ostéo-articulaires sans avoir des échecs thérapeutiques récidivants, la totalité des intervenants à l'enquête (100%) souhaitent utiliser dans un proche futur des produits antiseptiques naturels pour les mesures d'hygiène au service de chirurgie orthopédique et traumatologie.

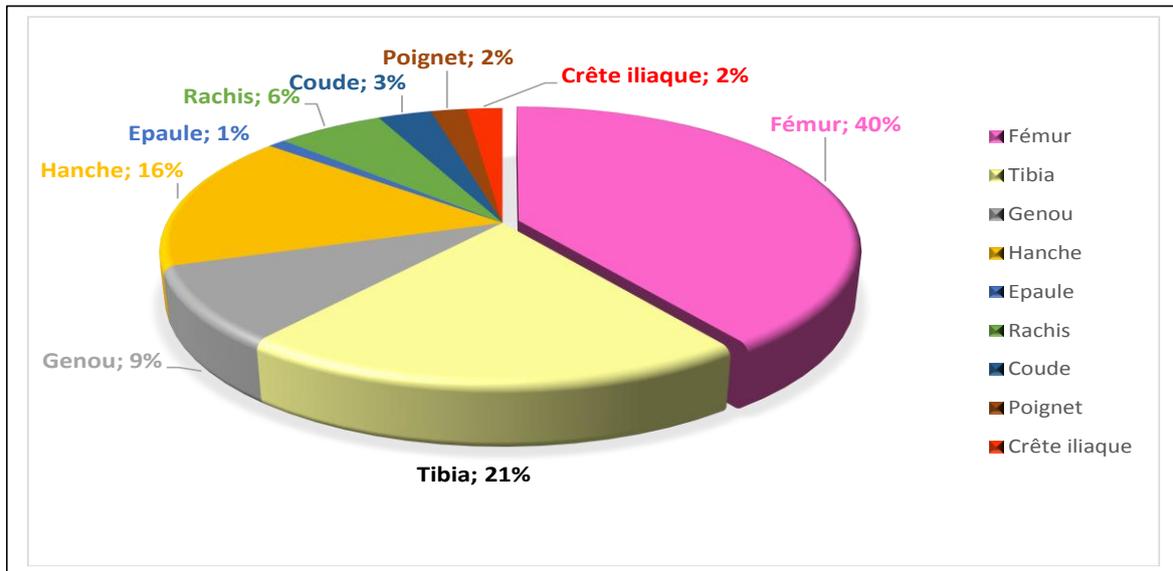


Répartition selon le choix d'un produit antiseptique naturel.

3.3.2.2. Résultats de l'étude clinique

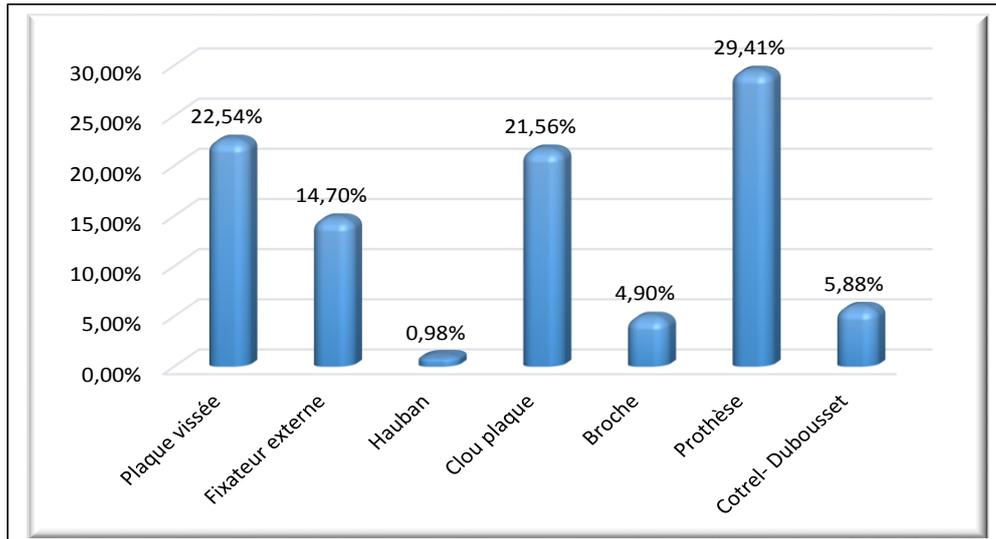
✚ Répartition des cas selon la localisation anatomique de la fracture

D'après nos résultats, les complications traumatiques sont beaucoup plus fréquentes au niveau du membre inférieur qu'au niveau du membre supérieur. L'infection ostéo-articulaire est prédominante chez les patients qui ont subi une mise en place de matériel au niveau du fémur (40%) (40/ 100 patients), au niveau du tibia (21%) (21/ 100 patients) et de la hanche (16%) (16/100 patients) .



✚ Répartition selon le type de matériel orthopédique implanté

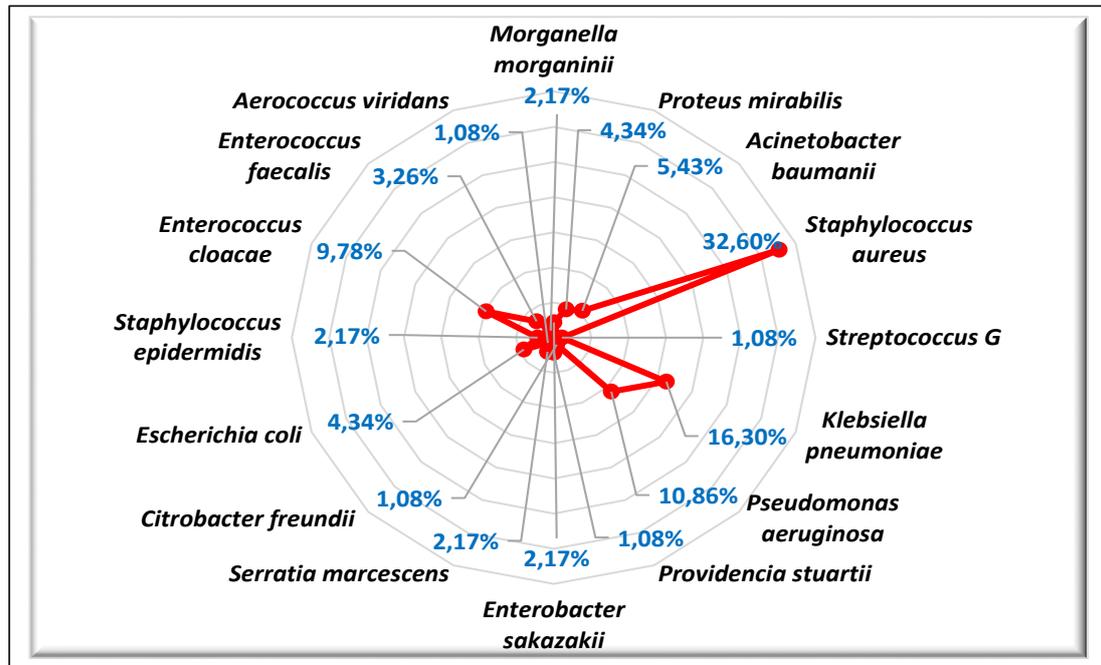
Dans notre enquête, les prothèses se présentent comme étant le matériel orthopédique le plus utilisé mais aussi le plus infecté en cas d'implantation traumatique, soit (29,41%) (30/100 cas), suivi par la plaque vissée (22,54%) (23/100 cas), clou plaque (21,56%) (22 /100 cas) et le fixateur externe (14,71%) (15/100 cas).



Répartition selon le type de matériel orthopédique implanté.

✚ Répartition selon la fréquence des germes isolés

Sur un total de 92 isolats bactériens, nous avons relevé la présence prépondérante de *Staphylococcus aureus* (32,60%) (30/92 bactérie), suivi par les *Entérobactéries*, *Pseudomonas aeruginosa* (10,86%)(10/92), *Acinetobacter baumannii* (5,43%)(5/92), *SCN* (2,17%) (2/92) et les streptocoques.



Répartition selon la fréquence des germes isolés.

Staphylococcus aureus se présente comme l'agent bactérien le plus retrouvé dans notre série des infections ostéo-articulaires sur matériel, avec une fréquence de (32,60%).

REFERENCES

- [1] Hulin, A., Deguillaume, A. M., Bretagne, S., Bézie, Y., «Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives», *J Pharm Clin*, V.24, (2005),125-138.
- [2] Thakur, P., Chawla,R., Goel,R., Arora, R., Sharma, R.k, «*In silico* modeling for Identification of promising antimicrobials of Herbal origin against highly virulent pathogenic strains of bacteria like New Delhi Metallo-beta-lactamase- 1 *Escherichia coli*», *International Journal of Innovation and Applied Studies*, V. 4, n°, 3, (2013), 582-592.
- [3] Lawal, D., Bala, A.J., Aliyu, S.Y., Huguma, M. A., «Phytochemical screening and *in vitro* antibacterial studies of the ethanolic extract of *Citrus senensis* (Linn.) peel against some clinical bacterial isolates », *International Journal of Innovation and Applied Studies*, V. 2, no. 2, (2013), 138-145.
- [4] Khallaf, M., Ameur,N., Terta,M., Lakranbi, M., Senouci, S., Ennaji, M.M., «Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from chicken meat marketed in Rabat, Morocco», *International Journal of Innovation and Applied Studies*,V. 6, no. 4, (2014), 1123–1128.
- [5] Ouraïni ,D., Agoumi, A., Alaoui, M. I., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., Belabbas, M. A., «Activité antifongiques de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L. comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques», *Phytothérapie*, V. 1, (2007),6-14.
- [6] Muanda, F.N., « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques ». Thèse de doctorat,(2010).
- [7]Djossou, J.A., Tchobo, F.P., Yedomonhan,H., Alitonou, A.G., Soumanou,M.M., « Evaluation des caractéristiques physico-chimiques des miels commercialisés à Cotonou », *Tropicultura*, V.31,n. 3, (2013), 163-169.
- [8] Bruneton, J .,« Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales», Edition Tec & Doc, Paris, édition médicales internationales, (1999), 560p.

- [9] Dolatabadi, S., Moghadama, H. N., Mahdavi-Ourtakandb, M., « Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*», *Microbial Pathogenesis* , V.118, (2018) , 285–289.
- [10] Saltan Çitoğlu, G., Altanlar, N., «Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine», *Faculté de Pharmacie, Université d'Ankara*, V.32, n°3, (2003), 159-163.
- [11] Bennacer,A., Cherif, H.S., «Contribution to the Ethnobotanical, Phytochemical, Antimicrobial and Antioxidant Study of the Leaves Aqueous Extract of the Common Walnut *Juglans regia* L. », *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*. V. 7, (2017), 41-52.
- [12] Afolayan, A.J., Meyer, J.J.M.,«The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens* », *Journal of Ethnopharmacology*, V.57, n° 3, (1997),177-181.
- [13] Tajamul, I. S., Ekta, S., Gowhar, A., « *Juglans regia* Linn», A Phytopharmacological Review, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, V.2, n.4, (2014), 364-373.
- [14] Pereira, J.A., *et al.*, «Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars », *Food Chem Toxicol*,V.46,(2008), 2103-2111.
- [15] Zhang, X.B., Zou, C.L., Duan, Y.X., Wu, F., Li G., «Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines», *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V.15, (2015), 396.
- [16] Orhan, I.E., Suntar, I.P., Akkol, E.K., « In vitro neuroprotective of the leaf and fruit extracts of *Juglans regia* L. (walnut) through enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity » *Int J Food Sci Nutr*, V. 62, n°8,(2011),781–786.
- [17] Wang, X., Chen, H., Li ,S., Zhou, J., Xu, J.,« Physico-chemical properties, antioxidant activities and antihypertensive effects of walnut protein and its hydrolysate», *J Sci Food Agric*, V.96, n°7, (2016), 2579–2587.
- [18] Bati, B., Celik, I., Dogan, A., « Determination of hepatoprotective and antioxidant role of walnuts against ethanol-induced oxidative stress in rats », *Cell Biochem Biophy*, V.71, n°2, (2015), 1191–1198.
- [19] Vanier, P., « *Plantes médicinales* », (1999), 231p.

- [20] **APG III.**, « An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants », APG III botanical journal of the linnean society, V.161, (2009), 105-121.
- [21] **Arnal, B., Schnebelen ., Goetz, P., Paris, M.**,« Phytothérapie : la santé par les plantes médicinales », Edition :VIDAL selection du Reader's Digest 2009 Canada..P 447, (2009),167p.
- [22] **Ali-Delille, L.**, « les plantes médicinales d'Algérie », Edition Berti,Alger ,(2010),239p.
- [23] **Sijelmassi, A.**, « Les plantes médicinales du Maroc», Edition le fennec, (2009), 285p.
- [24] **Kale, A., shah, S., Gaikwad, S., Mundhe, K., Deshpande, N., salvekar, J .**,« Elements from stem bark of Orchard tree *Juglans regia L*», Internationnal journal of Chemtech Research, V.2, n°1,(2010),548-550.
- [25] **Mohni ,C., Pelleri, F., Hemery, G.E.**, «The modern silviculture of *Juglans regia*», A literature review, *Food Chem*, V.60 ,n.3 ,(2009), 14.
- [26] **Becquey, J.**,« Les guides des sylvicultures les noyers a bois », Edition Institut pour le développement forestier Paris ,France, 1997, 25p.
- [27] **Garavel, L.**, «*La culture du Noyer*»,J.B. Baillière et fils, Paris, (1959), 285 p.
- [28] **Dupérat, M., Polese, J .M.**, « Encyclopédie visuelle des arbres et des arbustes » Edition :Artémis, France,(2008),133p.
- [29] **Bâtrels, A.**, « Guide des plantes du bassin méditerranéen », Edition Eugen Ulmer, Paris France, (1998),400p .
- [30] **Germain, E.**, «Le noyer, Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection», INRA, Paris,(1992), 632p.
- [31] **Chadda, D.**, «Influence des matières organiques (feuilles, châtons et racines) du noyer (*Juglans regia L.*) sur le comportement de jeunes plants de pommier (*Malus domestica Borkh*) dans la région de R'haouat (Hidoussa) (Belezma)», Thèse de doctorat, (2008), 173p.
- [32] **Bonev, I.**, «Note technique sur le noyer, production des plants greffés et création des noyeraies», Ed, Bibliothèque forestière, Alger,(1973), 31p.
- [33] **Gandev, S.**, « Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia L.*) and their effectiveness in Bulgaria (Review)», Bulgar. J. Agri.Sci, V.13,(2007),683-689.

- [34] **Caglarirmak, N.**, « Biochemical and physical properties of some walnut genotypes (*Juglans regia* L.)». *Nahrung Food*, 47,(2003),28–32.
- [35] **Muradoglu, F.H., Ibrahim Ouguz ,H., Ylidiz, K., Ylmaz, H .,**« Some chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) selections from Eastern Turkey», *Afr J Agric Res*, V.5, (2010), 2379-2385.
- [36] **Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., Solar, A.**, « Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.)»,*Food Research International*,V.67 , (2015) ,255–263.
- [37] **Jia, Z., Zhan, P.F., Tao, B.Q., Li, C.**, « Study on flavones of the flower of *Juglans regia*»,*Chin Pharm J*, V.44, n°.7, (2009),496– 497.
- [38] **Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.**, « Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal», *J Agric Food Chem*,V.51, n°.26, (2003), 7698–7702.
- [39] **Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu,T., Wang, Z.**, « Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.)», *Food Chem* , V.113,n°.1, (2009), 160–165.
- [40] **Blumenthal, M.**,« Herbal Medicine Expanded Commission E. Monographs», 1st ed, American Botanical Council, (2000), 401p.
- [41]**Wichtl, M.**, « Juglandis folium. Walnut leaf In: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals», Medpharm GmbH Scientific Publisher, Stuttgart, (2004),282p.
- [42] **Amaral ,J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentao, P., Pereira, J.A., Ferreres, F.**,« Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves». *Food Chemistry*, V. 88,(2003), 373–379.
- [43] **Pereira, J.A., Oliveira ,I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L.**,«Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars», *Food ChemToxicol*, V.45,(2007), 2287-2295.
- [44] **Salimi, M., Ardestaniyan, M.H., Mostafapour Kandelous, H., Saeidnia, S., Gohari, A.R., Amanzadeh, A., Sanati, H., Sepahdar, Z., Ghorbani, S., Salimi, M.**,

«Anti-proliferative and apoptotic activities of constituents of chloroform extract of *Juglans regia* leaves», *Cell Prolif*, V.47,n°.2,(2014), 172–179.

[45] Parle, M., Khanna, D., « Walnut: not a hard nut to crack », *Int J Pharm Pharm*, V.2, n°5,(2011), 8–17.

[46] Bou Abdallah, I., Baatour, O., Mechrgui, K., Herchi, W., Albouchi, A., Chalghoum, A., Boukhchina, S., « Essential oil composition of walnut tree (*Juglans regia* L.) leaves from Tunisia», *J Essent Oil Res*, V. 28,(2016), 545-550.

[47] Forino, M., Stiuso, P., Lama, S., Ciminiello, P., Tenore, G.C., Novellino, E., Tagliatalata-Scafati, O., « Bioassay-guided identification of the antihyperglycaemic constituents of walnut (*Juglans regia*) leaves», *J Funct Foods*, V. 26, (2016), 731-738.

[48] Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Muller, D., Lamaison, L.,« Teneurs en principaux constituants de la feuille de noyer *Juglans regia* L.», *Plantes Med Phytother*, V. 26,(1993), 332-339.

[49] Wichtl, M., « Juglandis folium. Walnut leaf In: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals», *Medpharm GmbH Scientific Publisher*, Stuttgart, (2004),281-282.

[50] Liu, Y. M., Xu, Y. P., Gao, J. M., Yang, X. P., Liu, Y. S., «Analysis of volatile components from leaves of *Juglan sregia* by GC/MS», *Acta Bot Boreali-occidentalia Sin*,V. 24, (2004),1100–1102.

[51] Verma, R.S., Padalia, R.C., Chauhan, A ., Thul, ST.,« Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya», *Ind Crop Prod*,V. 42,(2013), 195–201.

[52] Rather, M.A., Dar, B.A., Dar, M.Y., Wanic, B.A ., *et al.*, « Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents», *Phytomedicine*, V. 19, (2012),1185– 1190

[53] Li, C.Y., Du, H.J., Su, X.H., Zhong, Y.J., Yuan, Z.P., Li, Y.F., Liang, B.,« Juglanones A and B: two novel tetralone dimers from walnut pericarp (*Juglans regia*). *Helvetica Chimica Acta*, V. 96, n°.6, (2013), 1031–1035.

[54] Maire, R., « Mission scientifique du Hoggar (février-mai 1928) II, Etudes sur la flore et la végétation du Sahara Central», *Mém Soc Hist Nat Afr Du Nord*, n° 3,(1940), 274-433.

[55] Ali-Shtayeh, M.S., Abu Ghdeib, S.I., «Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes», *Mycoses*, V. 42, (1999), 665–672.

[56] Mouhajir, F., Hudson, J.B., Rejdali, M., Towers G.H.N., « Multiple Antiviral Activities of Endemic Medicinal Plants Used by Berber Peoples of Morocco», *Pharmaceutical Biology*, V. 39, n° 5, (2001), 364-374.

[57] Mei-zhi, Z., et al., (2007)« Study on Extraction Conditions of Active Antiviral Substance from Walnut Leaves», *Chemistry and Industry of Forest Products*.

[58] Kale, A.A., et al., « In vitro anthelmintic activity of stem bark of *Juglans regia L.*», *J Chem Pharm Res*, V. 3, (2011), 298-302.

[59] Kale, A.A., Gaikwada, S.A., Kamble, G.S., Deshpande, N.R., Salvekar, J.P.,« In vitro anthelmintic activity of stem bark of *Juglans regia L.*», *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, V. 3, n°2, (2011), 298-302.

[60] Hosseini, S., Jamshidi, L., Mehrzadi, S., Mohammad, K., Najmizadeh, A.R., Alimoradi, H., Huseini, H.F.,« Effects of *Juglans regia L.* leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial», *J Ethnopharmacol*, V. 152, n°3, (2014), 451–456.

[61] Ji, Y., Hong-Yuan Qua, Z., Xiang, Z., « Exp». *Toxicol. Pathol*, V.63, (2011), 69.

[62] Wang, X., Zhao, M.M., Su, G.W., Cai, M.S., Sun-Waterhouse, D.X., Zhou, C.M, Lin, L.Z .,« Antihyperuricemic activities of an ethanolic and aqueous extract of walnut (*Juglans regia L.*) shell and a new aldehyde xanthine oxidase inhibitor», *Int J Food Sci Technol*, V.51, n°2, (2016), 453–460.

[63] Abu Taha, N., Al-wadaan, M.A., « Utility and importance of walnut, *Juglans regia Linn*: A review», *African Journal of Microbiology Research*, V. 5, n°32, (2011), 5796-5805.

[64] Qamar, W., Sultana, S., « Polyphenols from *Juglans regia L.* (Walnut) kernel modulate cigarette smoke extract induced acute inflammation, oxidative stress and lung injury in Wistar rats», *Hum Exp Toxicol*, V. 30, (2011), 499-506.

[65] Shimoda, H., et al., « Effect of polyphenol-rich extract from walnut on diet-induced hypertriglyceridemia in mice via enhancement of fatty acid oxidation in the liver», *J Agric Food Chem*, V.57, (2009), 1786-1792.

[66] Rhayour, k., « (Etude du mécanisme d'action des bactéricides des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*», Thèse de doctorat nationale,(2002).

[67] Sastry, A. S., Bhat, S., Janagond, A.B., et al., « Essentials of Medical Microbiology. 3^{ème} édition, Londre, (2021).

[68] Hart, T., Shears, P.,« Atlas de poche de microbiologie Médecine-Sciences», Paris ,(1997),10125p.

[69] Mona, M., Connaughey M., Connaughey , J.S.M., «Antifungal Agents.Parasitic Diseases, Section 8 Chemotherapy, BRODY'S HUMAIN PHARMACOLOGY Mechanism-Based Therapeutics», Edition Elsevier, (2019), 532-541p.

[70] Agoumi, A et collaborateurs ., «Précis de parasitologie médicale», Collection MEDIKA, Horizons, (2003).

[71] Dufresne, P., « Identification des champignons d'importance médicale. Stage de Laboratoire. Institut national de santé publique », Québec, (2018),62p.

[72] Fortin, J., Fortin ,F., Batigne, S et al., « Le corps humain comprendre son organisme et son fonctionnement», Edition Québec Amérique inc, Canada, (2008),33p.

[73] Irda, N., Putineanu, D., Tribak, K., et al., « Innovations en chirurgie orthopédique et traumatologie que retenir de 2015 ?», Louvain med, V.135, n° 81,(2016),5.

[74] Lew, D.P., Waldvogel, F.A., « Ostéomyélite», Lancet, V,364, (2004), 369-379.

[75] Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., Shirliff, M.E.,« Osteromyelitis and the role of biofilm in chronic infection», FEMS Immunol Med Microbiol, V.52, (2008), 13-22.

[76] Zimmerli, W., «Clinical presentation and treatment of orthopedic implant-associated infection», J Intern med Aug, V. 276,(2014),111–119.

[77] Navarro, M., Michiardi, A., Castano, O., Panell, J.A.,« Biomatériaux en orthopédie»,J R Soc Interface, V,5, (2008), 1137-1158.

[78] Vacheethasanee, K., Temenoff, J .S., Higashi, J. M., et al., « Baterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* stains determine adhesion on polyethylene », J Biomed Mater Res, V. 42, (1998), 425–32.

[79] Masquelet, A. C., « Chirurgie orthopédique, principes et généralités», Masson, Paris, (2004), 405p.

[80] Rüfenacht, M., Hoffmeyer, P., « Chirurgie orthopédique et traumatologie ostéoarticulaire de l'adulte et de l'enfant. Médecine et Hygiène», Genève , (2004), 621p.

[81] Renza, N., Hubacherb, A., Klebera, C., Trampuza, A., « (2016). Infections après traitement par ostéosynthèse d'une fracture »Forum Médical Suisse, V. 16, n°4, (2016), 85–91.

[82] Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski ,C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.M., Rangunath, C., Kaplan, J.B., Mack, D.,« Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections», *Biomaterials*, V.28, n°9,(2007),1711–1720.

[83] Kleber, C., Schaser, K.D., Trampuz, A., « Complication management of infected osteosynthesis: Therapy algorithm for peri-implant infections», *Chirurg*, (2015), Aug 22.

[84] Mashhady, M. A., Abkhoo,J., Jahani, S., et al., « Inhibitory effects of plant extracts on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation», *Int J Infect*, V. 3,(2016), 1-5.

[85] Hoston, P., Rowe, S. E. , Possi, C., et al., «Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype», *Infect Immun*, V. 79,(2011),1153–65.

[86] EL Euch, D.,Trojjet, S., Mokni, M., Feuilhade de Chavin, M., « Mycoses superficielles, Dermatologie infectieuses», Elsevier Masson SAS,(2014), 185p.

[87] Taied, F.,Méchaï, F., Lefort, A., Lanternier, F., Bougnoux, M.E., Lortholary ,O., « Prise en charge des infections systémiques à *Candida* spp. La revue de médecine interne,V. 32,(2011),173-180.

[88]Viguié-Vallanet, C., Bonnet, C., « Dermatomycoses métropolitaines (hors pityriasis versicolor)», *EMC-Dermatologie*,(2014),14p.

[89] Delmont, J. , Pichard, E., Jauréguiberry , S., Marchou, B., Parola, P., Simon, F.,«Infections de la peau et des tissus mous», Editions Alinéa Plus, Maladies infectieuses tropicales, (2016).

[90] **Lecerf, P., André, J., Richert, B.**, « Prise en charge des onychomycoses, Pathologie unguéale », Presse Med, Elsevier Masson SAS, V.43, (2014), 1240–1250.

[91] **Develoux, M., Bretagne, S.**, « Candidoses et levures diverses. Enc Med Chir Maladies infectieuses », V. 8, (2005), 119-139.

[92] **Goubau, P., Van Gompel, A.**, « Repères en microbiologie », Edition Kessel-Lo, Louvain : Garant, (2000).

[93] **Aoufi, H.**, « Le profil épidémiologique et diagnostique des mycoses au CHU de Rabat (étude menée à partir des services de parasitologie 2001-2003) », Thèse de doctorat, (2005).

[94] **Mouton, C., Robert, J.C., Sixou, J.L., Trahan, L.**, « Bactériologie bucco-dentaire. Paris, France, (1994).

[95] **Badet, C.**, « Etude clinique de la carie », EMC, Médecine buccale, (2011).

[96] **Lupi-Pégurier, L., Bourgeois, D., Muller-Bolla, M.**, « Epidémiologie de la carie », EMC, Médecine buccale, (2009).

[97] **Fioretti, F., Haikel, Y.**, « Carie et sucres », Médecine Mal Métaboliques, V.4, n°5, (2010).

[98] **Benbelaid, F.**, « Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire. Thèse de doctorat, (2015).

[99] **Gracieux, P., Robert, J.C., Bonnaure Mallet, M.**, « Les biofilms buccaux. Microbiologie en odonto-stomatologie », Paris, France, Maloine, (2006), 160p.

[100] **Marsh, P.D., Devine, D.A.**, « How is the development of dental biofilms influenced by the host? » J. Clin. Periodontol, V. 38, n°11, (2011), 28–35.

[101] **Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F. E.**, « Defining the normal bacterial flora of the oral cavity », J Clin Microbiol, V. 43, n°11, (2005), 5721–5732.

[102] **Mohamed, J.A., Huang, D.B.**, « Biofilm formation by enterococci », J Med Microbiol, V.56, n°12, (2007), 1581–1588.

[103] **Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson, T.J., Owatz, C.B.**, « *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment », J Endod, V. 32, n°2, (2006), 93–98.

[104] Haapasalo , M., Shen, Y., «Current therapeutic options for endodontic biofilms», *Endodontic Topics*, V. 22, n°1,(2010), 79–98.

[105] Nallapareddy, S.R., Singh? K.V., Sillanpää ,J., Garsin, D.A., Höök, M., Erlandsen S.L., Murray, B.E.,« Endocarditis and biofilm–associated pili of *Enterococcus faecalis*», *J Clin Investig*, V. 116, n°10, (2006), 2799–2807.

[106] Johnson, E.M., Flannagan, S.E., Sedgley ,C.M., « Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis», *J Endod* , V.32, n°10,(2006), 946–950.

[107] Grimoud, A.M., Boulbet Mauger, M., Lodter J.P., « Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'ADN ancien». *Antropo*, V. 6, (2004), 43-51.

[108] Nair, P.N.R., « Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures», *Crit Rev Oral Biol Med*, V. 15, n°6, (2004), 348–381.

[109] Stem, J. L., Hagerman, A. E., Steinberg, P. D., Mason, P. K., « Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol* ,V. 22,(1996),1887-1899.

[110] Milane, H., « La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques». Thèse de doctorat, (2004).

[111] Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y .L., Sun, X., « Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C», *Meat Science*, V.81, (2009), 686-692.

[112] Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W., « The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef», *Meat Science*, V. 73, (2006), 413-421.

[113] Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P.,« (2011) .A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids», *Internationale Pharmaceutica Scientia*, V.1, n°1, (2011), 25-41

[114] Knobloch, K., Pauli, A *et al.*, « Antibacterial and antifungal properties of essential oil components», *Journal of Essential Oil Research*, V. 1, n°3, (1989), 119-128.

[115] Stern, J. L., Hagerman, A. E., Steinberg, P. D., Winter, F. C., and Estes, J. A., « A new assay for quantifying brown algal phlorotannins and comparisons to previous methods », *J Chem Ecol* in press, (1996).

[116] Zhang, W.J., Björn, L.O., « The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants », *Fitoterapia* , V.80, (2009), 207–218.

[117] Rajendra-Prasad, N., Anandi, C., Balasubramanian, S., Pugalendi, K.V., « Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound », *Journal of Ethnopharmacology*, V.91, n°1, (2004), 21-24.

[118] Ghani, S. B. A., Weaver, L., Zidan, Z. H., Ali, H. M., Keevil, C. W., Brown, R. C., « Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, V. 18, n°2, (2008), 518-522.

[119] Yan, D., Jin, C., Xiao, X.H., Dong, X.-P., « Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry » *Journal of biochemical and biophysical methods*, V. 70, n°6, (2008), 845-849.

[120] Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H., « Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact », *Mycoses*, V. 43, (2000), 17–26.

[121] Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Khallouki, F., Amerani, S., « Investigation of antioxidant and ant hemolytic proprieties of thymus satureioides collected from tafilalet region , south –Est of morocco », *Asian pacific journal of tropical biomedicine* , V.5, n °2, (2015), 93-100.

[122] Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D., « Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food chemistry* », V.112, (2009), 303-309.

[123] Bekroyves, A., Janat, A., Mamy, B.B., Boua, B., Fézan, H.T., Ehouan, E., « Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (*Caesalpinaceae*) »; *Sciences & nature*; V. 4, n°2, (2007), 217-225.

[124] Douhou, N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissihassani I M., Badoc A., et Gmira N., « Screening phytochimique d'une endemique ibero-marocaine *Thymelaealythroides*; *Bull soc. pharm. Bordeaux*, V.142, (2003), 61-78.

[125] **Yadav, R., Munin, A., « (2011).** Phytochemical analysis of some medicinal plants», *Journal of Phytology*, V.3, n°12, (2011), 10-14.

[126] **Amin , M. M., Mir Sawhney, S.S., Jassal, M.M.S.,** «Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale* Wudpecker», *Journal of Pharmacy and Pharmacology*,V. 2, n°1, (2013), 1-5.

[127] **Membre de la Commission Européenne de la Pharmacopée.,**«Pharmacopée Européenne », 7^{ème} édition, Strasbourg, (2012).

[128] **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),** « Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale». 8^{ème} édition, Algérie, (2020).

[129] **Archambaud, M.,** «Methodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. Brûlure», V.1,(2000),246-252.

[130] **Kazemian, H., Ghafourian, S., Heidari, H., et al (2015)** «Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*», *Rev Soc Bras Med Trop* , V.48, (2015),432–436.

[131] **Zameer, F., Rukmangada, M., Chauhan, J.B., et al.,** « Evaluation of adhesive and antiadhesive properties of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their inhibition by herbal plants», *Iran J Microbiol*, V. 8, (2016),108–19.

[132] **Onsare, J., Arora, D.,** « Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*», *J Appl Microbiol*, V. 118,(2015),313–25

[133] **Diongue ,K., Baha, Z., Seck, M.C., Ndiaye, M., Diallo, M.A., Ndiaye, D.,** « Candidoses cutané-unguéales diagnostiquées au laboratoire de parasitologie et mycologie du CHU Le Dantec de Dakar de 2008 à 2015», *Médecine et Santé Tropicales*, V.28,2018), 390-394

[134] **Dufresne,P.,** « Identification des champignons d'importance médicale», Québec, (2018), 62p.

[135] **Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., Bartley, R.,** « Descriptions of medical fungi», 2nd ed, Underdale (Australie), The national library of Australia,(2007), 58p.

- [136] Haddaf, Y., Kaloustian, J., Giordan RRegli, P., Chefrou, A., Abou, L., Mikail, C., Portugal, H., « Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie 6^e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France,(2004).
- [137] Hassikou R., Oulladi, H., Arahou, M., «Activité antimycosique des extraits du chêne-liège *Quercus suber* sur *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans*», *Phytothérapie*, V.12, (2014),206-212.
- [138] Bouchara, J.P., Pihet, M., Chabasse, D., *et al.*, « Les levures et levuroses», *Cah Form Biol Med* , V. 44,(2010), 17-175.
- [139] Vitale, R., Afeltra, J., Dannaoui, E.,« Antifungal Combinations. Antifungal Agents», Ernst E. et Rogers P. D., Humana Press, V.118,(2005), 143–152.
- [140] Cheow, W.S., Chang , M.W., Hadinoto, K.,« The roles of lipid in anti–biofilm efficacy of lipid–polymer hybrid nanoparticles encapsulating antibiotics», *Colloids Surf, A Physicochem Eng. Asp*, V. 389, n°3, (2011), 158–165.
- [141] Seo, S.B., Ryu, C.S., Ahn, G.W., Kim, H.B., Jo, B.K., Kim, S.H., Lee, J.D., Kajiuchi ,T., «Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-*Inula helenium* L. extract», *Int J of cosmetic Sc*, V.24,(2002), 195-106.
- [142] Chehtit-Hacid , F., « Etude de la variabilité biochimique, physiologique et évaluation des activités biologiques des polyphénols de deux espèces du genre *Pistacia* (*P. lentiscus* L. et *P. atlantica* Desf.)»,Thèse de doctorat ,(2016).
- [143] Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S. F.,Nabavi, S. M., «Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of *Hyssopus angustifolius*», *Pharm Biol*,V. 50,(2012), 1062-1066.
- [144] Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., Eslami, B.,« Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*», *Open Life Sciences*, V. 5, (2010).
- [145] Rakiatou, T., « Etude mécanique de la relation groupe chimiqueactivité antioxydante des extraits d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis* A. Juss (Meliaceae) », thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, (Burkina Fasso), (2014), 136 p.

[146] **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F .,** « A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V.76, (2009), 270-276.

[147] **Mensor, L.L., Mensezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G.,**« Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method », *Phy Tother Res*, (2001), 127-130.

[148] **Capello, C., Fischer, U., Hungerbuhler, K.,**« What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents», *Green Chemistry*, V, 9,(2007), 927-934.

[149] **Ganesh, N., Akthar, S., Shah, T.I.,**« Preliminary Phytochemical Evaluation and Antibacterial Potential of Different Leaf Extracts of *Juglans Regia*: A Ubiquitous Dry Fruit from Kashmir-India», *Pharmaceutical Sciences*, V. 19, n°2, (2013), 93-96.

[150] **Diem Do, Q., Angkawijaya, A.E., LanTran-Nguyen, P., Huong Huynh L., Soetaredjo, F.E., ilsmadji ·Yi-HsuJu ,S.,** « Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*», *Journal of Food and Drug Analysis*, V. 22, n° 3, (2014), 296-302.

[151] **Upadhyay, V.,**«Anthelmintic activity of the stem bark of *Juglans regia Linn*», *Res J.Pharm. Phytochem. (RJPP)*, V. 2, (2010), 465-467.

[152] **Raja, G., Shaker, I.A., Sailaja ,I., Swaminathan, R., Basha Saleem, S., Babu, K. S.,** « Phytochemical Screening and Reducing Power Assay of Nut Extracts of *Juglans regia L*», *International journal of chimique and life science*, V.15, n°1,(2012), 1026-1031.

[153] **Schwindl, S., Kraus, B., Heilmann, J.,** «Phytochemical study of *Juglans regia L.* leaves», *Phytochemistry*, V.144,(2017),58–70.

[154] **Benahmed-Djilali, A., Chemoul, T., Kal, S., et al.,** « Propriétés d'une pommade antibactérienne formulée à base de saponines extraites des feuilles de noyer», *Phytothérapie*, V. 16, (2018),245–253.

[155] **Shah, T.I., Akhtar, S., Ganesh, N.,** « Preliminary phytochemical evaluation and anti-bacterial potential of different leaf extracts of *Juglans regia*: a ubiquitous dry fruit from Kashmir-India», *Pharm Sci Rev Res*, V.19, (2013), 93–96.

- [156] Zakavi, F., Golpasand, H. L., Farajzadeh-Sheikh, A.D., Araeigha, A., Shooshtari, Z. L., «Antibacterial Effect of *Juglans regia* Bark against Oral Pathogenic Bacteria», *International Journal of Dentistry*, V. 18, (2013),1-5.
- [157] Akbari, V., Jamei, R., Heidari, R., Jahanban Sfahlan,A., « Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype», *Food Chemistry* , V.135, (2012), 2404–2410.
- [158] Rywaniak, J., Luzak, B., Podsedek, A., Dudzinska, D., Rozalski, M., Watala, C., «Comparison of cytotoxic and anti-platelet activities of polyphenolic extracts from *Arnica montana* flowers and *Juglans regia* husks », (2015).
- [159] Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., « Anitioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) » ,*Journal of phytochemistry*, V. 63 ,(2003) ,795-801.
- [160] Nandini, S., Parth, G., Upendra, K.S., Swati, S., Arun, K.S., Arvind, G., « Microwave-Assisted Efficient Extraction and Stability of Juglone in Different Solvents from *Jugans regia*: Quantification of Six Phenolic Constituents by Validated RP-HPLC and Evaluation of Antimicrobial Activity», *Analytical Letters*, V. 42,(2009),2592-2609.
- [161] Amaral, J. S., Valentao, P., Andrade, P. B., Martin, R. C., Seabra, R.M., « Do cultivar, geographical location and crop season influence phenolic profile of walnut leaves?» , *Molecules*, V. 13,(2008), 1321-1332.
- [162] Boukhari, A., « Extraction et analyse de l'huile essentielle et des metabolites secondaires lourds de *Juglans regia* L. ; Etude pharmacologique», *Thèse de doctorat*, (2017).
- [163] Papoutsis, Z., Kassi ,E., Chinou, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Moutsatsou, P., « Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483» , *Br J Nutr*, V. 99, n°4,(2008), 715–722.
- [164] Sher, Z., Khan, Z., Hussain, F., « Ethnobotanical studies of some plants of Chagharzai valley, discrit Buner, Pakistan », *Pak J Bot*, V. 43,(2011),1445–52
- [165] Bennacer, A., Cherif, H.S.,« Contribution to the ethnobotanical, phytochemical, antimicrobial and antioxidant study of the leaves' aqueous extract of the common walnut "*Juglans regia* L."», *IJPPE*, V. 7,(2017),41–52.
- [166] Idolo, M., Motti, R., Mazzoleni, S.,« Ethnobotanical and phytochemical knowledge in a long-history protected area the Abruzzo,Lazio and Molise National park(Italian Apennines)», *Journal of ethnopharmacology*, V. 127,(2010),379-395.

[167] Kurtz, S., Lau, E., Mowat, F., Halpern, M., « Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 », *J Bone Joint Surg Am*, V. 89, (2007), 780-785.

[168] Lemaigen, A., Buzelé, R., Druon, J., Bémer, P., Gras, G., Arvieux, C., Rosset, P., Bernard, L., «Infections ostéo-articulaires (IOA) de l'enfant et de l'adulte», *La Revue du praticien*, V.65,(2016), 0-6.

[169] Alberti, B., Ayma, F., Barbe, M., et al., «Hygiène des plaies et pansements. Bulletin de recherche du centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales», (interrégion Ouest),(2004), 104 p.

[170] Bibbo, C., Brueggeman, J., « Prevention and management of complications arising from external fixation pin sites », *J Foot Ankle Surg*,V. 49, (2010), 87–92

[171] Hoston, P., Rowe, S.E., Possi, C., et al., «Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype», *Infect Immun*,V. 79,(2011),1153–65.

[172] Toumi, A., Dinh, A., Bemmer, P., Bernard, L., « Diagnostic des ostéites chroniques », *Journal des Anti-infectieux*, V.13, (2011),145-153.

[173] Bru, J.P, Bland, S., Sédallian, A., « Aspects épidémiologiques et microbiologiques de 33 ostéites et ostéoarthrites anaérobies », *Médecine et Maladies Infectieuses*, V.30, (2000), 102-108.

[174] Maali, Y., « Physiopathologie des infections ostéo-articulaires liées aux *Staphylococcus non aureus* ». Thèse de doctorat,1,(2019), 190p.

[175] Kleber, C., Schaser, K.D., Trampuz, A.,« Complication management of infected osteosynthesis: Therapy algorithm for peri-implant infections», *Chirurg* , Aug ,(2015).

[176] Elouennass, M., El Hamzaoui, S., Frikh, M., Zrara, A., Chagar, B., Ouaaline, M., « Les aspects bactériologiques des ostéites dans un hôpital universitaire », *Médecine et maladies infectieuses*, V. 37 ,(2007), 802–808.

[177] El khomsi, C., « (2020). Profil épidémiologique, bactériologique et thérapeutique des infections ostéo-articulaires», Thèse de doctorat en médecine, (2020), 147p.

[178] Vemu, L., Sudhaharan, S., Mamidi, N., Chavali, P., «Need for appropriate specimen for microbiology diagnosis of chronic osteomyelitis », *J Lab Physicians* , V.10,(2018),21-25.

[179] Grammatico-Guillon, L., Baron, S., Gettner, S., Lecuyer, A. I., Gaborit, C., Rosset, P., Rusch, E., Bernard, L., « Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008 : clinical and economic outcomes», Journal of hospital infection, V. 82,(2012), 40-48.

[180] Suzuki, G., Saito, S., Ishii, T., Motojima, S., Tokuhashi, Y., Ryu, J., « Previous fracture surgery is a major risk factor of infection after total knee arthroplasty », Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, V.19, (2011), 2040–2044.

[181] Senneville, E., Dubreuil, L.,« Diagnostic et traitement des infections osseuses». La Lettre de l'infectiologue , V.13, n°1, (1998),33-38.

[167] Mutai, C., Bii, C., Abatis, D., Roussis, V.,« Antimicrobial activity of Acacia mellifera extract and lupane triterpenes», Journal of Ethnopharmacology, (2009), doi:10.1016-j.jep.02.007.2009

[168] Leclerc, H., Gaillard, J.L., Simonet, M.,« Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien », Doin Editeurs, Paris,(1995), 605p.

[169] Khalid, M., Bilal, M., Munir, H., Shah, S. Z. H., Khurshid, M., El-Shazly, M .,Hafiz, M.N., Iqbal, H. M. N.,« *In-vitro* Evaluation of Anti-Bacterial, Anti-biofilm and Cytotoxic Activity of Naturally Inspired *Juglans regia*, *Tamarix aphylla* L., and *Acacia modesta* with Medicinal Potentialities», J Pure Appl Microbiol, V.14, n°2,(2020),1133-1142

[170] Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R., Moghaddam, M. M., Fartashvand, M., « Comparison of Antibacterial Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) and Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Leaves Alcoholic Extracts against Bacteria Isolated from Burn Wound Infections », Acta Microbiologica Hellenica,V. 64,(2019), 47-56.

[171] Lacaille-Dubois, M.A., Wagner, H., «Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry», Stud Nat Prod Chem, V. 21, (2000), 633-87.

[172] Zakavi F, Golpasand Hagh L, Daraeighadikolaei A, et al .,(2013) .Antibacterial effect of *Juglans regia* bark against oral pathologicbacteria. Int J Dent 2013:1–5.

[173] Rao, A.V., Gurfmkel, D.M.,« The bioactivity of saponins: Triterpenoid and steroidal glycosides», Drug Metab Drug Interac, V. 17,(2000), 211-235.

- [174] Quave, C.L., Plano, L.R., Pantuso, T., *et al.*, « Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* », J Ethnopharmacol, V. 118, (2008),418–428.
- [175] Abidi, S.H., Ahmed, K., Sherwani, S.K., *et al.*, « Synergy between antibiotics and natural agents results in increased antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*», J Infect Dev Ctries, V. 9,(2015),925–929.
- [176] Ali-Shtayeh, M. S., Jamous Rana M., « Ethnobotany of Palestinian herbal medicine in the northern West Bank and Gaza Strip: review and comprehensive field study», *Biodiversity and Environmental Sciences Studies Series*, V. 4,(2006), 1-122.
- [177] Ali-Shtayeh, M. S., Abu-Ghdaib, S. I., «Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes», *Mycoses*, V. 42,(1999), 665-672.
- [178] Li, C., Liu, J. X., Zhao, L., Di, D .L., Meng, M., Jiang, S. X., « Capillary zone electrophoresis for separation and analysis of four diarylheptanoides and an α -tetralone derivative in the green walnut husk (*Juglans regia* L.) », *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, V. 48,(2008),749-753.
- [179] Mansour-Djaalab, H., Kahlouche-Riach, F., Djerrou, Z., Serakta- Delmi ,M., Hamimed, S., Tarifa, W., Djaalab, I., Hamidi-Pacha, Y.,« *In vitro* evaluation of antifungal effects of *Lawsonia inermis*, *Pistacia lentiscus* and *Juglans regia*», *Int. J. Med. Arom. Plants*, V. 2,(2012),263-268.
- [180] Husein, A. I., Al-Nuri, M.A., Zatar, N. A., Jondi, W., Ali-Shtayeh, M. S., Warad, I., « Isolation and antifungal evaluation of *juglans regia* l extracts. IJRRAS, V. 13, n°2,(2012), 665-670.
- [181] Mansour-Djaalab, H., Djerrou, Z., Bensari , C., Djaalab, I., Kahlouche-Riachi, F., Ghoribi, L., Hamdi-Pacha, Y., « Phytochemical Screening and Antifungal Activity of Phases Obtained From the Extracts of *Juglans Regia* L., *Lawsonia Inermis* L. and *Pistacia Lentiscus* L.» V. 7, n°1, (2015),187-192
- [182] Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Valentin, E.,Bakhrouf, A.,« Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains», *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , V.29,(2010),81–88.
- [183] Noumi, E., Snoussi, M., Noumi, I., Valentin, E., Aouni, M., Al-sieni, A., «Comparative study on the antifungal and antioxydant properties of natural and colored *Juglans regia* L.», *Life Science Journal*, V.11, n°8, (2014), 327-335.
- [184] Deshpande, R., Kale, A., Ruikar, A., Panvalkar, P., Kulkarni, A., Deshpande, N., Salvekar, J., « Antimicrobial activity of different extracts of *J.regia* L against oral

microflora», *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, V. 3,(2011), 200-201.

[185] Hoceini, A., Khelil, N.K., Ben-Yelles, I., Mesli, A., Ziouani, S., Ghellai, L., Aissaoui, N., Nas, F., Arab, M.,« Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults » , *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, V. 6, n°8, (2016), 720-726.

[186] Ziouani, S., Klouche Khelil N., Benyelles, I., Hoceini, A., Aissaoui, N., Nas, F., Ghellai, L., «Oral microflora of supragingival and subgingival biofilms in Algerian healthy adults » , *Afr J Microbiol Res* , V. 9, n°23,(2015), 1548-1557.

[187] Sixou, M., Diouf, A., Alvares, D.,« Biofilm buccal et pathologies buccodentaires», *Antibiot*, V. 9, (2007),181-188.

[188] Aas, J. A., Paster ,B .J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E., « Defining the normal bacterial flora of the oral cavity», *Journal of Clinical Microbiology*, V.43, (2005),5721-5732.

[189] Mutha, M., Deshpande, R.R., Shep, S., Deshpande, N.R., Torne, R.,« Comparative Evaluation of Antibacterial Properties of Different Extracts of *Juglans regia* (Walnut) & *Erethia laevis* (Ajaan Vruksh) Against Salivary Micro Flora», *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, V. 7, n°2,(2015), 151-153.

[190] Sharafati-Chaleshtori, R., Sharafati-Chaleshtori, F., Rafieian, M., «Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves » , *Turk J Biol* 35, (2011),635-639.

[191] Sudhanshu, S., Prashant, G.M., Chandu, G.N., « Laboratorial evaluation of antimicrobial efficacy of herbal dentifrices commercialized in India», *Arch Oral Res*, V.7, (2011),51-60.

[192] Al-sieni, A.I. I., «The antibacterial activity of traditionally used *Salvadora persica* L. (miswak) and *Commiphora gileadensis* (palsam) in Saudi Arabia», *Afr J Tradit Complement Altern Med*, V.11,(2014), 23-27.

[193] Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson, T.J., Owatz, C.B., « *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment», *J. Endod*,V. 32, n°2, (2006), 93–98.

[194] Estrela, C., Silva, J.A., De Alencar, A.H., Leles, C.R.,Decurcio, D.A., «Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review», *J. Appl. Oral. Sci*, V. 16, n°6,(2008), 364–368.

- [195] **Brown, M., Gilbert, P.**, «Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents», V. 74, n°22, (1993),87–97.
- [196] **Basrani, B., Haapasalo, M.**, «Update on endodontic irrigating solutions», Endod.Topics, V. 27, n°1,(2012), 74–102.
- [197] **Samadi, N., Zaree, R., Bakhtiar, H., Salehnia, A., Azimi, S.**,«Comparative antibacterial efficacy of endemic Satureja Khuzistanica Jamzad essential oil, Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate solutions as root canal irrigations», Dent. Res. J, V. 8, n°1,(2011), 1-28.
- [198] **Hadouchi, F., Chaouche, T.M., Halla, N.**, «Screening phytochimique, activité antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie», Ethnopharmacologie, (2016), 1-9.
- [199] **Nadour, M.**, «Extraction, caractérisation des polyphénols issus des sousproduitsoléicoles .Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire »,Thèse de doctorat,(2015),162p.

Propriétés antiseptiques d'extrait éthanolique de *Juglans regia* (L.) et évaluation de son potentiel antibiofilm in vitro en implantologie orthopédique

Antiseptic Properties of Ethanolic Extract of *Juglans regia* (L.) and Evaluation of Its Antibiofilm Potential in vitro in Orthopedic Implantology

N. Djairène · H.S. Cherif · F. Hamaidi-Chergui · S. Azrou

© Lavoisier SAS 2021

Résumé L'objectif assigné à la présente étude est d'élaborer une solution antiseptique à base d'extrait éthanolique des feuilles du noyer (*Juglans regia* (L.)) et d'évaluer le potentiel antibiofilm in vitro des souches staphylocoques incriminées dans les infections ostéoarticulaires sur matériel (IOAM) en chirurgie orthopédique postopératoire. L'extrait éthanolique de *Juglans regia* (L.) a été incorporé comme un principe actif antimicrobien dans la formulation de la solution antiseptique 2 %. Quatorze souches de *Staphylococcus aureus* ont été collectées sur pus de plaies postopératoires, chez des sujets victimes d'une fracture osseuse, bénéficiant d'une prothèse et/ou d'un matériel d'ostéosynthèse (fixateur externe, vis, clou, plaque vissée). La méthode de la plaque à microtitration a été utilisée pour évaluer la capacité des souches pathogènes prélevées de produire le biofilm. Le potentiel antibiofilm de la solution antiseptique 2 % a été réalisé par la technique de dilution en milieu liquide pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB). La CMIB a mis en évidence un effet antibiofilm remarquable. Une CMIB mesurée à 6,25 % (v/v) a manifesté un degré de sensibilité antibiofilm efficace in vitro sur 92,86 % des souches. Face à l'efficacité de la solution antiseptique 2 % sur les germes incriminés dans les IOAM, son utilisation comme un produit naturel, sans effets indésirables pour les soins locaux et la désinfection

cutanée postchirurgicale, semble prometteuse dans la lutte contre les infections.

Mots clés *Juglans regia* (L.) · Antiseptique · Extrait éthanolique · Antibiofilm · Infections ostéoarticulaires · *Staphylococcus aureus*

Abstract The objective assigned to this study is to develop an antiseptic solution based on the ethanolic extract of the leaves of walnut (*Juglans regia* L.) and to evaluate the antibiofilm potential in vitro growth strains of staphylococci implicated in osteoarticular infections on the material (OAMI) in postoperative orthopedic surgery. The ethanolic extract of *Juglans regia* L. has been incorporated as an antimicrobial active principle in the formulation of the antiseptic solution 2%. Fourteen strains of *Staphylococcus aureus* were collected from the pus of postoperative wounds, from subjects suffering from a bone fracture, benefiting from a prosthesis and/or osteosynthesis material (external fixator, screw, nail, plate screwed). The Microtiter plate method was used to assess the ability of the pathogenic strains collected to produce the biofilm. The antibiofilm potential of the antiseptic solution 2% was achieved by the liquid dilution technique for the determination of the minimum inhibitory concentration of biofilm (CMIB). CMIB demonstrated a remarkable antibiofilm effect. A CMIB measured at 6.25% (v/v) showed a degree of antibiofilm sensitivity effective in vitro on 92.86% of strains. Faced with the effectiveness of the antiseptic solution 2% on the germs incriminated in OAMI, its use as a natural product without adverse effects for local care and postsurgical skin disinfection seems promising in the fight against infections.

N. Djairène (✉) · H.S. Cherif · F. Hamaidi-Chergui
Laboratoire de biotechnologie, environnement et santé,
département de biologie et physiologie cellulaire,
faculté des sciences de la nature et de la vie,
université Saad-Dahlab, Blida-I, Algérie
e-mail : djairene.nassima@gmail.com

S. Azrou
Laboratoire central, centre hospitalo-universitaire Frantz-Fanon,
Blida, Algérie

Laboratoire de microbiologie, faculté de médecine,
université Saad-Dahlab, Blida-I, Algérie

Keywords *Juglans regia* (L.) · Antiseptic · Ethanolic extract · Antibiofilm · Osteoarticular infections · *Staphylococcus aureus*

Introduction

Les infections liées à des implants de fixation de fracture présentent un véritable problème de santé publique. Les nouvelles technologies ont permis à la chirurgie orthopédique d'assurer le remplacement des articulations par la mise en place des implants chirurgicaux (prothèses et matériel d'ostéosynthèse), d'améliorer la mobilité et de restaurer la fonction articulaire, pour embellir la qualité de vie des patients [1]. Souvent, ces infections apparaissent comme des complications traumatiques postopératoires, altérant la réponse immunitaire locale en l'occurrence de ces matériaux orthopédiques étrangers. Parfois, l'infection persiste jusqu'à devenir chronique [2,3].

Malgré la prescription de l'antibiothérapie prophylactique, l'infection continue d'être la cause majeure de l'échec thérapeutique dans la prise en charge des infections ostéoarticulaires (IOA) [4,5]. À l'origine de ces complications septiques récidivantes, le phénomène de formation de biofilm et l'adhérence des germes multirésistants, dont *Staphylococcus aureus* est significativement la cause principale [6,7]. L'infection sur matériel implanté est considérée donc parmi les aggravations médicales liées au développement de ce réservoir bactérien [8,9]. Le biofilm est un assemblage des bactéries en agrégats irréversiblement adhérentes à une surface inerte, enchâssées dans une matrice polysaccharidique extracellulaire (MEC) constituant le mode de vie des microorganismes [10,11]. Implanté dans l'organisme, le dispositif de fixation de fracture est rapidement colonisé par des bactéries mettant en jeu des interactions physicochimiques [12], ce qui permet aux germes incriminés d'initier la production de biofilm [13]. En outre, ce processus d'attachement abiotique est favorisé par des protéines de la matrice extracellulaire telles que : adhésines/autolysines (AtlA) et (AtlE) présentes respectivement chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* [14]. Ces dernières sont reconnues comme des pathogènes majeurs, notamment dans les IOA, produisant ainsi un exopolysaccharide (EPS) nommé (poly-N-acétyl-β-[1-6]-glucosamine) [15]. D'autres composants de la paroi des staphylocoques peuvent être impliqués dans le développement de biofilm.

En phase postopératoire, pour éviter tout risque de complication infectieuse, des soins locaux s'effectuent à grande échelle, mais leur efficacité est limitée. Le nettoyage cutané ainsi que la désinfection des orifices et des fiches de fixateur externe (dispositif d'ostéosynthèse implanté partiellement au niveau de l'os) restent difficiles à réaliser par la solution antiseptique polyvinylpyrrolidone iodée. Effectivement, ces ions iodures, qui sont susceptibles d'éliminer le germe pathogène incriminé, s'avèrent toxiques en contact avec le matériel orthopédique, ce qui conduit à des effets indésirables : oxydation du métal, voire un délabrement de la zone traumatisée [16,17].

Face aux problèmes soulevés par les infections, les effets secondaires des produits d'asepsie et la résistance bactérienne aux antibiotiques, de nouvelles recherches scientifiques, biologiques et pharmacologiques sont encouragées aujourd'hui en retournant à la nature verte par la valorisation des plantes médicinales. Utilisées en phytomédecine moderne [18] et reconnues par leur action en douceur, ces plantes aromatiques constituent une source riche de métabolites secondaires bioactifs curatifs contre les maladies infectieuses [19,20]. Parmi ces plantes figure *Juglans regia* (L.), l'espèce royale de la famille des Juglandacées [21]. Différentes parties de la plante possèdent des propriétés médicinales importantes [22] exploitées intensivement dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques [23]. Très peu d'études en Algérie ont été réalisées sur l'activité antibactérienne.

Des investigations biologiques et pharmacologiques de *Juglans regia* (L.) ont été rapportées par différents chercheurs révélant plusieurs activités : antibactérienne [24], antifongique [25], antihyperuricémique [26], antituberculeuse [27], anticancéreuse [28], neuroprotectrice [29], antioxydante [30] et hépatoprotectrice [31].

L'objectif de la présente étude est d'élaborer une solution antiseptique à base d'extrait éthanolique des feuilles de *Juglans regia* (L.) et d'évaluer son potentiel antibiofilm in vitro sur des souches staphylocoques incriminées dans les IOA.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

L'espèce de noyer étudiée est *Juglans regia* (L.), originaire de l'atlas blidéen (altitude : environ 1 500 m), Algérie. La plante récoltée ne présente aucune symptomatologie externe fongique ou bactérienne. Raison pour laquelle sa partie aérienne a été utilisée dans l'élaboration du produit fini.

Souches microbiennes testées

Des échantillons cliniques ont été réalisés sur pus de plaies postopératoires, chez des sujets victimes d'une fracture ouverte ou comminutive, hospitalisés au service de chirurgie orthopédique et traumatologie, CHU Blida, Algérie. L'ensemble des patients ont bénéficié d'une intervention chirurgicale prothétique pour la mise en pose d'une prothèse et/ou d'un matériel de fixation de fracture.

Les prélèvements ont été mis en culture sur un milieu solide et la collecte des souches *Staphylococcus aureus* a été effectuée après identification, fondée sur l'observation macroscopique des colonies, l'observation microscopique, la coloration de Gram, le test de catalase et le système Api[®] Staph (BioMérieux, France). Une souche microbienne

de *Staphylococcus* productrice de biofilm a été fournie par le laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes de l'université de Saïda Dr-Moulay-Tahar (Algérie), utilisée dans l'expérimentation comme témoin positif. L'ensemble des tests microbiologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire central, unité de bactériologie I et II, CHU Blida, Algérie.

Méthode d'obtention de l'extrait

Une masse de 20 g de drogue a été homogénéisée dans 75 ml d'éthanol à 96 % pendant 48 heures sous agitation à 25 °C. L'homogénat a été filtré sur du papier Whatman n° 3. Le filtrat ainsi obtenu a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le macérat éthanolique des feuilles de *Juglans regia* (L.) recueilli est conservé au frais dans un flacon en verre sec et stérile. Le procédé d'extraction a été réalisé au laboratoire de biotechnologie, environnement et santé.

Élaboration d'une solution antiseptique 2 % à base de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* (L.)

Une solution antiseptique 2 % a été formulée à partir de l'extrait éthanolique ; le procédé de fabrication a été réalisé à froid, sous des conditions d'asepsie rigoureuse. En premier temps, une quantité de 0,5 g de propylène glycol a été ajoutée à 2 g de l'extrait. Dans un second temps, le Plantacare®818 et le reste des excipients ont été additionnés délicatement au mélange tout en assurant l'homogénéisation sous agitation magnétique. Différents essais ont été réalisés pour déterminer les quantités nécessaires des ingrédients à ajouter (Tableau 1).

Contrôle du produit fini

Mesure du pH

À l'aide d'un pH-mètre, un volume bien déterminé de la solution antiseptique 2 % a été mesuré.

Tableau 1 Composition de la solution antiseptique 2 % pour 25 ml

Ingrédients	%
Propylène glycol (PG)	0,5
Plantacare®818	0,0625
Vitamine E	0,125
Extrait éthanolique	2
Méthylisothiazolinone	0,025
Parfum	0,075
Eau	22,21

Essai galénique

Afin d'observer toute anomalie, l'examen macroscopique de la solution antiseptique 2 % a été réalisé, fondé sur différentes appréciations organoleptiques notées par l'équipe de recherche et de développement, laboratoire Vague De Fraîcheur®, Blida, Algérie.

Essai antimicrobien

Le dépistage de la production de biofilm a été établi in vitro afin de connaître si toutes les souches staphylocoques collectées étaient capables de former le biofilm et de contribuer à l'installation de l'infection sur matériel orthopédique.

Technique de tissu en plaque (TCP)

La méthode consiste à déposer dans chaque puits de la microplaque un volume de 50 µl de milieu de culture additionné à 50 µl de saccharose 2 % pour favoriser la croissance bactérienne et un volume de 20 µl d'une culture à 0,5 MF. Les puits non inoculés sont considérés comme témoin négatif. La microplaque de 96 puits a été par la suite incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, la phase planctonique a été retirée délicatement en lavant les puits quatre fois avec 20 µl de tampon phosphate salin (TPS pH 7.2). Les biofilms potentiellement formés par les micro-organismes sessiles ont été fixés par l'ajout de l'acétate de sodium 2 %. La révélation des cellules adhérentes au support de polystyrène (puits de la microplaque) a été réalisée par la méthode de Crystal Violet [11,32,33]. Afin d'éliminer toute trace de colorant superficiel, la microplaque a été lavée avec de l'eau distillée stérile et laissée séchée à température ambiante.

La mesure qualitative de la production de biofilm a été fondée sur l'intensité de la couleur de la biomasse adhérente, sous forme d'un anneau de Crystal Violet tapissant la paroi ou d'un point visible recouvrant le fond du puits de la microplaque 96. Les scores de la formation de biofilm ont été notés comme suit :

- absence d'adhérence bactérienne : (-) ;
- cellules bactériennes faiblement adhérentes : (+) ;
- cellules bactériennes modérément adhérentes : (++) ;
- cellules bactériennes extrêmement adhérentes : (+++).

Toutes les expériences ont été répétées trois fois pour chaque souche bactérienne.

Évaluation du potentiel antibiofilm de la solution antiseptique 2 %

Le test suivant a été mené pour établir le potentiel antibiofilm de la solution antiseptique 2 %, après avoir confirmé la

capacité de former le biofilm par toutes les souches staphylocoques isolées. Le procédé a été effectué sur microplaque de 96 puits dont chaque cupule a été remplie par un volume de 50 µl de milieu de culture. Préalablement préparée, une concentration de 12,5 % de la solution antiseptique 2 % a été introduite dans le premier puits puis un volume de 50 µl du mélange a été reporté d'une cupule à une autre, selon une progression géométrique de raison 2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 12,5 jusqu'à 0,19 %. Une suspension bactérienne a été inoculée et additionnée de saccharose 2 %. Les puits sans agent antimicrobien ont servi de témoin négatif. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, le sumagent a été aspiré et les puits ont été lavés de la même manière précédemment décrite. La révélation d'adhérence cellulaire des bactéries fixées a été réalisée par la méthode de Crystal Violet pendant 45 minutes. Après lavage et séchage, la mesure quantitative de l'inhibition de la formation de biofilm a été fondée sur la plus faible concentration à partir de laquelle il y a absence d'une biomasse sous forme d'un point visible, coloré au centre du puits et/ou un anneau de Crystal Violet autour de la paroi, appelée concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB).

Antibiogramme

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antiseptique, un antibiogramme a été effectué en parallèle du test antibiofilm sur la totalité des souches *Staphylococcus aureus* prélevées. Des disques d'antibiotiques (Bio-Rad, France) ont été utilisés comme témoin positif de la famille des β-lactamines : pénicilline (P), céfoxitine (Fox) et oxacilline (Ox), et des aminosides : amikacine (Ak) (Tableau 2).

Famille d'antibiotique	Antibiotique	Charge/disque
β-lactamines	Pénicilline (P)	10 UI
	Céfoxitine (Fox)	30 µg
	Oxacilline (Ox)	1 µg
Aminosides	Amikacine (Ak)	30 µg

Tableau 3 Provenance des souches *Staphylococcus aureus* testées

Type de matériel d'ostéosynthèse et de prothèse	Nombre de poses de matériel orthopédique	Nombre de souches <i>Staphylococcus aureus</i>
Fixateur externe	5	5
Prothèse de hanche	6	6
Plaque vissée	2	2
Clou centromédullaire	1	1
Total	14	14

La méthode de diffusion des disques sur milieu solide Mueller-Hinton a été réalisée selon la recommandation de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale [34]. Un écouvillon stérile a été introduit dans la suspension bactérienne préalablement préparée à 0,5 MF, puis ensemencé sur la gélose des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Des disques d'antibiotiques ont été déposés aseptiquement sur la surface de la gélose, et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, l'interprétation des résultats a été réalisée par la mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Résultats et discussion

Provenance des souches

Les résultats des tests bactériologiques révèlent une forte contamination par *Staphylococcus aureus* dans l'ensemble des 14 prélèvements effectués sur pus postopératoire. Selon la provenance des souches, l'infection à *Staphylococcus aureus* survient principalement sur prothèse de hanche (6/14) et sur fixateur externe (5/14) respectivement, suivi de la plaque vissée (2/14) et enfin du clou centromédullaire (1/14) (Tableau 3).

Contrôle du produit fini

Les propriétés organoleptiques et chimiques sont considérées comme un moyen indispensable pour vérifier et contrôler la qualité du produit fini. La valeur du pH ainsi que les caractéristiques visuelles et olfactives de la solution antiseptique 2 % élaborée sont enregistrées dans le tableau 4.

La valeur de pH = 6,32 est proche du pH de la peau, ce qui permet d'attester que la solution antiseptique 2 % formulée peut être appliquée sans provoquer une irritation cutanée.

Production de biofilm

D'après les résultats obtenus par la technique de marquage au Crystal Violet, la cinétique d'adhésion des isolats

Tableau 4 Appréciation organoleptique et chimique de la solution antiseptique 2 %

	Aspect	Couleur	Odeur	pH
Solution antiseptique 2 % à base des feuilles de <i>Juglans regia</i> (L.) (25 ml)	Liquide	Verdâtre	Prononcée	6,32

cliniques in vitro a permis de classer les souches en trois groupes majeurs bien distincts. Sur les 14 souches de *Staphylococcus aureus* prélevées sur matériel orthopédique, dix ont été placées dans le profil d'adhésion extrême (+++), considérées positives pour leur phénotype de production de biofilm sur le support en polystyrène, en comparaison avec le témoin positif producteur de biofilm, une souche de *Staphylococcus aureus* placée dans le profil d'adhésion moyenne (++) et trois dans le profil d'adhésion faible (+) (Fig. 1).

Antibiofilmogramme de la solution antiseptique 2 %

En se fondant sur les résultats du potentiel antibiofilm, les valeurs de CMIB ayant une forte inhibition sur les cellules bactériennes à l'état sessile sont enregistrées dans le tableau 5.

Les résultats des CMIB de la solution antiseptique 2 % sur les biofilms formés par les isolats de *Staphylococcus aureus* ont montré un effet notable. En examinant les résultats obtenus, on remarque une diminution progressive des biofilms formés en fonction de l'augmentation de la concentration de la solution antiseptique 2 %. Une CMIB à 6,25 % (v/v) s'est avérée suffisante pour empêcher toutes les phases de formation de biofilm sur 13 souches de *Staphylococcus aureus* (13/14) et éliminer efficacement toute trace de biofilm in vitro. La souche n° 12 issue d'une infection sur matériel d'ostéosynthèse (fixateur externe) a manifesté un degré de sensibilité antiadhésive très faible 3,125 % (v/v) en comparaison avec la totalité des souches. En revanche, la souche témoin positive a présenté la plus faible CMIB, mesurée à 0,78 % (v/v).

Selon les résultats de l'antibiogramme (Tableau 6), la majorité des souches *Staphylococcus aureus* ont montré un

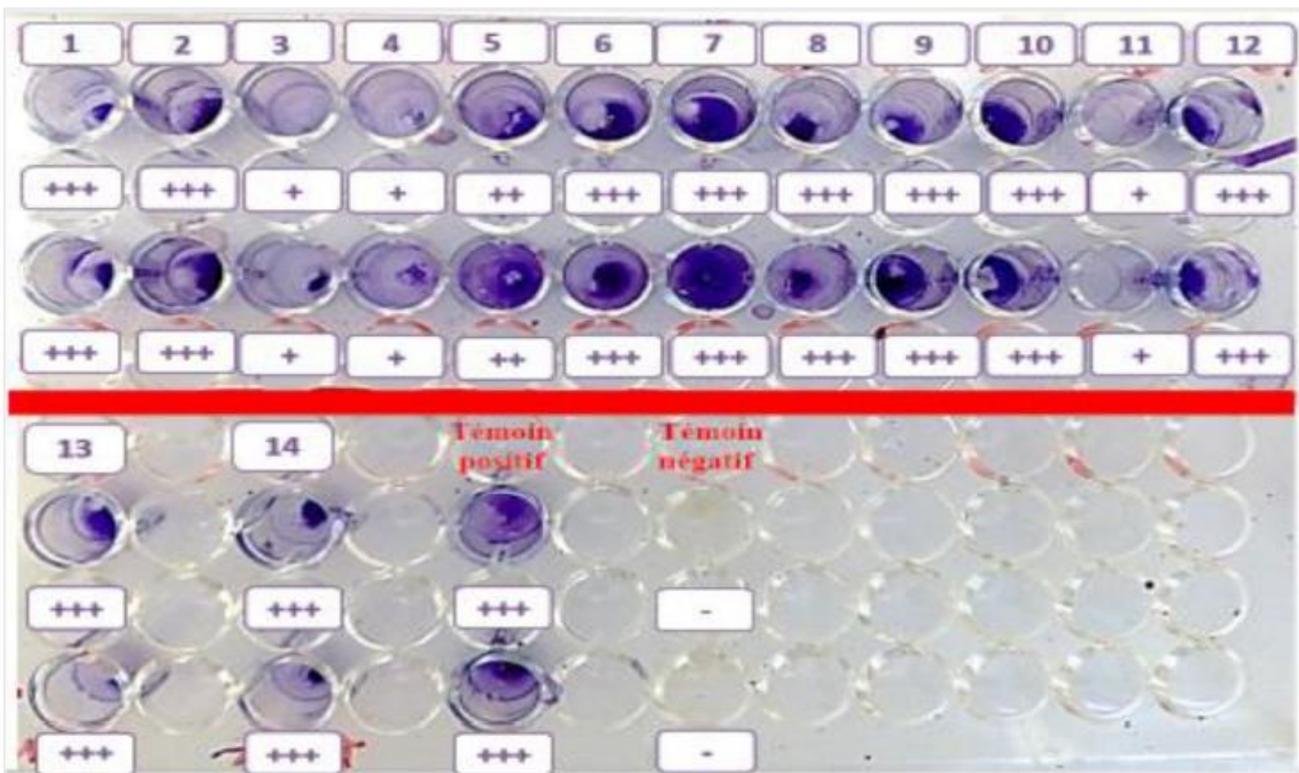


Fig. 1 Production de biofilm staphylococcique par la technique de tissu en plaque TCP Absence d'adhésion bactérienne : (-) ; cellules bactériennes faiblement adhérentes : (+) ; cellules bactériennes modérément adhérentes : (++) ; cellules bactériennes extrêmement adhérentes : (+++)

Tableau 5 Criblage des concentrations minimales inhibitrices de biofilm

<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
CMIB % (v/v) ^a	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	10	11	12	13	14	Souche témoin positive	
CMIB % (v/v) ^a	6,25	6,25	6,25	3,125	6,25	6,25	0,78	

^a (v/v) : µl/ml

Tableau 6 Effet de sensibilité des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(P)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(Fox)	R	R	28	R	27	26	R	27	26	R	29	26	R	22
(Ox)	R	R	21	R	21	12	R	12	20	R	18	20	R	12
(Ak)	R	R	R	R	19	–	R	–	23	R	24	R	R	R

R : résistante ; (P) : pénicilline ; (Fox) : céfoxitine ; (Ox) : oxacilline (Ak) : amikacine

profil de résistance remarquable vis-à-vis des différents antibiotiques testés (Fig. 2).

Discussion

De nos jours, la lutte contre les infections pouvant survenir après un acte chirurgical est une préoccupation médicale majeure difficile à gérer, en raison de la résistance microbienne aux traitements conventionnels fondés sur la prescription médicamenteuse à grande échelle, mais parfois inappropriée. À ces difficultés, s'ajoute le problème de leurs effets secondaires qui est devenu inquiétant, ce qui a incité à orienter les recherches vers de nouvelles voies pour une vie plus saine, en exploitant des ressources naturelles inépuisables à activités biologiques et pharmacologiques plus puissantes, qui actuellement sont considérées comme une source d'inspiration de nouveaux médicaments. Depuis longtemps, les feuilles de *Juglans regia* (L.) sont utilisées dans la médecine populaire pour soigner diverses maladies [35]. Leur richesse en constituants bioactifs leur confère des propriétés pharmacologiques importantes pouvant contribuer au développement de nouveaux produits industriels [36]. L'évaluation de la solution antiseptique 2 % a montré une valeur du pH neutre, cela est afférent à l'origine de la nature des feuilles qui, autrefois, étaient utilisées comme un remède topique et recommandées dans le traitement des problèmes de la peau comme l'acné, l'eczéma, les ulcères cutanés, les coups de soleil et les brûlures superficielles ainsi que pour régler



Fig. 2 Antibiogramme *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA)

une sudation trop importante sans provoquer des irritations [37–39].

Dans la présente étude, l'identification bactériologique des germes responsables d'une infection osseuse sur matériel métallique a révélé la présence prépondérante des souches *Staphylococcus aureus*. Ce résultat rejoint la plupart de ceux rapportés dans la littérature où les staphylocoques représentent 40 à 55 % des infections sur matériel orthopédique quel que soit le type d'implant [40].

Concernant le dépistage de la production de biofilm par la technique de tissu en plaque (TCP), Christensen et al. [41] ont démontré que cette méthode est parfaitement adaptée pour la formation de biofilm staphylococcique au fond des puits de la microplaque, en raison de la surface importante fournie aux bactéries pour assurer une meilleure adhésion. L'attachement abiotique des staphylocoques dorés isolés est réalisé par des protéines d'adhésion présentes à leur surface, appelées SERAM (*secretable expanded repertoire adhesive molecules*) [42]. Par ailleurs, d'après les résultats obtenus de test antibiofilmogramme, on peut affirmer que toutes les souches *Staphylococcus aureus* soumises à l'essai biologique antibiofilm in vitro sont très sensibles au traitement antiadhésif de la solution antiseptique 2 % testée. En revanche, elles ont montré un profil de résistance notable vis-à-vis de certains antibiotiques. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs [43,44] qui confirment que les feuilles de *Juglans regia* (L.) possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*.

Dans le même sillage, nombreuses publications ont mis en valeur le potentiel antibiofilm des feuilles de *Juglans regia* (L.). Selon l'étude menée par Quave et al. [45], l'utilisation des extraits aqueux des feuilles de *Juglans regia* empêchent les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) de former le biofilm, et cela revient à la richesse de la plante par des molécules bioactives telles que les naphtoquinones et les flavonoïdes qui sont responsables de cette activité antibactérienne.

Des investigations récentes sur la prévention et l'inhibition de la production du biofilm, par les extraits de *Juglans regia* additionnés aux antibiotiques, ont été évaluées, révélant ainsi un effet significatif contre les *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* [24,46].

Conclusion

En dépit des progrès thérapeutiques, les IOA sur matériel prothétique restent toujours des complications fréquentes postchirurgicales. L'intérêt de cette étude était de valoriser une solution antiseptique à base d'extrait de *Juglans regia* (L.) visant à motiver son potentiel thérapeutique contre les IOAM en chirurgie orthopédique postopératoire. La solution antiseptique 2 %, élaborée par l'incorporation de l'extrait éthanolique dans la préparation galénique comme principe actif, présente un potentiel antibiofilm significatif sur l'adhérence in vitro des *Staphylococcus aureus* isolées cliniquement. En raison de l'efficacité de la solution antiseptique 2 % mise en évidence par les différents tests, sa valorisation à l'échelle industrielle semble très prometteuse. En effet, cette plante médicinale constitue ainsi une source riche en substances bioactives, ouvrant un large horizon à des perspectives très intéressantes en matière de soins et de santé.

Remerciements Nous remercions la direction générale de la Recherche scientifique et du Développement technologique (DGRSDT) ainsi que tous les membres des laboratoires du CHU Frantz-fanon et de Vague De Fraîcheur[®], Blida.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Irda N, Putineanu D, Tribak K, et al (2016) Innovations en chirurgie orthopédique et traumatologie que retenir de 2015 ? *Louvain Med* 135:81-5
- Ader F, Salomon J, Perronne C, et al (2004) Origine de l'infection osseuse : endogène ou exogène ? *Éléments de physiopathologie. Med Mal Infect* 34:530-7
- Zimmerli W (2014) Clinical presentation and treatment of orthopedic implant-associated infection. *J Intern Med* 276:111-9
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22
- Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK (2005) Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 87:1343-7
- Trand A, Patel R (2014) Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev* 27:302-45
- Tong SY, Davis J S, Eichenberger E, et al (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28:603-61
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 21:e1-25
- Lebeaux D, Ghigo JM (2012) Infections associées aux biofilms — Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Med Sci* 28:727-39
- Mashhady M A, Abkhoo J, Jahani S, et al (2016) Inhibitory effects of plant extracts on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Int J Infect* 3:1-5
- Kazemian H, Ghafourian S, Heidari H, et al (2015) Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop* 48:432-6
- Vacheethasane K, Temenoff JS, Higashi JM, et al (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* stains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res* 42:425-32
- Song Z, Borgwardt L, Hoiby N, et al (2013) Prosthesis infections after orthopedic joint replacement : the possible role of bacterial biofilms. *Orthop Rev (Pavia)* 5:65-71
- Hoston P, Rowe SE, Possi C, et al (2011) Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 79:1153-65
- Brooks JL, Jefferson KK (2014) Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 10:1-9
- Bibbo C, Brueggeman J (2010) Prevention and management of complications arising from external fixation pin sites. *J Foot Ankle Surg* 49:87-92
- Alberti B, Ayma F, Barbe M, et al (2004) Hygiène des plaies et pansements. Bulletin de recherche du centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales (interrégion Ouest), 104 p

18. Boukhatem MN (2020) Effective antiviral activity of essential oils and their characteristic terpenes against coronaviruses: an update. *J Pharmacol Clin Toxicol* 8:1138–45
19. Mickymaray S (2019) Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics* 8:257–314
20. Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Boyunegmez Tumer T, et al (2019) Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs. *Biomolecules* 9:679–731
21. Tajamul IS, Ekta S, Gowhar AS (2015) Antiproliferative, cytotoxicity and antioxidant activity of *Juglans regia* extract. *Am J Cancer Prev* 3:45–50
22. Kale AA, Gadkari TV, Devare SM, et al (2012) GC-MS study of stem bark extract of *Juglans regia* L. *Res J Pharm. Biol Chem Sci* 3:740–43
23. Stampar F, Solar A, Hudina M, et al (2006) Traditional walnut liqueur — cocktail of phenolics. *Food Chem* 95:627–31
24. Dolatabadia S, Moghadam HN, Mahdavi-Ourtakand M (2018) Evaluating the antibiofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 118:285–9
25. Husein AI, Al-Nuri MA, Zatar NA, et al (2012) Isolation and antifungal evaluation of *Juglans regia* L. extracts. *IJRRAS* 13:665–70
26. Wang X, Zhao MM, Su GW, et al (2016) Antihyperuricemic activities of an ethanolic and aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L.) shell and a new aldehyde xanthine oxidase inhibitor. *Int J Food Sci Technol* 51:453–60
27. Ji Y, Qua ZY, Xiang Z (2011) Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Exp Toxicol Pathol* 63:69–78
28. Shah TI, Sharma E, Shah GA (2015) Antiproliferative, cytotoxicity and anti-oxidant activity of *Juglans regia* extract. *Am J Cancer Prev* 3:45–50
29. Orhan IE, Sutar IP, Akkol EK (2011) In vitro neuroprotective effects of the leaf and fruit extracts of *Juglans regia* L. (walnut) through enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. *Int J Food Sci Nutr* 62:781–6
30. Wang X, Chen H, Li S, et al (2016) Physicochemical properties, antioxidant activities and antihypertensive effects of walnut protein and its hydrolysate. *J Sci Food Agric* 96:2579–87
31. Bati B, Celik I, Dogan A (2015) Determination of hepatoprotective and antioxidant role of walnuts against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Cell Biochem Biophys* 71:1191–8
32. Zameer F, Rukmangada M, Chauhan JB, et al (2016) Evaluation of adhesive and antiadhesive properties of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their inhibition by herbal plants. *Iran J Microbiol* 8:108–19
33. Onsare J, Arora D (2015) Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* 118:313–25
34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020) Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale. 8^e édition, Algérie
35. Schwindl S, Kraus B, Heilmann J (2017) Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves. *Phytochemistry* 144:58–70
36. Benahmed-Djilali A, Chemoul T, Kal S, et al (2018) Propriétés d'une pommade antibactérienne formulée à base de saponines extraites des feuilles de noyer. *Phytothérapie* 16:S245–S253
37. Sher Z, Khan Z, Hussain F (2011) Ethnobotanical studies of some plants of Chagharzai valley, district Buner, Pakistan. *Pak J Bot* 43:1445–52
38. Baytop T (1999) Therapy with Medicinal Plants in Turkey (past and present). 2nd edition, Nobel Medicine Publisher, Turkey, 480 p
39. Bennacer A, Cherif HS (2017) Contribution to the ethnobotanical, phytochemical, antimicrobial and antioxidant study of the leaves' aqueous extract of the common walnut "*Juglans regia* L." *IJPPE* 7:41–52
40. Hoad-Reddick DA, Evans CR, Norman P, et al (2005) Is there a role for extended antibiotic therapy in a two stage revision of the infected knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 87:171–4
41. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22:996–1006
42. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, et al (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94:278–85
43. Zakavi F, Golpasand Hagh L, Daraeighadikolaei A, et al (2013) Antibacterial effect of *Juglans regia* bark against oral pathologic bacteria. *Int J Dent* 2013:1–5
44. Rao AV, Gurfinkel DM (2000) The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metab Drug Interact* 17:211–35
45. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, et al (2008) Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 118:418–28
46. Abidi SH, Ahmed K, Sherwani SK, et al (2015) Synergy between antibiotics and natural agents results in increased antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dev Ctries* 9:925–9

