

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعد دحلب البلدية (1)  
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : **Biochimie**

### Thème

**Evaluation biologique, pharmacologique et potentiel thérapeutique  
de *Juglans regia* L. dans la santé buccodentaire**

*Présenté par :*

*Soutenu le :01/07/2024*

ABBAD Maroua

ZAHRA Khedidja

**Devant le jury :**

Dr. TOUAIBIA M.

MCA /USDB1

Présidente

M<sup>me</sup> TOBAL SEGHIR S.

MAA/USDB1

Examinatrice

Dr. DJAIRENE N.

Docteur/USDB1

Promotrice

**Année universitaire : 2023/2024**

## Remerciements

*Avant tout, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude au bon Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force, le courage et la volonté qui nous a permis d'être ce que nous sommes aujourd'hui. Car l'homme propose mais ALLAH dispose.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à **Dr. TOUAIBIA M.** qui a eu la volonté d'accepter d'être présidente de ce jury. Assurée de l'intérêt que vous portez à ce travail, on reste convaincu que votre présence nous assurera de la valorisation et de la teneur de notre projet. Veuillez croire en notre éternel respect et notre sincère gratitude.*

*Nos remerciements les plus distingués à **Mme TOUBAL S.** Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail et l'enrichir des éminentes compétences scientifiques dont son enseignement et sa passion resteront des exemples pour nous. Veuillez accepter ce travail, en gage de notre grand respect et notre profonde reconnaissance.*

*En guise de reconnaissance, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre chère enseignante encadrant **Dr. DJAIRENE N.** pour son énorme soutien, qui n'a cessé de nous prodiguer tout au long du travail, nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances, compétences, de ses conseils et de son suivi. Nous la remercions de la qualité de son encadrement exceptionnelle, pour sa patience, sa gentillesse non limitée, sa rigueur, sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire. Du fond du cœur,  
Merci.*

*Nos profonds remerciements vont également au chef d'option de Biochimie **Pr SAIDI F.,** directrice du laboratoire de recherche des Biotechnologies, environnement et Santé, pour ses efforts et ses conseils durant notre carrière universitaire.*

*Nous exprimons nos remerciements à l'ensemble des enseignants du département des Sciences biologiques qui ont contribué à notre formation.*

Nos sincères remerciements s'adressent à **Mme IHCENE**, ingénieur de laboratoire PFE/USBD, ainsi qu'à **Mme SABAH** et **Mme HAYAT** pour tous leurs conseils et leur aide. Nous tenons également à remercier **Mme HADJER**, ingénieur du laboratoire de recherche des Biotechnologies, Environnement et Santé.

Nos remerciements vont également à **Mr FATAH**, pour nous avoir fourni le matériel végétal, point de départ de notre étude, et bien sûr **Mr METAIL M.**, pour l'identification botanique de la plante et **Dr. Oulmi A** pharmacienne spécialiste en bactériologie médicale au laboratoire de bactériologie, hôpital de Koléa, pour nous avoir fourni le matériel microbien.

Nous tenons à remercier vivement **Mr TAFANI D**, pour nous avoir permis de réaliser la majeure partie expérimentale des analyses microbiologiques au laboratoire d'hygiène de référence wilaya de Blida. Pour nous avoir conseillé et guidé avec bienveillance. Nous remercions également **Mr WALIDE**, chef de service de centre de transfusion sanguin (CTS), et plus particulièrement **Mr HAMIDE**, pour sa contribution.

Nous adressons un immense remerciement à **Mr NOUAS S.**, responsable de laboratoire control qualité de l'unité SAIDAL/Gué de Constantine, de nous avoir acceptés au niveau de leur laboratoire.

Nous remercions également :

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

Les médecins qui ont contribué à la réalisation de cette étude. On pense plus particulièrement au professeur **MEDDAH**, chef de service à la clinique dentaire Ahmed Zabana, sans oublier professeur **ATROUCHE** pour sa grande disponibilité. En particulier à **Dr BENHALAL**, enseignant à la faculté de médecine et responsable de laboratoire d'analyse médicale.

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui nous ont aidé de près ou de loin, nous leur adressons nos remerciements les plus sincères.

# Dédicaces

*Je commence ma dédicace au nom de Dieu et le salut sur Mohamed le messager de Dieu*

*Je voudrais dédier ce modeste travail :*

*À ma chère mère Soumia, la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie qui apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. Sans toi, je n'ai pas pu être ce que je suis et je ne saurais pu progresser et achever ce travail.*

*À mon père Azzedine, aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime et le respect que j'ai toujours en pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, ma formation et mon bien être.*

*C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect, j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.*

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

*À mes deux perles mes sœurs Hiba et Hafsa et mon très cher frère Abdelbassit que je souhaite un avenir radieux,*

*À mes grandes pères que Dieu vous gars et vous accords santé, bonheur et langue vie.*

*A toute ma famille maternelle et paternelle.*

*À ma binôme Maroua, Avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de travailler afin d'achever mon cycle de master et mon cursus universitaire. On a passé des moments de joie, la tristesse et les différentes pressions, on a pris beaucoup de plaisir à réaliser ce travail.*

*À mes professeurs, pour leur enseignement précieux et leurs conseils avisés.*

*À tous mes collègues de la promotion 2024 de Biochimie.*

*À toutes personnes qui m'ont aidé d'un mot, d'une idée ou d'un encouragement, je dis  
« merci ».*

**Khadija**

## Dédicaces

Dieu merci, grâce auquel de bonnes actions sont faites.  
Ce travail est dédié à ceux qui ont éclairé mon chemin et m'ont soutenu tout au long de mon parcours.

À mes parents, **Mohamed et Akila MSSADI**, merci d'avoir toujours cru en moi, même lorsque je doutais de moi-même. Vous m'avez inculqué la valeur du travail, de la persévérance et de la poursuite de mes rêves. Je suis infiniment reconnaissant pour votre amour et votre soutien indéfectibles. Qu'Allah vous protège et prenne soin de vous et prolonge votre vie.

À mes sœurs, **Roufaïda et Raihane**, et à mes frères, **Boualem, Rabeh et Ahmed**, merci d'être toujours là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Votre présence et votre amour inconditionnels ont été une source de force et d'inspiration tout au long de ma vie.

À ma promotrice, **Dr DJAIRENE Nasima**, merci pour vos conseils avisés et votre mentorat précieux tout au long de ce travail. Votre patience, vos encouragements et votre expertise m'ont permis de surmonter les défis et d'atteindre notre objectif. Je suis extrêmement chanceux d'avoir eu l'opportunité de travailler sous votre direction.

À ma binôme, **Khadidja**, je dédie ce travail en souvenir de nos discussions passionnées, de nos solutions innovantes et de notre engagement partagé envers l'excellence. Ensemble, nous avons relevé des défis, exploré des idées et mené à bien cette recherche avec passion et détermination. Je suis reconnaissant pour votre collaboration et votre amitié.

À tous mes amis et collègues de la promotion de master en Biochimie, votre amitié est un cadeau inestimable que je chéris profondément.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Votre soutien et votre encouragement m'ont été d'une grande aide. Je suis reconnaissant pour la chance d'avoir été entouré de tant de personnes merveilleuses tout au long de mon parcours

**Maroua**

## ***Résumé***

Ce présent travail contribue à la valorisation *in vitro* de la partie aérienne de *Juglans regia* L., plante médicinale fortement utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne.

Le screening phytochimique des molécules bioactives montre une abondance significative des composés phénoliques dans l'extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux, tel que les phénols, les tanins, les saponines, les terpenoïdes, des alcaloïdes et les quinones libres.

L'étude antimicrobienne a révélé que l'extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux possède un effet antimicrobien significatif contre les souches de références testées, avec des zones d'inhibition comprises entre 16 mm et 44 mm.

Le bain de bouche formulé à base d'extrait éthanolique de *J.regia* L. a montré un potentiel anticariogène sur la croissance des germes pathogènes des infections bucco-dentaires, avec des zones d'inhibition très importantes qui varient entre 10,5 mm et 39 mm. En outre, le bain de bouche a prouvé une efficacité antibiofilm contre deux souches microbiennes : *Entérocooccus faecalis* (ATCC 29212) et *Staphylococcus aureus* cliniquement isolée.

L'étude de l'activité antiradicalaire par la méthode de réduction des radicaux libres (DPPH) s'est révélée modérée pour l'extrait éthanolique, comparativement avec celle de l'acide ascorbique, avec un EC50 égal 88 et 78mg/ml respectivement.

L'étude de la toxicité érythrocytaire de l'extrait éthanolique incorporé comme un principe actif dans la formulation pharmaceutique, n'a pas décelé un effet toxique sur les hématies même à des fortes concentrations.

Les résultats trouvés dans cette étude suggèrent que les écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. peuvent être considérées comme une source puissante des principes actifs utilisés intensivement dans les industries pharmaceutiques.

**Mots clés:** *Juglans regia* L., Infections bucco-dentaires, bain de bouche, antimicrobienne, toxicité.

## Abstract

The present work contributes to the in vitro valorization of the aerial part of *Juglans regia* L., a medicinal plant widely used in traditional Algerian medicine.

Phytochemical screening of bioactive molecules showed a significant abundance of phenolic compounds in the ethanolic extract of young twig bark, such as phenols, tannins, saponins, terpenoids, alkaloids and free quinones.

The antimicrobial study revealed that the ethanolic extract of young twig bark had a significant antimicrobial effect against the reference strains tested, with zones of inhibition ranging from 16 mm to 44 mm.

Mouthwash formulated with ethanolic extract of *J.regia* L. showed anticariogenic potential on the growth of pathogenic germs of oral infections, with very significant inhibition zones ranging from 10.5 mm to 39 mm. In addition, the mouthwash demonstrated antibiofilm efficacy against two microbial strains: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and clinically isolated *Staphylococcus aureus*.

Free radical scavenging (DPPH) was moderate for the ethanolic extract, compared with ascorbic acid, with EC50 values of 88 and 78mg/ml respectively.

The erythrocyte toxicity study of ethanolic extract incorporated as an active ingredient in the pharmaceutical formulation did not detect a toxic effect on red blood cells even at high concentrations.

The results found in this study suggest that the bark of the young twigs of *Juglans regia* L. can be considered a potent source of the active ingredients used extensively in the pharmaceutical industries.

**Keywords:** *Juglans regia* L., Oral infections, mouthwash, antimicrobial, toxicity.

## المخلص

يساهم هذا العمل في التطوير المخبري للجزء الهوائي من نبات *Juglans regia* L.، وهو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب الجزائري التقليدي.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي للجزئيات النشطة بيولوجياً وفرة كبيرة من المركبات الفينولية في المستخلص الإيثانولي للحاء الأغصان الصغيرة، مثل الفينولات والعفص والصابونين والتربينويدات والقلويات والكينونات الحرة.

كشفت الدراسة المضادة للميكروبات أن المستخلص الإيثانولي من لحاء الأغصان الصغيرة كان له تأثير كبير مضاد للميكروبات ضد السلالات المرجعية التي تم اختبارها، حيث تراوحت مناطق التثبيط بين 16 مم و 44 مم.

وأظهر غسول الفم المركب من المستخلص الإيثانولي لحاء الغصن الصغير قدرة مضادة للميكروبات ضد نمو الجراثيم المسببة للأمراض في التهابات الفم والأسنان، مع وجود مناطق تثبيط كبيرة جداً تتراوح بين 10.5 مم إلى 39 مم. وبالإضافة إلى ذلك، أظهر غسول الفم فعالية مضادة للأغشية الحيوية البيوفيلمية ضد سلالتين ميكروبيتين: المكورات العنقودية البرازية، (ATCC 29212) والمكورات العنقودية الذهبية المعزولة سريريًا.

كانت دراسة النشاط المضاد للجذور الحرة باستخدام طريقة اختزال الجذور الحرة (DPPH) معتدلة بالنسبة للمستخلص الإيثانولي مقارنةً بنشاط حمض الأسكوربيك حيث بلغ التركيز المؤثر على 50% (EC50) 88 و 78 ملجم/مل على التوالي.

لم تكشف دراسة سمية كريات الدم الحمراء للمستخلص الإيثانولي المدمج كعنصر نشط في التركيبة الصيدلانية عن تأثير سام على خلايا الدم الحمراء، حتى عند التركيزات العالية.

وتشير النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة إلى أن لحاء الأغصان الصغيرة من نبات *Juglans regia* يمكن اعتباره مصدراً قوياً للمبادئ الفعالة المستخدمة بكثافة في الصناعات الدوائية.

**الكلمات المفتاحية:** *Juglans regia* L.، التهابات الفم، غسول الفم، مضاد للميكروبات، السمية.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Différentes parties de l'arbre et du fruit de noyer.....	4
<b>Figure 02</b> : Quelques structures chimiques des composés phytochimiques présents dans les écorces des jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	7
<b>Figure 03</b> : Mécanisme d'action antimicrobien.....	11
<b>Figure 04</b> : Jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	14
<b>Figure 05</b> : Organigramme de la démarche expérimental.....	16
<b>Figure 06</b> : Poudre des écorces des jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	17
<b>Figure 07</b> : Procédé d'extraction.....	18
<b>Figure 08</b> : Formulation bain de bouche.....	24
<b>Figure 09</b> : Contrôle microbiologique de bain de bouche .....	25
<b>Figure 10</b> : Prélèvements cliniques (caries et plaque dentaires).....	26
<b>Figure 11</b> : Prélèvements cliniques.....	26
<b>Figure 12</b> : Isolement des <i>Streptococcus sp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida sp</i> .....	28
<b>Figure 13</b> : Méthode de diffusion radiale par puits.....	30
<b>Figure 14</b> : Série des dilutions au moitié de bain de bouche.....	31
<b>Figure 15</b> : Formation du biofilm en microplaque (la méthode de TCP).....	33
<b>Figure 16</b> : Technique d'anti-biofilm sur microplaque.....	34
<b>Figure 17</b> : Méthodologie de test antibiofilm sur Eppendorfs.....	36
<b>Figure 18</b> : Forme libre et réduite de DPPH.....	37
<b>Figure 19</b> : Préparation des érythrocytes humains.....	39
<b>Figure 20</b> : Réalisation des frottis sanguins.....	39

<b>Figure 21</b> : Qualité microbiologique de bain de bouche.....	45
<b>Figure 22</b> : Répartition selon le site de prélèvement.....	46
<b>Figure 23</b> : Répartition selon la fréquence des germes isolés.....	47
<b>Figure 24</b> : Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de <i>J. regia</i> .....	49
<b>Figure 25</b> : Répartition selon la sensibilité des souches.....	53
<b>Figure 26</b> : Répartition selon la fréquence des germes résistants.....	53
<b>Figure 27</b> : Sensibilité des souches <i>Streptococcus sp.</i> .....	54
<b>Figure 28</b> : Sensibilité des souches <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>Figure 29</b> : Sensibilité des souches de <i>Candida sp.</i> .....	55
<b>Figure 30</b> : Production de biofilm par <i>E. faecalis</i> et de <i>Staphylococcus aureus</i> révélée par la technique de tissu en plaque TCP.....	58
<b>Figure 31</b> : Réduction de biofilm d' <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 et de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	58
<b>Figure 32</b> : Réduction du Log UFC d' <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 et <i>Staphylococcus aureus</i> par le bain de bouche.....	60
<b>Figure 33</b> : Résultats de l'activité antioxydante.....	61
<b>Figure 34</b> : 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.....	62
<b>Figure 35</b> : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine E.....	62
<b>Figure 36</b> : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine C.....	62
<b>Figure 37</b> : Toxicité érythrocytaire à différents concentration de l'extrait éthanolique sous microscope Gx100.....	64
<b>Figure 38</b> : Toxicité érythrocytaire sous microscope Gx100.....	64

<b>Figure 39:</b> Solution DPPH.....	Annexe 1
<b>Figure 40:</b> Spectromètre UV-visible.....	Annexe 1
<b>Figure 41:</b> Vitamine C .....	Annexe 1
<b>Figure 42 :</b> Bi-Orogyl.....	Annexe 1
<b>Figure 43 :</b> Le milieu MH au sang cuit .....	Annexe 1
<b>Figure 44:</b> Le milieu MH.....	Annexe 1
<b>Figure 45 :</b> Les différentes parties aériennes du la plante <i>Juglans regia</i> L.....	Annexe 2
<b>Figure 46:</b> Répartition selon le sexe.....	Annexe 5
<b>Figure 47 :</b> Répartition selon la tranche d'âge.....	Annexe 5
<b>Figure 48 :</b> Les étapes de la coloration de Gram .....	Annexe 6
<b>Figure 49 :</b> <i>Staphylococcus aureus</i> : cocci en grappe de raisin, Gram positif .....	Annexe 6
<b>Figure 50 :</b> <i>Streptococcus sp</i> : cocci en chaînette, Gram positif.....	Annexe 6
<b>Figure 51 :</b> Résultats de test oxydase.....	Annexe 6
<b>Figure 52 :</b> Résultats de test catalase .....	Annexe 6
<b>Figure 53 :</b> Teste de coagulase sur lame.....	Annexe 6
<b>Figure 54 :</b> Teste de coagulase en tube.....	Annexe 6
<b>Figure 55 :</b> <i>Candida sp</i> x40.....	Annexe 6
<b>Figure 56 :</b> Résultats des CMI pour les <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida albicans</i> .....	Annexe 8
<b>Figure 57 :</b> Résultat des CMB pour les <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida albicans</i> .....	Annexe 8
<b>Figure 58:</b> Résultats de test antibiofilm <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	Annexe 8

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Description des différentes parties de l'arbre et leur cycle de vie.....	4
<b>Tableau II :</b> Métabolites primaires et secondaires de <i>Juglans regia</i> L.....	6
<b>Tableau III :</b> Propriétés pharmacologiques et biologiques de <i>Juglans regia</i> .L.....	7
<b>Tableau IV :</b> Souches microbiennes de référence (ATCC).....	15
<b>Tableau V:</b> Composition de bain de bouche à base d'extrait des écorces des jeunes rameaux ( <i>Juglans regia</i> L.).....	23
<b>Tableau VI :</b> Caractérisation des espèces bactériennes isolées.....	28
<b>Tableau VII :</b> Rendement de l'extrait éthanolique par rapport à la matière végétale.....	41
<b>Tableau VIII :</b> Aspect, couleur et odeur de l'extrait éthanolique de <i>Juglans regia</i> L.....	42
<b>Tableau IX :</b> Caractérisation des substances chimiques des écorces des jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	43
<b>Tableau X :</b> Caractéristiques organoleptiques et chimiques de bain de bouche.....	45
<b>Tableau XI :</b> Qualité microbiologique de bain de bouche.....	45
<b>Tableau XII :</b> Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées de la cavité buccale.....	47
<b>Tableau XIII :</b> Diamètres des zones d'inhibition des souches (ATCC).....	49
<b>Tableau XIV :</b> Diamètre des zones d'inhibition des germes oraux.....	52
<b>Tableau XV:</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) et profil bactéricide/ bactériostatique, profil fongicide/ fongistatique.....	56
<b>Tableau XVI :</b> Résultats du test de mesure de pourcentage d'inhibitions du radical DPPH.....	61
<b>Tableau XVII :</b> Matériel utilisé.....	Annexe 1
<b>Tableau XVIII :</b> Résultats des tests phytochimiques.....	Annexe 3

**Tableau XIX :** L'écart type des résultats de test d'aromatogramme.....Annexe 7

**Tableau XX :** Résultats du test de DPPH (les densités optiques) .....Annexe 7

## Liste des abréviations

**ADN :** Acide désoxyribonucléique

**AFNOR:** Association française de normalisation

**Amx:** Amoxicilline

**APG IV:** Angiosperm Phylogeny Group IV

**ARN :** Acide ribonucléique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BDB:** Bain de bouche

**C50:** Concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition

**CLSI:** Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale

**CMB:** Concentration Minimale Bactéricide

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**CMIB:** Concentration minimale inhibitrice de biofilm

**DPPH:** 2,2-diphényl-1 Picryl-hydrazyl.

**EC50:** Efficient concentration 50

**Gram-:** Gramme négatif

**Gram+:** Gramme positif

**GSC:** Gélose au sang cuit

**MF:** Mc-Farland

**MGG:** May-Grünwald Giemsa

**MH:** Müller Hinton

**NCTC :** National Collection of Type Cultures

**OMS:** Organisation mondiale de la santé

**PBS:** Tampon phosphate salin

**pH:** Potentiel d'Hydrogène

**TCP:** Technique de tissu en plaque

**UFC:** Unité formant Clonie

**UV-Vis:** Ultraviolet visible

## Glossaire

**Gingivite** : inflammation superficielle de la gencive marginale, stade initial de la maladie parodontale. Se caractérise par un œdème, une rougeur et un saignement au sondage ou au brossage. Réversible et directement liée à l'accumulation de plaque dentaire.

**Classification APG (Angiosperm Phylogeny Group)** : est une classification botanique des angiospermes (fleurs) basée sur des études phylogénétiques. Elle a été mise à jour plusieurs fois, avec les versions APG I (1998), APG II (2003), APG III (2009), et APG IV (2016).

**Parodonte** : est l'ensemble de tissus qui entourent et soutiennent les dents. Il est composé de la gencive, de l'os alvéolaire, du ligament alvéolo-dentaire et du ciment. Sa fonction principale est de maintenir les dents.

**Parodontite**: atteinte du parodonte profond, avec destruction du tissu osseux et ligamentaire. Stade plus avancé et irréversible de la maladie parodontale.

**Muqueuse buccale** : est la paroi qui tapisse l'intérieur de la bouche. Elle joue un rôle important dans la protection des tissus contre les infections.

**Surfaces dentaires dures** : également appelées tissus durs dentaires, sont les parties de la dent qui sont visibles dans la bouche et qui ne sont pas recouvertes par la gencive.

**Tissus mous de la bouche** : également appelés tissus parodontaux, sont les tissus qui entourent et supportent les dents. Ils comprennent les gencives, le ligament parodontal, l'os alvéolaire et la muqueuse buccale.

## Table de matière

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Glossaire	
Introduction.....	1

### Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de l'espèce <i>Juglans regia</i> L.....	3
I.1.1.Nomenclature.....	3
I.1.2.Classification de genre <i>Juglans</i> .....	3
I.1.3.Description botanique de <i>Juglans regia</i> L.....	3
I.1.4.Origine et répartition géographique .....	5
I.1.5.Profil phytochimique .....	6
I.1.6.Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques .....	7
I.2.Santé buccodentaire .....	8
I.2.1.Flore bactérienne buccale .....	8
I.2.2.Infection et maladies dentaires.....	9
I.3. Mécanismes d'actions des molécules bioactives .....	10
I.3.1. Activité antimicrobienne.....	10
I.3.2. Hémato-toxicité.....	11
I.3.3. Activité antioxydante .....	11

### Chapitre II: Matériel et Méthodes

II.1.Lieux des expérimentations .....	13
II.2.Matériel biologique.....	14
II.2.1. Matériel végétal .....	14

II.2.2. Souches microbiennes .....	15
II.2.3. Source des souches dentaires pathogènes étudiée .....	15
II.3. Matériel non biologique.....	16
II.4. Méthodes .....	16
II.4.1. Identification de la plante .....	16
II.4.2. Préparation de l'extrait .....	16
II.4.3. Cinétique d'extraction et rendement.....	17
II.4.4. Calcul du rendement.....	18
II.4.5. Screening phytochimique .....	19
II.4.6. Screening pharmacologique .....	23
II.4.6.1. Elaboration de bain de bouche.....	23
II.4.6.2. Etude clinique des malades atteints des infections dentaires .....	25
II.4.6.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	27
II.4.7. Activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	37
II.4.8. Cytotoxicité érythrocytaire <i>Ex vivo</i> .....	38
II.4.9. Etude statistique.....	40

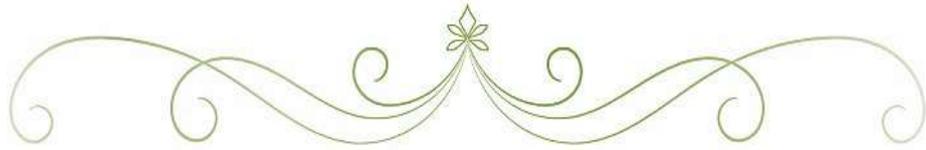
### **Chapitre III: Résultats et Discussion**

III.1. Résultats du rendement d'extraction des écorces des jeunes rameaux .....	41
III.2. Résultats du screening phytochimique des écorces des jeunes rameaux .....	42
III.3. Résultats de l'étude pharmacologique du bain de bouche .....	44
II.3.1. Etude analytique du bain de bouche .....	44
III.3.2. Contrôle de la qualité microbiologique du bain de bouche.....	45
III.3.3. Résultats de l'étude clinique .....	46
III.3.4. Résultats de l'activité antibactérienne.....	48
III.3.5. Résultats de la concentration minimal inhibitrice, bactéricide et fongicide (CMI /CMB/CMF).....	56
III.3.6. Résultats de l'activité de l'antibiofilm .....	57
III.4. Résultats de l'activité antioxydante.....	60
III.5. Résultats de la toxicité érythrocytaire <i>Ex vivo</i> .....	64
Conclusion.....	66

Références Bibliographiques

Annexes





## ***Introduction***



## Introduction

---

Les plantes médicinales et aromatiques ont connu une attention accrue ces dernières années, tant des chercheurs que des utilisateurs. Particulièrement, en raison de leur efficacité et de la facilité d'extraction de leurs composés chimiques. Les plantes médicinales sont utilisées largement pour traiter des infections variées, compris leur richesse en métabolites secondaires bioactifs (**Ouraini et al., 2007**).

Les infections buccales présentent un problème majeur de santé publique. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré que les maladies carieuses préoccupent la quatrième place dans la liste des maladies les plus répandues dans le monde (**Bouzidi, 2020**). Le processus carieux est une maladie microbienne grave et chronique, nécessitant des composants antimicrobiens efficaces. Les plantes médicinales sont considérées comme une source naturelle d'agents antibactériens. Leur valorisation est devenue actuellement une préoccupation importante dans de nombreux pays. L'OMS recommande l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des médicaments à base de plantes, en vue de standardiser leur usage et les intégrer dans les systèmes de soins conventionnels (**OMS, 2000**). Par ailleurs, 80% de la population humaine ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne.

L'Algérie, avec sa richesse et sa diversité de flore, constitue un réservoir phytogénétique qu'il joue un rôle indispensable dans la santé publique. Parmi ces plantes médicinales fortement utilisées en médecine traditionnelle algérienne (**Ali-Dellile, 2013**), iranienne (**Hosseinzadeh et al., 2011**), chinoise (**Liu et al., 2008**) et encore indienne (**Shah et al, 2003**), figure le noyer commun. Ce dernier est connu sous le nom scientifique *Juglans regia* L.

*J.regia* L. est une plante médicinale de la famille des *Juglandacea* , très utilisée par la population algérienne dans le but de prévenir contre les problèmes buccodentaires (**Aissi et Boudjelal, 2014**). Le noyer commun est un arbre fruitier et forestier de grande importance. Presque toutes les parties de la plante présentent des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques importantes. De nos jours, cette plante est utilisée à large spectre dans différents domaines : industries pharmaceutiques, agroalimentaires en cosmétologie, ainsi en cancérologie (**Zakavi et al., 2013**).

## Introduction

---

Les objectifs de la présente étude sont :

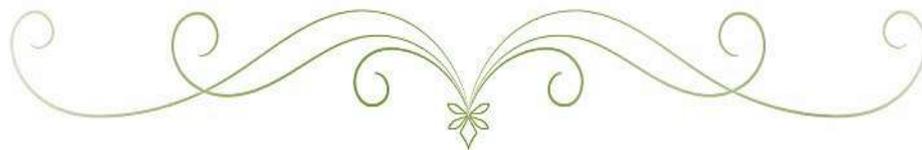
- Extraction, caractérisation chimique et activité biologique et pharmacologique des molécules bioactives des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L.
- Étude *in vitro* des activités biologiques de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L., impliquant l'activité anticariogène, le potentiel antibiofilm, l'activité antioxydante et la cytotoxicité érythrocytaire.
- valorisation des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. en les incorporant dans les produits de soins dentaires (bain de bouche) et l'étude de son potentiel vis-à-vis du maintien de l'hygiène buccale.

Le manuscrit est scindé en trois grands chapitres : le premier chapitre représente une synthèse bibliographique qui porte sur le noyer commun, la santé bucco-dentaire et le mode d'action des biomolécules ; le deuxième chapitre est consacré à l'expérimentation appliquée, décrivant le matériel végétal, la méthode d'extraction, le screening phytochimique et les méthodes d'évaluation des activités biologiques et pharmacologiques ; et le dernier chapitre comprend les résultats et discussion relatifs aux différents tests pratiqués. En fin, une conclusion générale basée sur l'ensemble des résultats obtenus et perspectives de recherche.



## *Chapitre I*

# *Synthèse Bibliographique*



### I.1. Présentation de l'espèce *Juglans regia* L.

*Juglans regia* L., communément appelé Noyer commun, est une espèce d'arbre forestier et fruitier d'importance majeure (Boukhari, 2017). Cet arbre présente plusieurs parties utiles, dont les feuilles, la coquille, la partie charnue du fruit vert et son bois. Au-delà de sa valeur agricole en tant que source de noix comestibles, le noyer offre une variété de produits dérivés de ses différentes parties. Feuilles, écorces, tiges, péricarpes, fruits, fleurs et membranes ligneuses sont des éléments utilisés extrêmement en médecine traditionnelle (Noumi *et al.*, 2012).

#### I.1.1. Nomenclature

- **En latin :** *Juglans regia* L.
- **En arabe :** الجوز، السواك (Delille, 2010).
- **En français :** Noyer commun, noyer royal, Gogulier, Calottieret eclonnier (Arnal *et al.*, 2009).
- **En anglais :** Commun walnut, Persian walnut, Walnut.

#### I.1.2. Classification de genre *Juglans*

La classification phylogénétique retenue est celle d'APG IV (Angiosperms Phylogeny Group) de 2016 :

**Régne :** Plantae

**Clade :** Spermatophyta

**Clade :** Angiospermes

**Clade :** Dicotylédones vraies

**Clade :** Rosidées

**Clade :** Eurosidées

**Ordre :** Fagales

**Famille :** Juglandaceae

**Genre :** *Juglans*

**Espèce :** *regia*

#### I.1.3. Description botanique de *Juglans regia* L.

Le genre *Juglans*, qui comprend 21 espèces, est largement répandu dans le monde entier, peut vivre de 150 à 200 ans. Le noyer est un arbre dicotylédone grand et haut : il

atteint une hauteur d'environ 25 mètres, et dépasse rarement les 30 mètres. Leur diamètre peut atteindre 80 à 90 cm. *Juglans regia* L. c'est une espèce de lumière, exigeant une exposition importante au soleil pour bien se développer (Tajamul *et al.* , 2014).



Figure 01 : Différentes parties de l'arbre et du fruit de noyer (Zurek, 2022)

Tableau I : Description des différentes parties de l'arbre et leur cycle de vie

Parties de l'arbre	<b>Racine</b>	Puissante et profonde, peut descendre jusqu'à 3 et même 5 m si le sol le permet (Becquey, 1997).
	<b>Ecorce</b>	Lisse de couleur marron avant d'être mature, gris argenté avec une texture plus rugueuse à large fissures pour les branches les plus matures (Sabatier, 1999).
	<b>Rameaux</b>	Gras, brun luisant, larges cicatrices foliaires triangulaires situées sous le bourgeon (Dupérat et Polese, 2008). -Jeunes rameaux : lisse, gris blanchâtre, parfois teinté de roux (Bretaudeau et Fauré, 1979).
	<b>Feuille</b>	Caduques atteignant les hauteurs, généralement avec un tronc court et une large couronne (Parle, 2023). Elles sont grandes de 25 jusqu'à 40 cm de long, disposées en alternance, imparipennées avec 5 à 9 folioles, jumelé en alternance avec une foliole terminale (Tajamul <i>et al.</i> , 2014).
	<b>Fleur</b>	Groupées en inflorescences spéciales qu'on nomme les chatons. Ces dernières sont soit toutes males, soit toutes femelles, portées par un même pied (la plante est monoïque).

		- <b>Les fleurs mâles</b> sont en chatons tombants de 5 à 10 cm de long. - <b>Les fleurs femelles</b> sont terminales, en groupes de deux à cinq (Stonehouse, 2013).
	<b>Fruit</b>	Drupe globuleuse verte, appelée noix. Le fruit entier compris : - <b>Brou</b> : enveloppe charnue verte qui noircit en séchant. - <b>Noyau</b> : coquille ligneuse formée de deux valves soudées. - <b>Amande</b> : partie comestible (Manning, 1978 ; Parle, 2023). Le fruit arrive à maturité au cours des mois de septembre ou d'octobre (Bonhomme, 2019).
	<b>Tronc</b>	Epaisse, grisâtre, crevasses profondes. Le tronc peut atteindre 30 m de hauteur et 2 m de diamètre. (Shah et Rather, 2018 ; Bonhomme, 2019 ; Gallais et Bannerot, 1992).
<b>Cycle de vie</b>	<b>Maturité du fruit</b>	Automne
	<b>Chute des noix</b>	Automne
	<b>Germination</b>	Printemps
	<b>Floraison</b>	Avril à Mai
	<b>Pollinisation anémophile (fécondation)</b>	Par le vent

#### I.1.4. Origine et répartition géographique

*Juglans regia* L., une espèce cultivée dans de nombreuses régions tempérées du monde, notamment en Europe (France, Italie, Yougoslavie, Roumanie), en Asie, en Afrique du Nord, en Amérique et en Australie (Ouis et Zitouni, 1996).

En Algérie, cet arbre majestueux s'est répandu principalement dans les zones montagneuses, suite à son introduction dans la région de R'haouat (les Moulins) à Batna (Bonev, 1973). Sa présence s'étend aujourd'hui à diverses régions du pays, telles que le massif de l'Aurès, les régions d'Annaba, Sétif, la grande Kabylie, Tlemcen, Tebessa, Djelfa, Saïda et même près de Sougueur au sud de Tiaret (Bonev, 1973 ; Boukhari, 2017).

## I.1.5. Profil phytochimique

Tableau II : Métabolites primaires et secondaires de *Juglans regia* L.

Métabolites primaires		Métabolites secondaires	
<b>Glucides</b>	Fructose, glucose, saccharose (Santos <i>et al.</i> , 2013).	<b>Tanins</b>	Ellagitanins et pyrogallol, présents dans les feuilles (Blumenthal <i>et al.</i> , 2000).
<b>Acides aminés</b>	L-proline, L-tyrosine, L-arginine, etc., présents surtout dans les feuilles (Kale et Karadeniz, 2010).	<b>Flavonoïdes</b>	Principalement sous forme de quercétine (quercétine 3-galactoside, quercétine 3-arabinoside, quercétine 3-xyloside, quercétine 3-rhamnoside, etc.) (Amaral <i>et al.</i> , 2004 ; Liu <i>et al.</i> , 2007).
<b>Éléments minéraux</b>	Cuivre, zinc, manganèse, etc. (Kale et Karadeniz, 2010).	<b>Composés phénoliques</b>	Caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique lié à un groupe hydroxyle (Bruneton, 1999). Les plus fréquents sont les acides phénoliques : acide para-hydroxybenzoïque, vanillique, gentisique, paracoumarique, gallique et chlorogénique (Luczak <i>et al.</i> , 1989 ; Blumenthal <i>et al.</i> , 2000, Jahanban-Esfahlan, 2019).
<b>Acides organiques</b>	Acide malique, acide shikimique, acide citrique, etc. (Santos <i>et al.</i> , 2013).		

Le noyer s'avère être une source riche en composés bioactifs, comme le révèlent des études récentes de Zurek, (2022). Les jeunes pousses de noyer, en particulier, constituent une source prometteuse de divers composés bénéfiques pour la santé. Parmi ces composés, on trouve :

- **Acides phénoliques:** acide p-coumarique, acide vanillique, acide gallique et juglone.
- **Flavonoïdes:** myricétine.
- **Quinones:** 1,4-naphtoquinone.

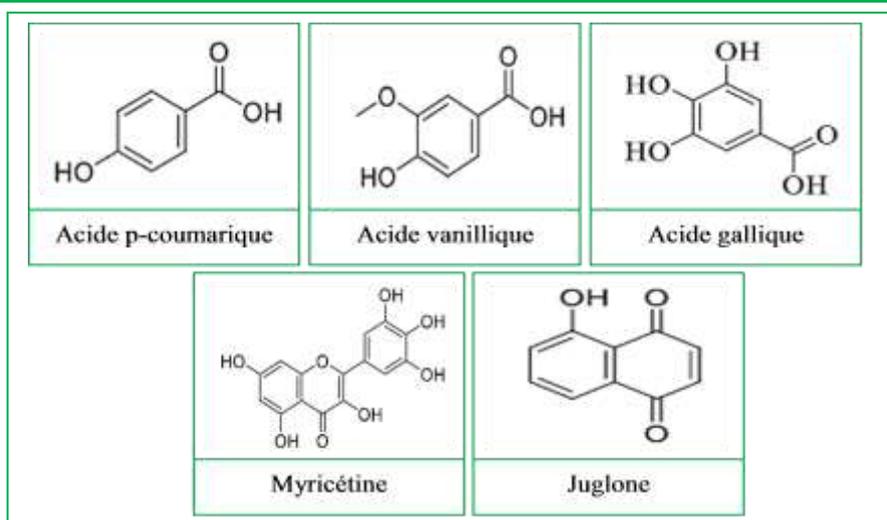


Figure 02 : Quelques structures chimiques des composés phytochimiques présents dans les écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. (Bhat *et al.* , 2023)

### I.1.6. Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques

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

Tableau III : Propriétés pharmacologiques et biologiques de *Juglans regia* L.

Parties de plantes	Composé phytochimique	Activité pharmacologique	Références
Écorce	Poly-phénols	Activité antibactérienne, antioxydant, action antifongique, activité hématostatique.	(Jamshid <i>et al.</i> , 2011) ; (Hubert et Grzegorz, 2015) ; (Tuqa <i>et al.</i> , 2017) ; (Verma et Sharma, 2020).
Tige/écorce de la tige	Juglone, sitostérol, acide ascorbique, quercétine-3-larabino, phénols, flavonoïdes, 1,4-naphthoquinone, acide p-coumarique, acide vanillique, gallique, myricétine.	Activité antifongique, antioxydante, antihelminthique et anti-diarrhéique, bactéricide, antihelminthique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, astringente, dépurative, diurétique, laxative, détergente et insecticide. Utilisée dans certains pays comme brosse à dents.	(Emira <i>et al.</i> , 2011) ; (Mohammed <i>et al.</i> , 2018) ; (Verma et Sharma, 2020) ; (Bhat <i>et al.</i> , 2023).

<b>Feuilles</b>	Acides phénoliques, acides gras essentiels, acide ascorbique, acide caféique, acide paracoumarique, juglone, tanins, flavonoïdes, alcaloïde, galactoside, arabinoside, côté xylo, rhamnoside et naphthoquinones.	Activité anti-oxydante, anti-âge, gastro-protectrice, hépatoprotectrice, activité hyper-cholestérolémique. effet hypo-lipidémiant, antihypertenseur, antimicrobiens, antidiabétique, anticancéreux.	(Fukuda <i>et al.</i> , 2004) ; (Zhang <i>et al.</i> , 2009) ; (Rahimipannah <i>et al.</i> , 2010) ; (Emira <i>et al.</i> , 2011) ; (Fang <i>et coll.</i> , 2015) ; (Mohammed <i>et al.</i> , 2018) ; (Verma <i>et Sharma</i> , 2020).
<b>Fleur</b>	Acide gallique, cumarin, quercétine, polyphénols, noïdes de saveur, stérols, graisses, protéines, vitamines, minéraux.	Antidépresseur, anti-hypoxique, anti-inflammatoire.	(Raheleh <i>et al.</i> , 2016) ; (Verma <i>et Sharma</i> , 2020).
<b>Fruits</b>	Acides gras, tocophérols, phytostérols, tanins phénoliques totaux.	Effets antimicrobiens, activité antioxydant, activité stimulant les hormones thyroïdiennes.	(Poyrazolu <i>et Biyik</i> , 2010) ; (Deshpande <i>et al.</i> , 2011).
<b>Coque verte de fruits</b>	Tanins, Glucose, acide citrique, acide malique, phosphate, oxalate de calcium, juglone, polyphénols.	Protecteur du foie et des reins.	(Hiroshi <i>et al.</i> , 2008) ; (Parivash <i>et al.</i> , 2011)
<b>Graines</b>	Glutéline, globulines, albumine et prolamines	Cicatrisation des plaies, Anti-cancer.	(Akram <i>et al.</i> , 2013) ; (Ruijun, 2015) ; (Rosaria <i>et al.</i> , 2019).

## I.2.Santé buccodentaire

### I.2.1.Flore bactérienne buccale

La cavité buccale constitue la deuxième communauté bactérienne la plus diversifiée du corps humain, avec plus de 700 espèces colonisant les surfaces dentaires dures et les tissus mous de la muqueuse (Boyer, 2019). Cet environnement favorise l'installation et la survie de bactéries, parasites, mycoplasmes, levures et virus (Abdelali *et al.*, 2019). La composition de la flore buccale est influencée par divers facteurs tels que l'âge, le site de prélèvement et la situation clinique.

Chez les sujets sains, les bactéries à Gram positif dominent la cavité bucco-dentaire. En revanche, chez les personnes souffrant d'infections parodontales, les bactéries à Gram négatif deviennent prépondérantes, tant quantitativement que qualitativement, dans les différentes parties de la bouche (**Bouzidi, 2020**).

### I.2.2. Infection et maladies dentaires

La carie dentaire et les maladies parodontales sont des pathologies infectieuses de la bouche qui résultent d'une activité bactérienne accrue dans un écosystème buccal déséquilibré (**Benmansour et al., 2007**).

#### I.2.2.1. Caries dentaires

La carie dentaire est une maladie infectieuse classée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) au 3ème rang des fléaux mondiaux, juste après les affections cancéreuses et les maladies cardio-vasculaires (**OMS, 2023**). La carie dentaire n'est pas une simple lésion affectant les tissus minéralisés de la dent, mais bien une maladie d'origine infectieuse.

La flore cariogène est composée d'une multitude de bactéries, mais trois groupes principaux se distinguent par leur rôle crucial dans l'initiation et la progression des lésions carieuses :

- **Streptocoques:** *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* sont les souches les plus virulentes. Elles adhèrent à la surface des dents, produisent des acides et dégradent la substance minérale dentaire, favorisant ainsi la formation de caries (**Bouzidi, 2020**).
- **Lactobacilles:** *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* se développent en second lieu, après l'apparition des caries, et contribuent à leur progression (**Benmansour et al., 2007**).
- **Actinomyces:** *Actinomyces viscosus* et *Actinomyces naeslundii* s'installent en profondeur dans la dentine infectée, participant à la chronicisation de la maladie (**Benmansour et al., 2007**).

#### I.2.2.2. Maladies parodontales

Les maladies parodontales sont des affections inflammatoires, plurifactorielles et généralement d'origine infectieuse qui touchent le parodonte, le système d'attache de la dent (**Bouzidi, 2020**). Elles peuvent être classées en deux catégories gingivite et parodontite.

### I.2.2.3. Plaque dentaire

La plaque dentaire est une communauté microbienne hétérogène et dynamique, adhérant à la surface des dents ou située dans l'espace gingivo-dentaire. Elle est composée d'une multitude de bactéries aérobies et anaérobies enrobées dans une matrice extracellulaire de polymères d'origine bactérienne et salivaire (Antezack, 2017). Ce biofilm, agrégat de bactéries et de leurs sécrétions, joue un rôle crucial dans la santé bucco-dentaire.

## I.3. Mécanismes d'actions des molécules bioactives

### I.3.1. Activité antimicrobienne

#### I.3.1.1. Activité antibactérienne

Les extraits de noyer ont démontré une activité antibactérienne à large spectre, agissant à la fois sur les bactéries Gram positives et Gram négatives (Aissi et Boudjelal, 2014; Bennacer et Cherif, 2017).

L'activité antimicrobienne des extraits de noyer est principalement attribuée aux flavonoïdes, en particulier les flavone-3-ols et les flavanols, ainsi que les tanins. L'efficacité de ces composés serait liée à la présence de groupements phénoliques, hydroxyyles, méthoxyyles ou glucosyles sur leur structure, plus sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganisme (Scalbert, 1991 ; Aissi et Boudjelal, 2014).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer leur mode d'action (Daglia, 2012):

- Inhibition de la synthèse d'acides nucléiques l'ADN et l'ARN.
- Perturbation des fonctions de la membrane cytoplasmique.
- Séquestration des nutriments nécessaires à la croissance bactérienne.
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien.

#### I.3.1.2. Activité anticandidosique

L'écorce de *Juglans regia* L. présente une forte activité antifongique contre de nombreux champignons, notamment sur *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*. Les flavonoïdes possèdent également une forte

activité antifongique : ils ont la capacité d'inhiber la germination des spores pathogènes (Aissi et Boudjelal, 2014).

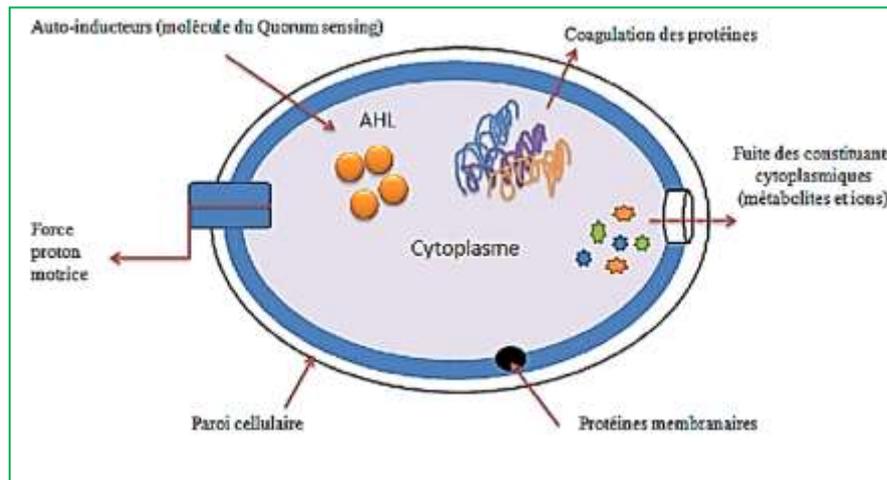


Figure 03 : Mécanisme d'action antimicrobien (Bouyahya *et al.*, 2017)

### I.3.2. Héματο-toxicité

Des recherches récentes ont exploré les mécanismes par lesquels les extraits de *Juglans regia* L. confèrent leurs propriétés protectrices contre les dommages aux globules rouges, causés par le stress oxydatif ou les réactions inflammatoires. Ces effets protecteurs semblent être attribuables à la présence des molécules bioactives dans le noyer (Rusu *et al.*, 2020 ; Fizeşan *et al.*, 2021 ; Bhardwaj *et al.*, 2023).

### I.3.3. Activité antioxydante

L'activité antiradicalaire est définie comme la capacité d'une molécule à inhiber, ralentir ou prévenir l'oxydation d'autres molécules induites par des espèces réactives de l'oxygène (Pisoschi et Negulescu, 2011). Les composés phénoliques, les flavonoïdes et le  $\alpha$ -tocophérol sont des antioxydants naturels couramment rencontrés (Gülçin, 2012).

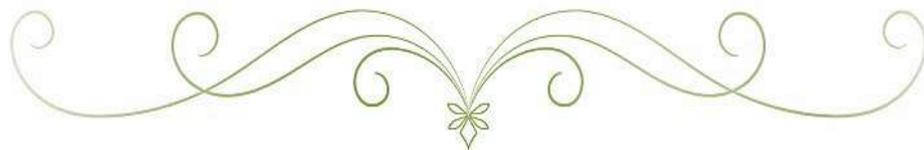
Les composés poly-phénoliques de *Juglans regia* L. se distinguent par leur puissante activité antioxydante. Cette efficacité remarquable se traduit par un meilleur renforcement de la résistance des globules rouges au stress oxydatif, comme il est démontré par des études *in vitro* et *in vivo* (Youdim *et al.*, 2000 ; Costa *et al.*, 2009). La capacité antioxydante des composés phénoliques est due à leur aptitude à neutraliser les radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène, ainsi à réduire les métaux comme le fer (Carvalho *et al.*, 2010).

Les composés phénoliques possèdent un potentiel antioxydant important en raison de leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir en tant qu'agents réducteurs, chélateurs de métaux, piègeurs de radicaux libres, extincteurs d'oxygène singulet et donneurs d'hydrogène. D'autre étude a démontré que *Juglans regia* L. peut réduire de manière dose-dépendante les dommages oxydatifs du désoxyribose (**Gupta, 2019**).



## *Chapitre II*

### *Matériel et Méthodes*



**II.1.Lieux des expérimentations**

Il s'agit d'une étude prospective, clinique et analytique, effectuée sur une période de Cinq mois, allant de Février 2024 jusqu'à Juin 2024.

Le présent travail a été réalisé au niveau de différentes structures scientifiques:

- Extraction et screening phytochimique : laboratoire de projet de fin d'étude (PFE) département de biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Blida 1 (Saad Dahleb).
- Concentration (évaporation) de l'extrait : laboratoire des biotechnologies, environnement et santé, Université Blida 1 (Saad Dahleb).
- Formulation du bain de bouche : laboratoire de projet de fin d'étude (PFE) département de biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Blida 1 (Saad Dahleb).
- Activité antioxydante : laboratoire physico-chimique de centre de recherche de développement de groupe (CRD) SAIDAL El Harrach, Alger.
- Activité antimicrobienne : laboratoire d'hygiène de référence wilaya de Blida.
- Etude clinique : clinique dentaire, Ahmed Zabana wilaya de Blida.
- Cytotoxicité érythrocytaire : centre de transfusion sanguin (CTS) de la wilaya de Blida.

**Type d'étude**

- a) Etude pharmacologique : identification des composés bioactifs de la plante, détermination des effets biologiques, pharmacologique et les mécanismes d'action de *Juglans regia* L. sur la santé bucco-dentaire.
- b) Etude microbiologique : identification des germes pathogènes responsables des maladies dentaires.
- c) Etude du potentiel thérapeutique : évaluation de l'efficacité de *Juglans regia* L. dans la prévention et le traitement des maladies bucco-dentaires.

## Objectif

L'étude vise à évaluer *in vitro* les propriétés biologiques et phytochimique de la partie aérienne (les écorces des jeunes rameaux) de la plante médicinale *Juglans regia* L., traditionnellement utilisée en Algérie pour traiter les affections de la cavité buccale.

L'extraction par éthanol 96° de la partie aérienne de la plante a été effectuée dont le but de démontrer la présence de substances bioactives, telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponines... et d'évaluer leur potentiel antimicrobien avec un focus sur l'activité anti-cariogène, ainsi leur pouvoir antioxydant en utilisant le radical libre DPPH. En outre, de prouver la stabilité de membrane des érythrocytes vis-à-vis de l'extrait.

## II.2. Matériel biologique

### II.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (écorces des jeunes rameaux) de noyer (*Juglans regia* L.), appartenant à la famille des *Juglandacées*. Les rameaux ont été récoltés le 30 novembre 2023 (journée ensoleillée), à partir d'un arbre (âgé de 37 ans) de la réserve naturelle de Mehdjar El Merdja, la région de Wlad Slama, Blida.

Wlad Slama, également connu sous le nom « Ouled Slama », est un lieu situé dans la wilaya de Blida, en Algérie. Il se trouve à environ 26 km du centre de Blida et bénéficie d'un climat méditerranéen, avec des hivers froids et pluvieux, et des étés chauds et secs.



Figure 04 : Jeunes rameaux de *Juglans regia* L. (Photo originale, 2024)

### II.2.2. Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne de l'extrait brut de *Juglans regia* L. a été évaluée sur diverses souches bactériennes, issues de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Tableau IV). Ces souches fournies par le laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida, ont été identifiées et caractérisées par l'institut PASTEUR d'Algérie (IPA).

Une souche bactérienne *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) fournie par le Laboratoire Central, Unité de Bactériologie, hôpital de Koléa, Tipaza, a été utilisée pour l'évaluation du potentiel anticariogène et antibiofilm.

**Tableau IV : Souches microbiennes de référence (ATCC)**

Espèces	Nature	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram +	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram +	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram -	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram -	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie Gram -	ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie Gram -	ATCC 9027
<i>Salmonella aboney</i>	Bactérie Gram -	NCTC 6017
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactérie Gram +	ATCC 29212
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérie Gram +	ATCC 6633
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231

(+) : Positive, (-) : Négative, ATCC : American Type Culture Collection, NCTC : National Collection of Type Cultures

### II.2.3. Source des souches dentaires pathogènes étudiée

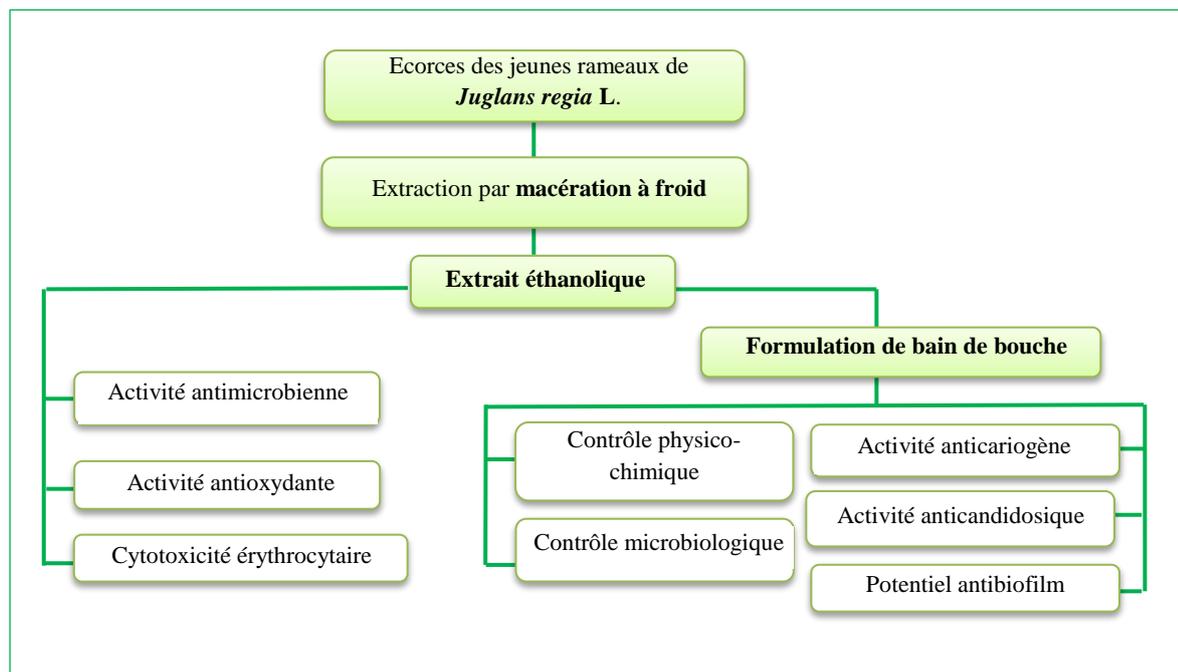
Des échantillons cliniques ont été effectués par un simple écouvillonnage chez 57 patients atteints des infections dentaires (plaques et caries profondes). L'ensemble des malades venus en consultation à la clinique Ahmed Zabana ont bénéficié d'un traitement et des soins dentaires.

### II.3. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel non biologique comprenant : de la verrerie, d'équipements, d'appareils, de réactifs et de produits chimiques est regroupé en **Annexe 1**.

### II.4. Méthodes

Le schéma adopté pour réaliser cette étude est résumé par la figure ci-dessous :



**Figure 05 : Organigramme de la démarche expérimental**

#### II.4.1. Identification de la plante

L'identification de la plante a été faite au département de Biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie Université Saad Dahleb Blida, par Mr METTAI M., Maître-assistant de classe B en botanique.

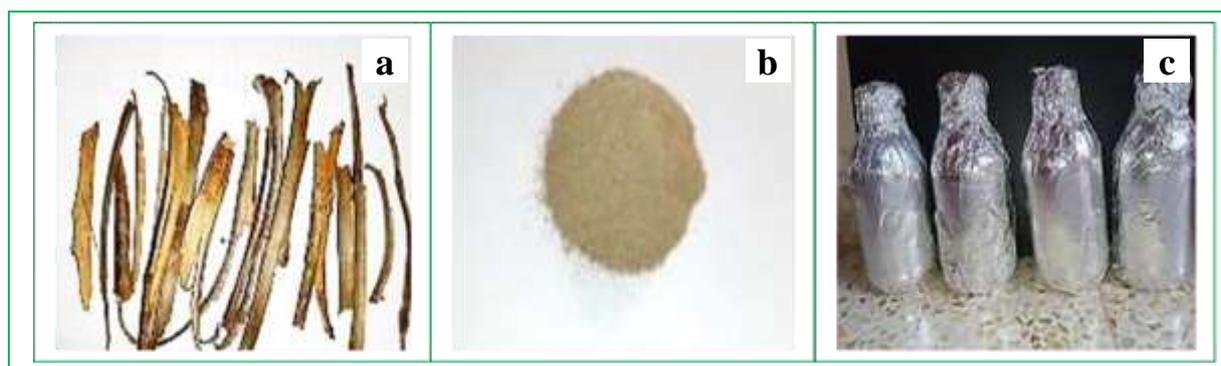
#### II.4.2. Préparation de l'extrait

Dans la présente étude, l'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* L. a été préparé suivant un protocole opératoire, afin d'évaluer son potentiel d'action sur les affections dentaires. La méthode d'extraction a été utilisée selon le protocole décrit par (Gbala et Anibijuwon, 2018).

### ➤ Traitement préliminaire des écorces des rameaux

Les écorces des rameaux fraîchement récoltés (0.565 Kg) ont été soigneusement nettoyées pour éliminer les débris, puis étalées sur du carton étendu sur le sol et laissées sécher à l'ombre, à l'abri de la poussière et dans un endroit bien aéré. Le matériel végétal a été disposé en fines couches et remué régulièrement pour assurer un séchage homogène. Le temps de séchage a été de 30 à 37 jours, permettant ainsi de préserver les molécules bioactives sensibles à la chaleur et à la lumière.

Une fois séchées, les écorces ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées afin d'obtenir une poudre très fine homogène. Cette dernière a été soumise à une extraction solide-liquide. 250 g de poudre d'écorces de noyer commun ont été obtenus. Cette poudre a été conservée dans des bocaux hermétiques à l'abri de la lumière et de l'humidité.



a : écorces séchés ; b : poudre végétale ; c : conservation de la poudre végétale

**Figure 06 : Poudre des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L.**

(Photos originales, 2024)

#### II.4.3. Cinétique d'extraction et rendement

Parmi les nombreuses méthodes d'extraction connues, on a utilisé l'extraction par macération à froid, suivant le protocole établi par (Gbala et Anibijuwon, 2018).

Le procédé d'extraction adopté consiste à macérer à froid 100g de poudre végétale dans un volume de 500 ml d'éthanol à 96%. Ce mélange a été soumis à une agitation continue pendant une durée de 72 heures à température ambiante.

Le filtrat obtenu a été soumis à une évaporation contrôlée à une température de 90°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Stuart.

L'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. a été soigneusement conservé dans des flacons en verre secs et stériles, à l'abri de la lumière et à une température de 4°C.

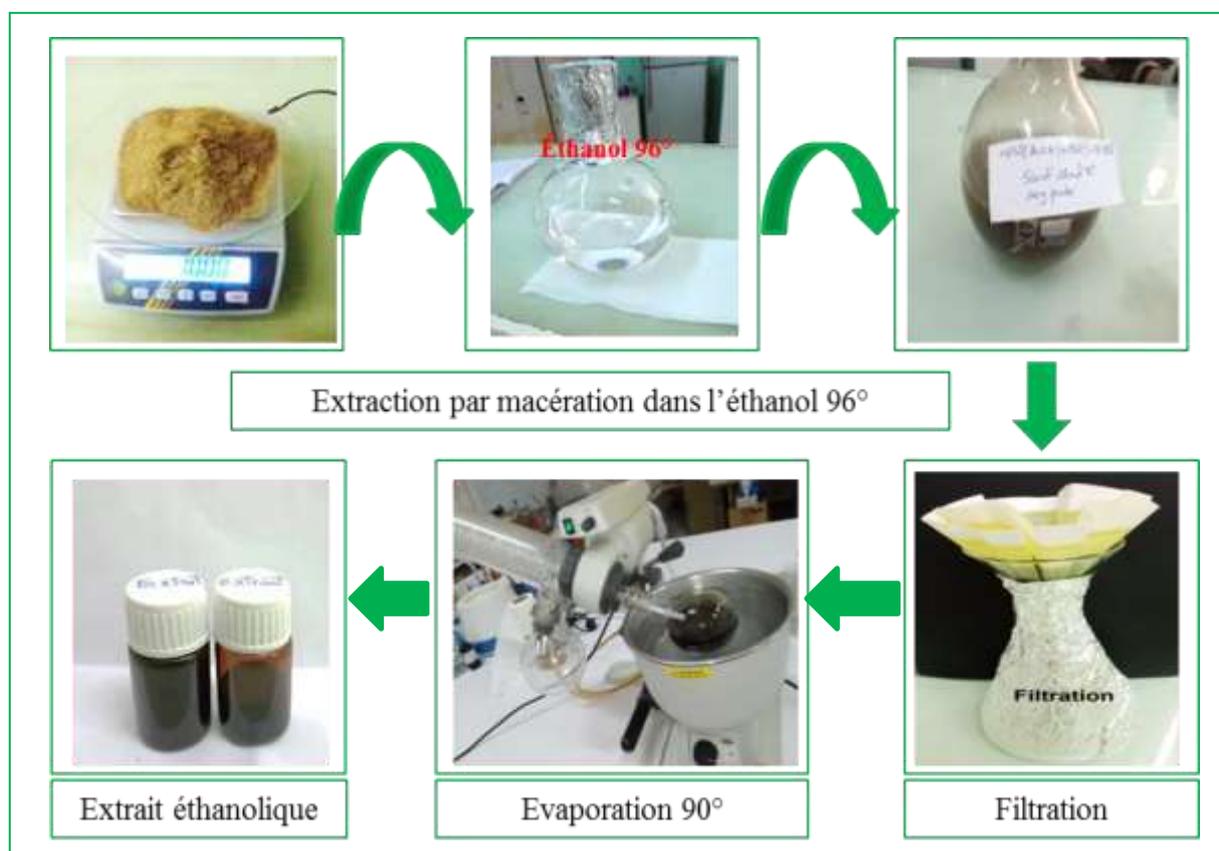


Figure 07: Procédé d'extraction (Photos originales, 2024)

#### II.4.4. Calcul du rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement (Rdt) est défini comme étant le rapport entre le poids de l'extrait sec obtenu et le poids de matière végétale utilisée.

Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \left[ \frac{P1 - P2}{P3} \right] \times 100$$

**P1** : Poids du ballon après évaporation.

**P2** : Poids du ballon vide.

**P3** : Poids de la matière végétale sèche de départ.

#### II.4.5. Screening phytochimique

Le processus de screening phytochimique appliqué sur la matière végétale repose sur des réactions de précipitation ou des réactions colorimétriques. Ces analyses visent à mettre en évidence la présence ou l'absence de principes actifs tels que les tanins, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines et les composés réducteurs. L'objectif de ces tests est de déterminer la composition chimique des écorces des jeunes rameaux de la plante *Juglans regia* L.

- **Mise en évidence des coumarines**

Dans un tube à essai, 2 grammes de poudre d'échantillon sont introduits dans 20 ml d'éthanol et agités pendant 15 minutes avant d'être filtrés. Ensuite, 5 ml du filtrat sont mélangés avec 10 gouttes de solution de KOH à 10% et quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10%. La disparition de la couleur jaune et l'apparition d'un trouble ou d'un précipité sont considérées comme un résultat positif, indiquant la présence de coumarines dans l'échantillon.

- **Mise en évidence des tanins**

1,5 g de poudre d'écorces est placé dans un tube à essai en contact avec 10 ml de méthanol. Après une agitation de 15 minutes, le mélange est filtré, puis quelques gouttes de trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1% sont ajoutées. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (Dohou *et al.*, 2003).

- **Mise en évidence des flavonoïdes**

Une quantité de 1,5 à 2 g de poudre d'échantillon est mélangée avec 2 ml de solution de NaOH à 2%. La formation d'une couleur jaune intense indique la présence de flavonoïdes. Ce résultat est confirmé par la disparition de la couleur jaune après l'ajout de quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl), qui donne une solution incolore (Yadav et Munin, 2011).

- **Mise en évidence des saponines**

Une quantité de 2 g de poudre d'échantillon est mélangée avec 20 ml d'eau distillée et portée à ébullition pendant 15 minutes avant d'être filtrée. Après refroidissement, 10 ml du filtrat sont mélangés avec 5 ml d'eau distillée et agités vigoureusement pendant 2 minutes. La

formation d'une mousse persistante, dont la hauteur dépasse 1 centimètre, après 15 minutes confirme la présence de saponines (**Bekroyves et al., 2007 ; Amin et al., 2013**).

▪ **Mise en évidence des quinones**

L'échantillon poudreux est dissous dans 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) dilué au 1/5, puis chauffé au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Après refroidissement 0,5 ml d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) dilué à 50% est ajouté. La présence de quinones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge à violette (**Bekroyves et al., 2007**).

▪ **Mise en évidence des anthraquinones**

Une quantité de 1 gramme de poudre de matériel végétal est mélangée avec 10 ml de chloroforme et agitée manuellement pendant une minute. Après un temps de repos de 24 heures, le mélange est filtré. Ensuite, 10 millilitres de solution aqueuse de KOH à 10 % (v/v) sont ajoutés au mélange précédent. La présence d'anthraquinones est confirmée par un changement de couleur vers le rouge (**Dohou et al., 2003**).

✓ **Mise en évidence des anthracéniques (les anthraquinones libres)**

Une quantité de 0,5 g de poudre de plante est déposé dans un tube à essai et mélangée avec 5 ml de chloroforme. Après une agitation manuelle de 5 minutes, le mélange est filtré. 5 ml d'une solution d'ammoniaque à 10 % (v/v) sont ajoutés au filtrat. La présence d'anthracéniques est confirmée par un changement de couleur de la phase aqueuse vers le rose vif (**Raja et al., 2012**).

✓ **Mise en évidence des anthraquinones combinées**

**O-Hétéroside**

Porté à l'ébullition 1 g de poudre d'échantillon dans 2 ml d'acide chlorhydrique à 10% pendant 5 minutes. Après filtration et refroidissement, 5 ml de chloroforme sont ajoutés au mélange, la couche chloroformique est transférée dans un tube à essai sec et 5 ml de solution d'ammoniaque à 10 % (v/v) sont ajoutés. Après agitation et séparation du mélange en deux phases, l'apparition d'une couleur rose dans la phase organique indique la présence d'anthraquinones combinées O-hétérosides (**Raja et al., 2012**).

### C-Hétéroside

Les C-Hétérosides sont identifiés en ajoutant 10 ml d'eau distillée et 1 ml de solution de trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 10 % à la phase aqueuse obtenue précédemment lors du test des O-Hétérosides. Le mélange est chauffé pendant 30 minutes au bain-marie, puis refroidi sous un courant d'eau. Ensuite, la phase organique est séparée après agitation avec 5 ml de chloroforme et 1 ml de solution ammoniacale ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des C-Hétérosides (**Badiaga, 2011**).

- **Mise en évidence des alcaloïdes**

5g de poudre sont macérés dans 20 ml d'eau distillée pendant 24 heures, suivis d'une filtration. Ensuite, quelques gouttes de réactif Dragendorff sont ajoutées au filtrat. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des alcaloïdes.

- **Mise en évidence des terpénoïdes**

1g de poudre végétale a été mélangé avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La présence de terpénoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur brune rougeâtre (**Edeoga et al., 2005 ; Amin et al., 2012**).

- **Mise en évidence des acides aminés et des protéines**

1g de poudre végétale est dissout dans 2ml d'hydroxyle de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 20% rajouté quelque gouttes de  $\text{CuSO}_4$  à 2%. Une coloration violette avec une teinte rougeâtre indique l'apparition des acides aminés et des protéines.

- **Mise en évidence d'amidon**

2g de poudre végétale ont été mélangés avec quelques gouttes d'iode. La présence d'amidon est confirmée par l'apparition d'une coloration bleu violet.

- **Mise en évidence des glycosides**

2g de poudre végétale ont été mélangés avec 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La formulation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glycosides.

**▪ Mise en évidence des anthocyanes**

2g de poudre végétale ont été introduit dans un Erlen-Mayer contenant 20 ml d'un mélange de propanol/ Acide chlorhydrique (1/1). Le mélange est placé dans un bain marie contenant de l'eau bouillante pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leuco-anthocyanes.

**▪ Mise en évidence des Lipides**

5 g de poudre ont été macérés dans l'éthanol pendant 30 minutes puis filtrés, le filtrat est évaporé sur la plaque chauffante, en ajoutant au résidu graisseux 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Une coloration violette apparaitre, indique la présence des lipides.

**▪ Mise en évidence des composés réducteurs**

Dans un tube à essai, 1 ml de liqueur de Fehling est ajouté à 1 ml d'extrait et puis le mélange est incubé pendant 8 minutes dans un bain marie. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

**▪ Mise en évidence des phénols**

Une goutte d'une solution éthanolique de chlorure ferrique (2%) est ajoutée à 2 ml d'extrait. L'apparition d'une couleur bleue noirâtre ou verte foncée révèle la présence des phénols.

**▪ Mise en évidence des acides organiques**

Dans un tube à essai, 2 ml de Blue de bromothymol est ajouté à 2 ml d'extrait dilué. L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des acides organiques.

**▪ Mise en évidence des stéroïdes**

1g de poudre végétale a été mélangé avec 10 ml d'éthanol pendant 5 min puis filtré. Ensuite, 1 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a été rajouté à 1 ml de filtrat. La formulation d'une coloration rouge indique la présence des stérols insaturés (Senhaji *et al.*, 2005).

## II.4.6. Screening pharmacologique

### II.4.6.1. Elaboration de bain de bouche

#### ➤ Objectif

Afin de valoriser l'extrait obtenu en produit d'intérêt thérapeutique, on a opté pour un bain de bouche. L'extrait éthanolique de l'écorce des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. (Siwak) a été utilisé comme principe actif, doté des propriétés antimicrobiennes, anti-hémolytiques et antioxydantes.

#### ➤ Procédé de fabrication

Dans un bécher, la quantité d'eau osmosée a été mélangée avec la glycérine 10% sous une agitation magnétique. L'éthanol a été additionné en seconde temps avec 2% de l'extrait des écorces de *Juglans regia* L.. Ensuite, 0,3% de benzoate de sodium a été rajouté. A la fin de la préparation, 0,2% de l'arôme de Menthe a été complété pour aromatiser le bain de bouche (**Figure 08**).

**Tableau V: Composition de bain de bouche à base d'extrait des écorces des jeunes rameaux *Juglans regia* L.**

Composition		Quantité
<b>Principe actif</b>	Extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux <i>Juglans regia</i> L.	2%
<b>Excipients</b>	Glycérine	10 %
	Ethanol	15 %
	Benzoate de sodium	0,3 %
	Arôme de Menthe	0,2 %
	L'eau osmosée	72,5 %

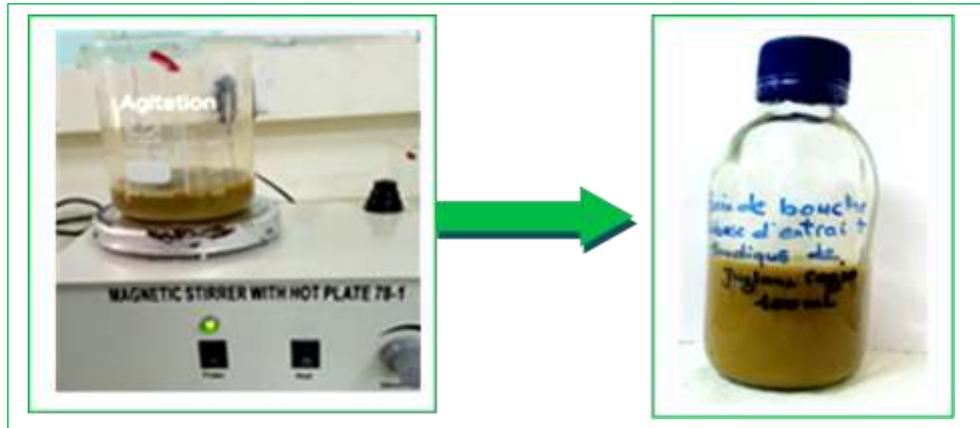


Figure 08 : Formulation bain de bouche (Photos originale, 2024)

➤ **Contrôle physico-chimique**

❑ **Mesure du pH**

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

❑ **Test organoleptique**

Un examen macroscopique de bain de bouche 2% a été réalisé, fondé sur différentes caractéristiques organoleptiques tels que (Aspect -Couleur -Odeur), ont été évalués par des observations visuelles.

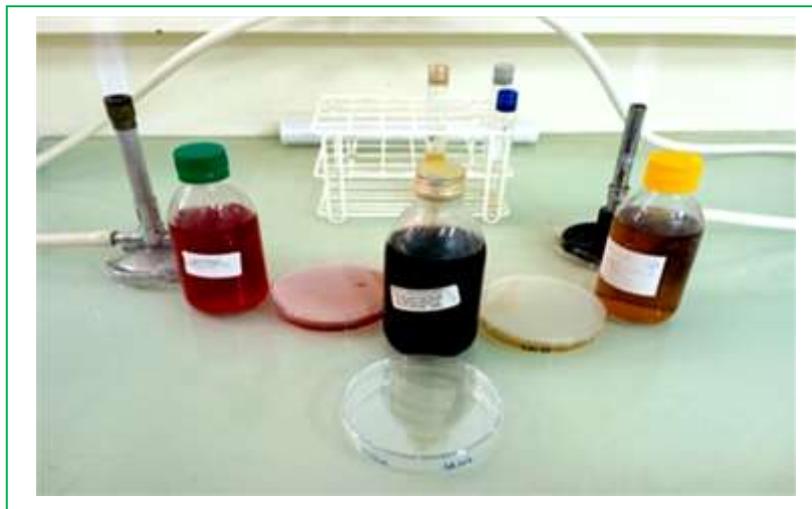
➤ **Contrôle microbiologique**

Le contrôle microbiologique du bain de bouche est une étape cruciale dans l'évaluation de sa qualité et de sa sécurité d'utilisation. Les analyses microbiologiques visent à rechercher les micro-organismes responsables de toute contamination du produit fini. Le protocole suivi pour ces analyses est celui énuméré par la pharmacopée européenne (2012).

La recherche et le dénombrement des germes est effectué en préparant des dilutions au  $1/10^{\text{ème}}$ , mettant en suspension 1g de bain de bouche dans un bouillon TSE. Le mélange a été agité pendant quelques minutes.

- ❑ **Recherche des entérobactéries et germes totaux :** 10 ml du mélange bain de bouche / TSE sont introduites dans la gélose lactose biliée au Crystal violet et au rouge neutre (VRBL) liquéfiée. La solution est ensuite remuée dans le sens circulaire et laissée reposer jusqu'à solidification, puis incubée à 37°C pendant 24 h.

- ❑ **Recherche des moisissures et des levures:** la même procédure précédemment décrite est suivie en utilisant cette fois-ci le milieu gélosé Sabouraud liquéfié, incubée à 37°C pendant 5 jours.
- ❑ **Recherche de *Staphylococcus aureus*:** la même procédure précédemment citée est suivie en utilisant un milieu gélosé Chapman et incubée à 37°C pendant 24h. L'apparition de colonies dorées et la dégradation de la couleur du milieu confirment la présence du *Staphylococcus aureus*.



**Figure 09 : Contrôle microbiologique de bain de bouche (Photo originale, 2024)**

- **Lecture des résultats:** les résultats sont exprimés en colonie formant unité (CFU). Le produit est déclaré conforme si les résultats sont inférieurs aux limites citées par (la pharmacopée européenne, 2012):
  - Germes totaux:  $\leq 200$  UFC/g
  - Entérobactéries :  $\leq 10$  UFC/g
  - Levures et moisissures:  $\leq 20$  UFC/g
  - *Staphylococcus aureus*: absence

#### **II.4.6.2. Etude clinique des malades atteints des infections dentaires**

Cinquante-sept patients (8 - 70 ans) atteints d'infections dentaires (plaques et caries), sont venus en consultation dans le cadre de la prise en charge à la clinique dentaire Ahmed Zabana, Blida. L'ensemble des malades ont bénéficié des prélèvements cliniques superficiels et profonds.

Les critères de sélection des patients détaillés sont figurés en **Annexe 6**.



**Figure 10 : Prélèvements cliniques (caries et plaque dentaires) (Photos originales, 2024)**

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un écouvillon stérile en respectant les règles d'asepsie afin d'éviter les résultats faussement positifs . Il a été ensuite placé dans un tube stérile contenant 2 ml de bouillon nutritif. Les échantillons ont été immédiatement transportés au laboratoire pour les analyses microbiologiques.



**Figure 11 : Prélèvements cliniques (Photo originale, 2024)**

**II.4.6.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

L'activité antibactérienne fait référence à la capacité d'une molécule ou d'un composé présent dans une plante à inhiber la croissance bactérienne, ou à tuer les bactéries à de très faibles concentrations. La sensibilité des bactéries aux agents antibactériens peut se varier en fonction de la souche bactérienne.

l'activité antimicrobienne (anti-cariogène) a été évaluée *in vitro* par trois méthodes : une technique de diffusion radiale par puits d'agar sur milieu solide, une méthode de dilution en milieu solide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), une méthode de tissu en plaque (TCP) et en Eppendorfs pour évaluer le potentiel anti-biofilm.

**❑ Culture et isolement des bactéries**

Les prélèvements ont étéensemencés sur différents milieux de culture (Chapman, Sabouraud, gélose au sang cuit (GSC), en utilisant la technique des quadrants. Tous ces milieux gélosés sont incubés à 37°C en aérobiose, sauf la (GSC) pour la recherche des Streptocoques oraux a été incubée en présence de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24h.

**❑ Identification des bactéries**

Après incubation, les bactéries isolées ont été identifiées au moyen de la coloration de Gram et des tests biochimiques standardisés.

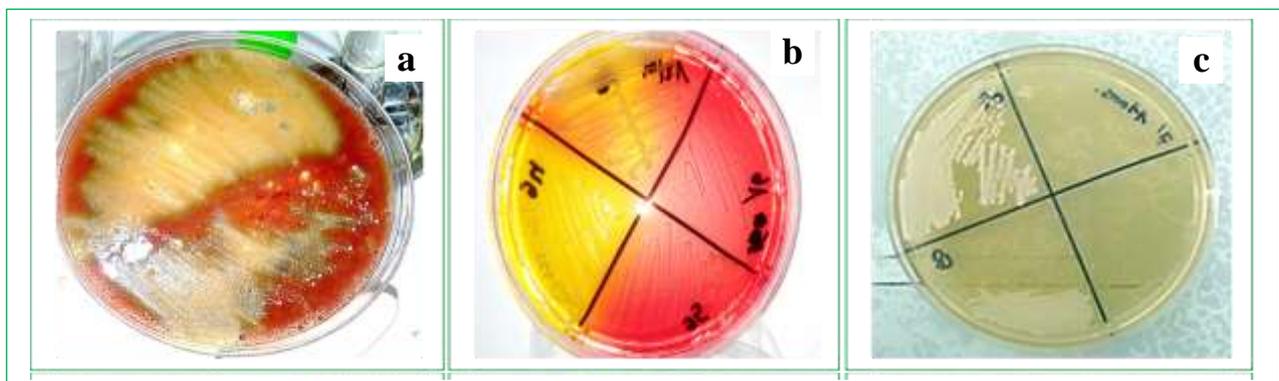
**❑ Examen macroscopique**

L'examen macroscopique consiste à observer les colonies bactériennes présentes dans les boîtes de Pétri à l'œil nu afin de les caractériser :

- Odeur caractéristique des anaérobies.
- Aspect morphologique des colonies.
- Présence de pigmentations.

Tableau VI : Caractérisation des espèces bactériennes isolées

Espèce	Gram	Macroscopie	Microscopie	Caractères biologiques
<i>Streptococcus sp.</i>	Positif	Petites colonies grisâtres, translucides entourées d'une zone d'hémolyse	Cocci en chaînettes  Immobilés	Anaérobie facultatif  Exigeants (GSC / GSF)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	Colonies dorées	Cocci en grappe de raisin  Immobilés	Aéro-anaérobie facultatif
<i>Candida sp.</i>	/	Colonies blanchâtres, crémeuses	Rondes ou ovales isolées ou bourgeonnantes	Anaérobie facultatif

a : *Streptococcus sp* ; b : *Staphylococcus aureus* ; c : *Candida sp*Figure 12 : Isolement des *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus* et *Candida sp*

(Photos originales, 2024)

### ❑ Examen microscopique

a) **Coloration de gram:** Selon Gillet et ses collaborateurs (2009), l'examen au microscope des souches isolées après coloration de Gram, permet de classer les

bactéries en deux groupes (bactérie à Gram positif, bactérie à Gram négatif) selon leur couleur sous a.

**b) Testes biochimiques :** les tests biochimiques utilisés sont:

- Test de catalase.
- Test d'oxydase.
- Test de coagulase.
- Test de filamentation sur sérum (test de blastèse) pour *Candida* (**voir annexe 6**).

La méthode employée pour évaluer la sensibilité des germes responsables des problèmes dentaires repose sur l'aromatogramme, une technique similaire à l'antibiogramme, connue également sous le nom de méthode de Vincent, développée par **Schroeder et Messing** en **1949** et mentionnée par (**Rhayour, 2002**). Définie par la technique de diffusion radiale par puits d'agar sur milieu solide.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet inhibiteur de la croissance des micro-organismes exposés à l'extrait brut de l'écorce des jeunes rameaux de *Juglans regia* L, et au bain de bouche valorisé.

### **A. Méthode de diffusion radiale sur gélose**

#### ➤ **Principe**

Selon la **standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (CLSI, 2020)**, la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide de Muller-Hinton (MH).

#### ➤ **Mode opératoire**

En premier lieu, l'activité antimicrobienne a été réalisée vis-à-vis des souches bactériennes de référence (**ATCC**) et en deuxième lieu, vis-à-vis des souches cliniquement isolées (pathogènes).

#### ❑ **Préparation de l'inoculum**

Les suspensions microbiennes ont été préparées à l'aide d'une anse de platine, 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées. On décharge l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile (0,9 %). L'homogénéisation de la suspension a été effectuée à l'aide d'un vortex, afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à celle de l'étalon

0,5 Mac Farland (DO de 0,08 à 0,10) (**standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999**).

#### ❑ Préparation de solution de référence d'antibiotique

L'antibiotique de référence utilisé est Bi-orogyl (composé de deux antibiotiques Spiramycine et Métronidazole). Un comprimé de (Spiramycine 1,5 M.UI / Métronidazole 250 mg) a été préparé dans 5ml d'eau physiologique pour une concentration égale à 0,16 g/ml.

#### ❑ Aromatogramme/ antibiogramme

Afin d'évaluer le potentiel antimicrobien de l'extrait éthanolique et de 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 Müller Hinton, Müller Hinton additionné au sang cuit et sur gélose Sabouraud. Des trous circulaires de 0.6mm ont été creusés dans la gélose et remplis de 90µl de l'extrait éthanolique, de la solution bain de bouche, ainsi qu'un antibiotique prescrit généralement dans les infections dentaires: Bi-orogyl (Spiramycine+ Métronidazole). Des disques d'antibiotique Amoxicilline (Amx) ont été utilisés comme contrôle positif.

Les boîtes de Pétri ont été incubées en aérobiose, à l'exception les boîtes de MH au sang cuit qui ont été incubées en anaérobiose, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> 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.



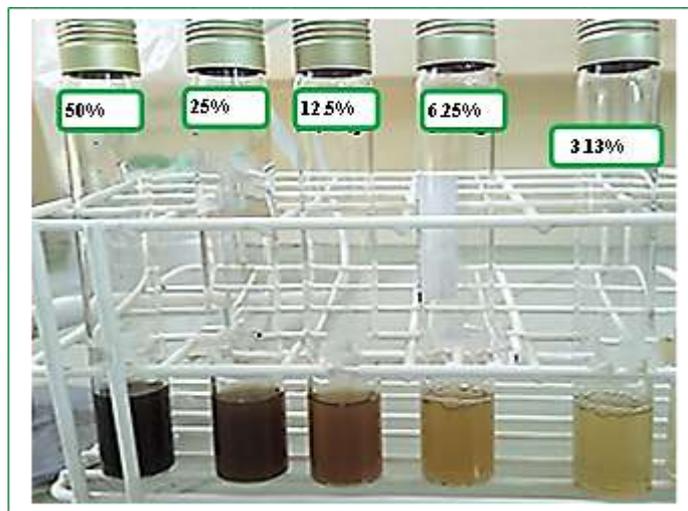
**Figure 13 : Méthode de diffusion radiale par puits (Photo originale, 2024)**

### B. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un extrait végétal capable d'inhiber la croissance visible des bactéries après une incubation de 24 heures. Cette méthode permet de déterminer l'efficacité antibactérienne de l'extrait végétal et de définir la concentration optimale pour une utilisation thérapeutique.

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a été déterminée par ensemencement des contenus de tous les spots après la détermination de la CMI et incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. La plus faible concentration de l'extrait qui n'a laissé survivre aucune bactérie, a correspondu à la CMB (Ganfou *et al.*, 2019).

La préparation des dilutions 1/2 commence par la dilution de 2 ml de bain de bouche avec 2ml de l'eau physiologique, suivie par une série de dilutions successives. Chaque dilution est réalisée en transférant la moitié du volume de la dilution précédente (2 ml) dans un tube contenant le diluant approprié, afin d'obtenir des concentrations décroissantes, jusqu'à la dernière dilution à 3.13%.



**Figure 14 : Série des dilutions au moitié de bain de bouche (Photo originale, 2024)**

Les milieux gélosés (gélose au sang cuit GSC pour les *Streptococcus sp.* gélose nutritif pour les *Staphylococcus aureus* et Sabouraud pour *Candida sp.*) ont été liquéfiés puis coulé dans les boîtes de Pétri en même temps que les dilutions de bain de bouche, 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 été ensemencés, par la technique des spots.

Le pouvoir antibactérien de bain de bouche a été déterminé en effectuant le rapport de la CMB sur la CMI. S'il est supérieur ou égal à 4, l'extrait est bactériostatique, s'il est inférieur à 4, l'extrait est bactéricide.

$CMB/ CMI \leq 4 =$  profil bactéricide

$CMB/ CMI \geq 4 =$  profil bactériostatique

### C. Potentiel anti-biofilm

Dans les infections bucco-dentaires, il est important de connaître si toutes les souches de *Staphylococcus aureus* prélevées cliniquement, ainsi la souche d'*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) sont capables de former un biofilm.

#### ➤ Biofilm

Il représente l'ensemble des cellules microbiennes immobilisées dans une matrice de polymère extracellulaires, agissant comme un système de fonctionnement indépendant et régulé de manière homéostatique (Percival *et al.*, 2011).

#### ➤ Techniques d'étude de biofilm

Une méthode de détection de la production de biofilm *in vitro* a été établie.

#### ➤ Technique de tissu en plaque (TCP)

La méthode consiste à déposer dans chaque puits de la microplaque un volume de 50µl de BHIB additionné à 50µl de saccharose 2 %, afin de favoriser la croissance bactérienne et un volume de 20µl d'une suspension bactérienne à 0,5 MF. Les puits non inoculés sont considérés comme témoins négatifs. 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 (Zameer *et al.*, 2016). 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 des 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 : (+++)

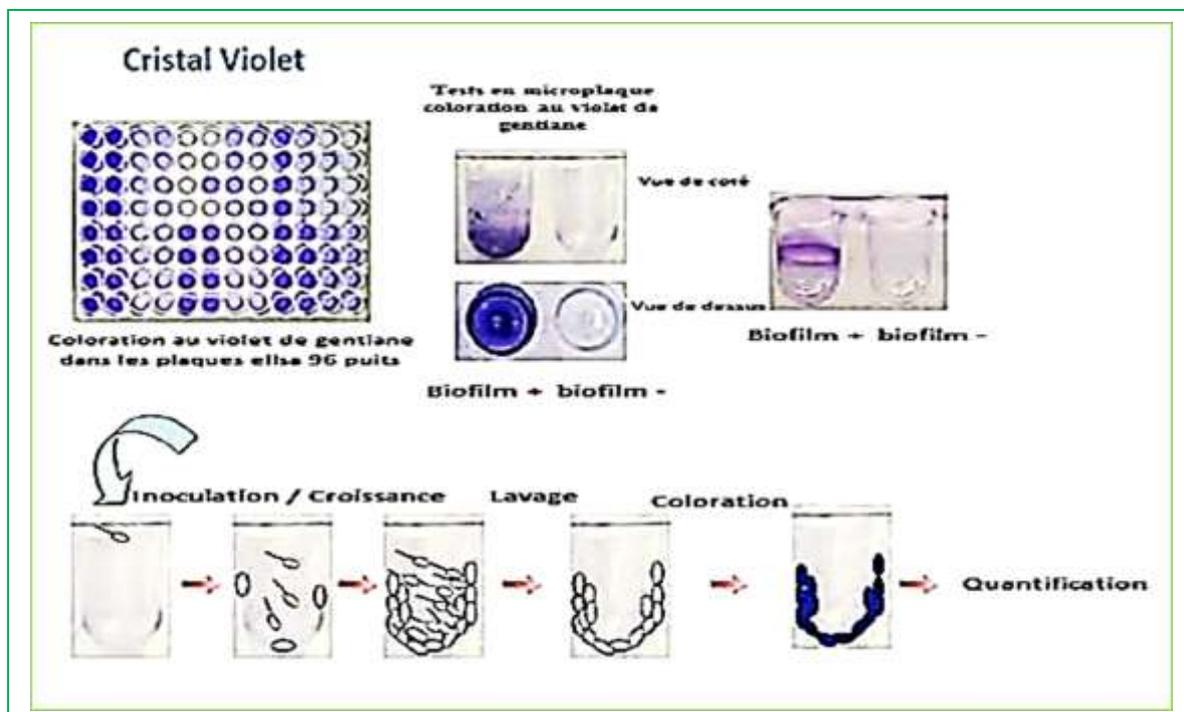


Figure 15: Formation du biofilm en microplaque (la méthode de TCP) (Bellifa, 2014)

### ➤ Évaluation du potentiel anti-biofilm

Après avoir confirmé la capacité des souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 à former un biofilm. Le procédé d'anti-biofilm a été effectué sur une microplaque de 96 puits par deux techniques :

### 1) Évaluation du potentiel anti-biofilm de bain de bouche sur microplaque

La première technique consiste de remplir chaque puit par un volume de 50 µl de milieu de culture BHIB. Préalablement préparée, une concentration de 100 % de bain de bouche a été introduite dans le premier puits, puis un volume de 50 µl du mélange a été reporté d'un puits à un autre, selon une progression géométrique de raison 1/2. Les concentrations finales ainsi obtenues étaient de 100 % jusqu'à 0,049 %. Une suspension bactérienne a été inoculée par la suite et additionnée 20 µl de saccharose 2 %.

Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, le surnageant a été aspiré et les puits ont été lavés. La révélation d'adhérence cellulaire des bactéries fixées a été réalisée par la coloration au Crystal Violet pendant 45 minutes.

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antibiofilm, un antibiotique (Bi-orogyl) a été testé comme témoin positif en parallèle du test antibiofilm vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* sélectionnés et *E.faecalis*.

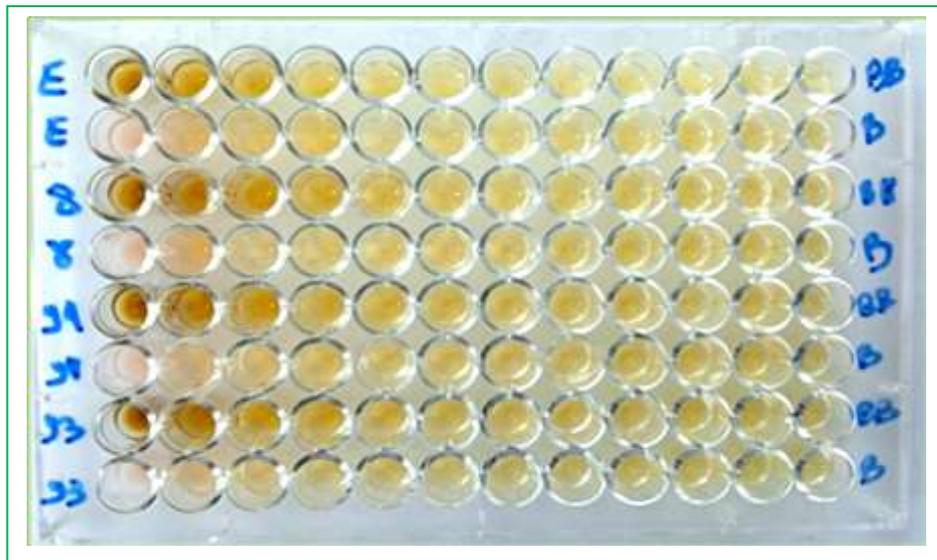


Figure 16 : Technique d'anti-biofilm sur microplaque (Photo originale, 2024)

### 2) Évaluation du potentiel anti-biofilm de bain de bouche sur Eppendorfs

La seconde technique a été effectuée sur des tubes Eppendorf contaminés par des biofilms d'*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et des *Staphylococcus aureus* cliniques.

Le protocole utilisé est celui adopté par **Cheow et al., (2011)**, avec quelques modifications:

- a) Formation des biofilm sur les parois externes des tubes Eppendorfs.
- b) Traitement par le bain de bouche.
- c) Détermination de l'efficacité de potentiel antibiofilm selon la réduction décimale des cellules viables (UFC).

**a) Formation de biofilm**

Les biofilms d'*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et des *Staphylococcus aureus* ont été formés sur le côté externe des tubes Eppendorfs de polypropylène à 1,5 ml. Dans un premier temps, les puits de la microplaque ont été remplis par 150 µl d'une suspension bactérienne à 0,5 MF, puis les Eppendorfs stériles ont été déposés dans les puits et incubés à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, les tubes d'Eppendorfs ont été soigneusement rincés avec du tampon phosphate salin (PBS) dans d'autres puits de la microplaque.

**b) Traitement par la solution bain de bouche**

Une fois les biofilms matures formés sur les parois externes des tubes Eppendorfs, le potentiel antibiofilm *in vitro* a été évalué par remplissage des puits de microplaque par 50µl de BHIB, additionnée à 50 µl de bain de bouche testé, (une solution à base de Bi-origyl utilisée comme témoin positif).

Les tubes Eppendorfs contenant les biofilms matures ont été placés dans les puits de microplaque, en veillant à ce que les biofilms soient immergés dans les solutions du test. Les microplaques ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Les tubes Eppendorf contenant les biofilms ont été soigneusement rincés à l'aide de tampon phosphate salin (PBS) stérile. Ce rinçage permet d'éliminer les résidus des solutions.

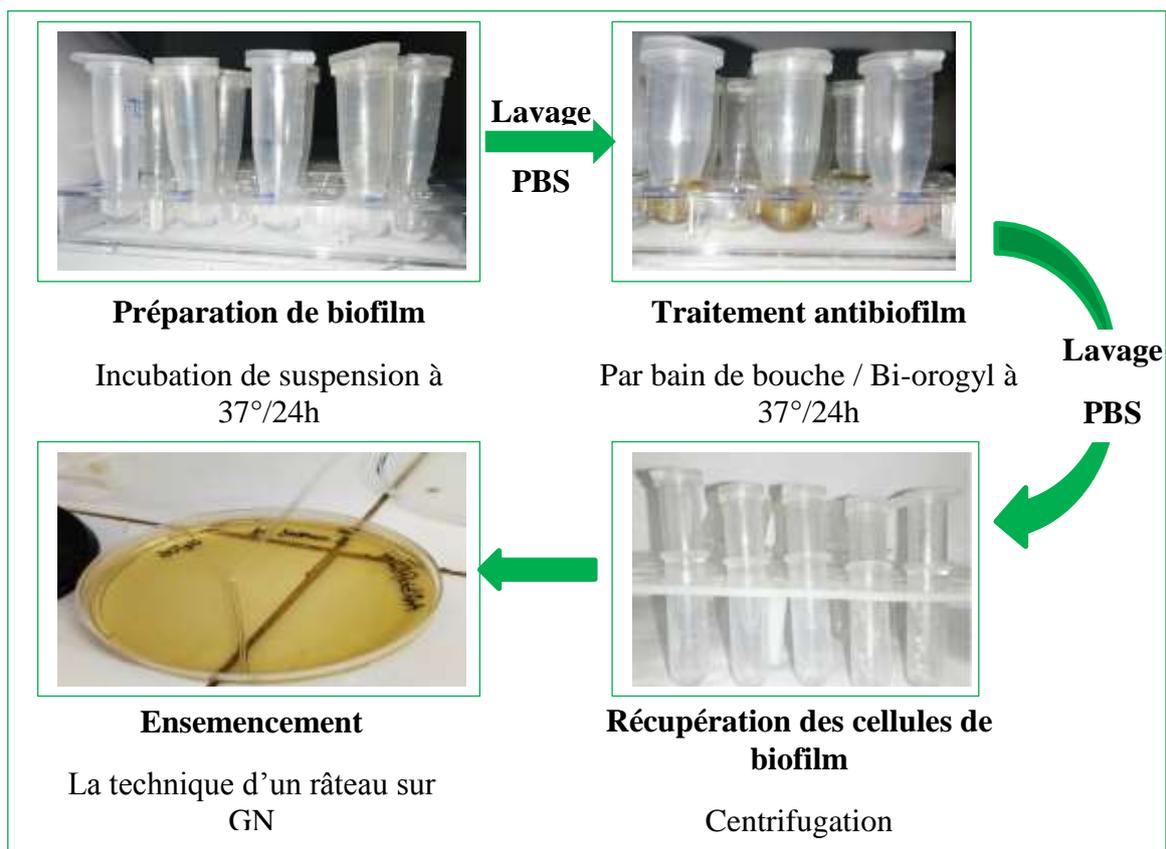
Ensuite, chaque tube Eppendorf a été délicatement placé dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml préalablement rempli de 150µl d'eau physiologique stérile.

Afin de favoriser le contact entre le biofilm et l'eau physiologique, une centrifugation à l'aide d'un vortex a été réalisée. Cette étape permet d'homogénéiser le contenu des tubes Eppendorf et assurer que le biofilm est entièrement récupéré dans l'eau physiologique.

**c) Détermination de l'efficacité du potentiel anti-biofilm**

Au cours de la troisième étape, 50 µl de chaque suspension de biofilm obtenue après centrifugation ont étéensemencées par la technique de râteau sur gélose nutritive. Cette technique permet de répartir uniformément la suspension de biofilm sur la surface de la gélose, favorisant la croissance bactérienne et la formation de colonies individuelles. Les boîtes de Pétri contenant les ensemencements ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures.

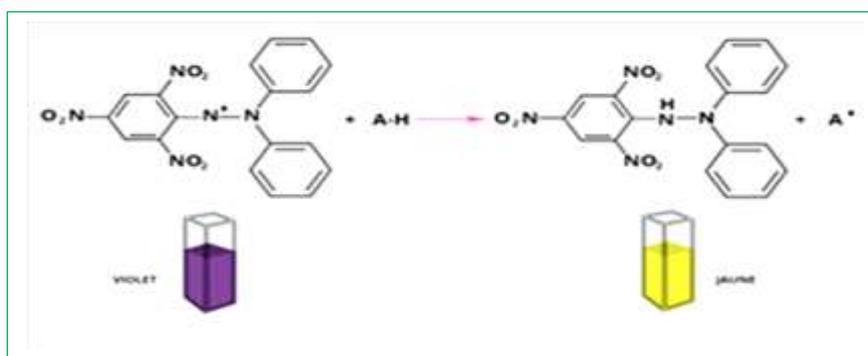
Après incubation, le nombre de colonies bactériennes sur chaque boîte de Pétri a été compté. Ce dénombrement permet d'estimer la concentration bactérienne dans les suspensions de biofilm initiales. La technique de réduction décimale logarithmique (Log UFC/ml) a été utilisée pour exprimer le nombre de colonies bactériennes, permettant une comparaison plus précise des résultats entre les différents échantillons.



**Figure 17 : Méthodologie de test antibiofilm sur Eppendorfs (Photos originales, 2024)**

II.4.7. Activité antioxydante *in vitro*

La méthode de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-hydrazyl) a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait d'écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. Cette méthode est basée sur la réduction du radical DPPH stable, qui possède une couleur violette foncée (**Figure 18**). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons, ce qui représente la capacité de l'extrait à piéger ces radicaux libres (**Sanchez-Moreno, 2002**).



**Figure 18 : Forme libre et réduite de DPPH (Laing et Kitts, 2014)**

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm (**Hazzit et al., 2009**). La solution de DPPH a été préparée en solubilisant 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol absolu. Des dilutions ont été effectuées pour obtenir de différentes concentrations de l'extrait, allant de 10 à 100 µl/ml, ainsi qu'une prise de la solution mère. 25 µl de chaque concentration de l'extrait ont été mélangés avec 975 µl d'une solution DPPH, puis incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 517 nm.

L'inhibition du radical libre DPPH par l'antioxydant de référence : acide ascorbique (vitamine C) et α-tocophérol (vitamine E) a été également analysée. Le contrôle négatif a été préparé en mélangeant 25 µl d'éthanol avec 975 µl de la solution de DPPH.

Le potentiel antioxydant de la vitamine C, de la vitamine E et de l'extrait éthanolique est déterminé en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH (**Sharififar et al., 2010**). Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante:

$$I \% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

**I%:** pourcentage d'inhibition.

**Ac:** absorbance du contrôle.

**At:** absorbance de l'échantillon.

#### ➤ Détermination de la concentration inhibitrice de 50% (IC50)

L'IC50 représente la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH. Les IC50 sont généralement calculées graphiquement, en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait testé. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{l/ml}$ , avec une valeur IC50 plus petite indiquant une activité antioxydante plus élevée de l'extrait testé (Selaimia *et al.*, 2020).

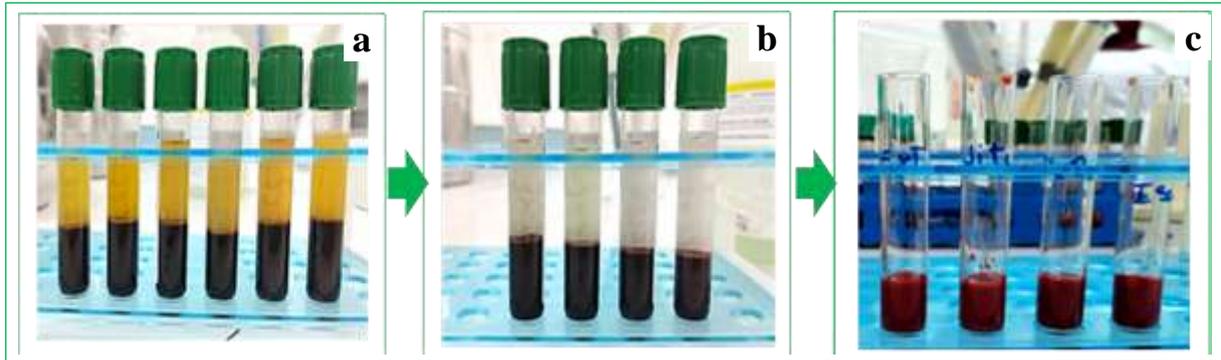
#### II.4.8. Cytotoxicité érythrocytaire *Ex vivo*

Une étude *Ex vivo* a été menée pour évaluer l'effet protecteur de l'extrait d'écorce des jeunes rameaux de *Juglans regia* L., vis-à-vis les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sur la stabilisation de la membrane cytoplasmique des globules rouges humains.

L'effet protecteur de l'extrait a été déterminé selon le protocole décrit par (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010 ; Alinezhad *et al.*, 2012 et Chehtit-Hacid, 2016).

#### ❖ Préparation des érythrocytes

Du sang frais est collecté 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 héparines 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 (Figure 19).



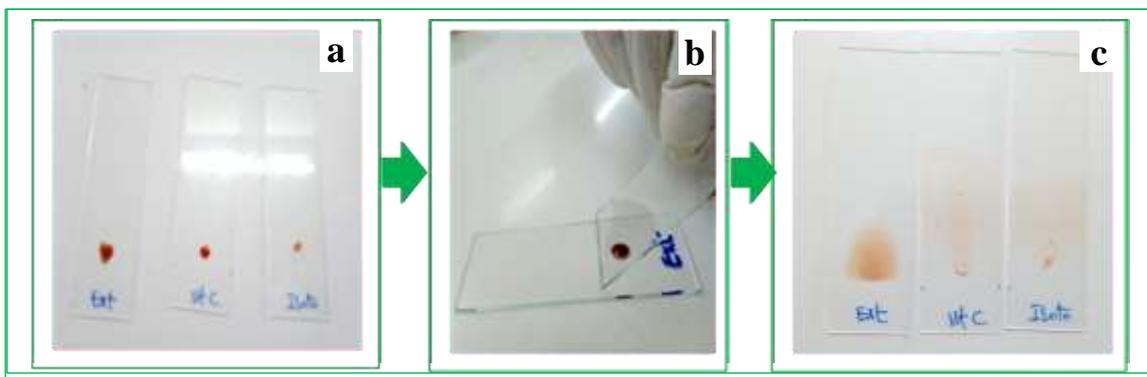
a : sang totale ; b : lavage des érythrocytes ; c : culot érythrocytaire

### Figure 19 : Préparation des érythrocytes humains (Photos originales, 2024)

2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de l'extrait, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37°C.

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 (Annexe 6)



a : dépôt de goutte du sang ; b : lame incliné à 45 ° ; c : frottis sanguin

### Figure 20 : Réalisation des frottis sanguins (Photos originales, 2024)

**❖ Coloration MGG****➤ Premier temps : fixation par May-Grunwald pur**

On verse un certain volume de réactif May-Grunwald, nécessaire pour que les frottis soient entièrement couverts puis laisser réagir 5 à 7 min.

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

On élimine le réactif May-Grunwald dilué puis sans les laver, on passe les lames dans la solution de Giemsa pendant une durée de 20 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 lignée myéloïde (globules rouges) a été effectuée à fort grossissement sous microscope optique (**G×100**).

**II.4.9. Etude statistique**

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'un logiciel statistique Excel version 2007. Cette analyse visait à comparer l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. et le bain de bouche aux produits de références existants, ainsi à comparer l'effet antioxydant de l'extrait aux différents vitamines utilisées dans l'étude comme témoins positifs.

Pour ce faire, le test ANOVA (Analysis of Variance) a été utilisé, en considérant un seuil de signification  $\alpha=0,05\%$ , avec :

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



## *Chapitre III*

### *Résultats et Discussion*



### III.1. Résultats du rendement d'extraction des écorces des jeunes rameaux

Dans le but de l'extraction des composés actifs des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L., le calcul du rendement est crucial pour évaluer l'efficacité du procédé d'extraction. Les résultats du rendement sont présentés dans le **Tableau VII**.

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 et cosmétique vu qu'il est issu de produits naturels.

**Tableau VII : Rendement de l'extrait éthanolique par rapport à la matière végétale**

<i>Juglans regia</i> L.	Masse de matériel végétal (g)	Masse de l'extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
<b>Extraction 01</b>	100 g	12,71 g	12,71 %
<b>Extraction 02</b>	140 g	17.46 g	12,47 %
<b>Moyenne</b>	120 g	15.09 g	<b>12,59 %</b>

D'après les résultats obtenus, le rendement d'extraction est modérément élevé, il est de 12,59 % par rapport au poids initial de la poudre végétale. Des études ultérieures ont rapporté que les plantes ayant des rendements d'extraction élevés contiennent une forte teneur en composés phénoliques (**Peyrat-Maillard et al., 2000**).

En premier lieu, le rendement de l'extrait de *Juglans regia* L. est étroitement dépendant de la méthode d'extraction utilisée, car d'après **Harouak et al., (2021)**, le rendement aqueux des écorces du noyer est estimé à 18.13 % quand l'extraction est faite par infusion, 5.63 % par la méthode de décoction et 11.25 % par la méthode de Soxhlet (technique d'extraction à chaud).

En second lieu, d'après **Almonte-Flores et al., (2015)**, le rendement est très lié au type du solvant d'extraction, il ont pu démontrer que l'extraction aqueuse assure un meilleur rendement par rapport à l'extraction organique vu que le rendement de l'extrait aqueux était égale à 21.40 %, par contre les rendements des extraits organiques ont été plus faibles: 6.76 % pour l'éthanol absolu, 10.54 % pour l'éthanol à 70 % et 1.05 % pour l'acétate-

éthyle. En revanche, nos résultats montrent que le rendement est faible par rapport à l'extrait éthanolique obtenu par **Almonte-Flores** et ses collaborateurs (2015).

Le rendement d'extraction de la présente étude est supérieur à celui obtenu par **Pandita et al., (2011)**, qui ont obtenu par macération aqueuse de la même plante un rendement de l'ordre de 4.02 %. Cette différence est liée à plusieurs facteurs comme, type de solvant, les propriétés génétiques de la plante et son origine géographique, à la période de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées. On peut citer aussi d'autres facteurs tels que : l'âge de la plante, la partie traitée de la plante, l'état du matériel végétal avant l'utilisation (**Abdelmounaim, 2013**).

L'utilisation d'un solvant polaire comme l'éthanol dans cette macération est pertinente pour une récupération efficace des composés actifs de la matière première, tout en préservant leur structure et leurs propriétés (**Ogunmoyole et al., 2011**).

### Description de l'extrait obtenu

L'extrait éthanolique obtenu par macération à froid de la poudre des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. est caractérisé par une couleur vert foncé et présente un aspect visqueux.

Les propriétés organoleptiques de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. sont indiquées dans le **Tableau VIII**.

**Tableau VIII : Aspect, couleur et odeur de l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L.**

	Couleur	Odeur	Aspect
Extrait éthanolique des écorces des jeunes rameaux de <i>Juglans regia</i> L.	Vert foncé	Légère, odeur Végétale	Visqueux

### III.2. Résultats du screening phytochimique des écorces des jeunes rameaux

Les résultats sont classés qualitativement en :

- Réaction fortement positive : ++++
- Réaction positive : +++
- Réaction moyennement positive : ++
- Réaction négative : -

La composition chimique des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. est regroupée dans le tableau suivant :

**Tableau IX : Caractérisation des substances chimiques des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L.**

Métabolites secondaires	Résultat
Coumarine	++
Tanin (catéchique)	+++
Flavonoïdes	++++
Saponines	++++ (4 -5 cm)
Quinones	+++
Anthraquinones	++++
Anthraquinones libre	++++
Anthraquinones combinées (O-hétéroside)	-
Anthraquinones combinées (C-hétéroside)	+
Alcaloïdes	+
Terpénoïdes	++++
Acide aminé et protéine	+
Amidon	+
Glycosides	+++
Anthocynes	++++
Lipides	-
Composé réducteurs	++++
Phénols	+++
Acide organique	+++
Stéroïdes	++++

Les essais phytochimiques effectués sur l'écorce de *Juglans regia* L. ont révélé la présence de plusieurs constituants phytochimiques, avec des estimations très élevées en flavonoïdes , en anthraquinones ,en anthraquinones libres, en terpénoïdes, en saponines, en anthocynes , en composés réducteurs et en stéroïdes, ainsi des concentrations plus ou moins faible ont été montré en alcaloïdes, en coumarines, en anthraquinones combinées (C-hétéroside), en acides aminés et en protéines, et en amidon, avec une absence totale des

anthraquinones combinées (O-hétéroside) et des lipides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Carnat *et al.*, (1993)** ; **Wichtl, (2004)**; **Kale *et al.*, (2009)**; **Upadhyay *et al.*, (2010)**.

Les tests phytochimiques effectués sur l'écorce de *Juglans regia* L. ont permis des estimations élevées en saponines. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans l'étude de (**Raja *et al.*, 2012**) en Inde.

Les écorces de *Juglans regia* L. sont riches en constituants phytochimiques. Cette richesse en composés bioactifs explique l'utilisation des écorces dans la médecine traditionnelle et spécialement dans l'hygiène buccale (**Upadhyay *et al.*, 2010**; **Zakavi, 2013**). L'usage thérapeutique de la partie aérienne est probablement due à la présence des alcaloïdes, des polyphénols, des terpénoïdes, des tanins et des dérivés flavonoïdiques (**Shah *et al.*, 2013**). Ces molécules renferment une très grande diversité de composés, qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (**Huang et Ferraw, 1991** ; **Li *et al.*, 2007**).

**Raja *et al.*, (2012)** ont rapporté que les alcaloïdes, les saponines et les tanins possèdent une importance thérapeutique dans le traitement des pathologies d'origine bactérienne. En outre, les anthraquinones ont un effet laxative et participent dans la régulation de l'hypertension, ainsi comme molécules anti-inflammatoires, antidiabétiques, antidépressives, antihelminthiques, anticancéreuses et hépato-protectrices (**Huang et Ferraw, 1991** ; **Li *et al.*, 2007**).

**Amral *et al.* (2008)** ont confirmé que la présence de 96 % de tanins est considérée comme un principal agent responsable du potentiel médicinal de noyer, ainsi les composés phénoliques et les flavonoïdes.

### III.3. Résultats de l'étude pharmacologique du bain de bouche

#### III.3.1. Etude analytique du bain de bouche

Les caractéristiques organoleptiques de bain de bouche sont portées dans le **Tableau X**.

Tableau X : Caractéristiques organoleptiques et chimiques de bain de bouche

	Aspect	Couleur	Odeur	pH
Bain de bouche	Liquide	Marron	Menthe	6.04

### III.3.2. Contrôle de la qualité microbiologique du bain de bouche

Le bain de bouche formulé a 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 XI : Qualité microbiologique de bain de bouche

Germes recherchés	Bain de bouche (UFC/g)	Normes de la Pharmacopée Européenne (UFC/g) (2012)
Germes aérobies viables totaux	00	$\leq 200$
Levures et moisissures	00	$\leq 20$
Entérobactéries	00	$\leq 10$
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00

Après incubation sur géloses Lactose Biliée au Crystal Violet et au Rouge Neutre (VRBL), Chapman et sur Sabouraud, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été trouvée, de même pour les colonies de la souche *Staphylococcus aureus*.



A : Sabouraud

B : Chapman

C : VRBL

Figure 21 : Qualité microbiologique de bain de bouche (Photos originales, 2024)

### III.3.3. Résultats de l'étude clinique

Les différents résultats analytiques concernant les 57 patients (Homme/femme) atteints des affections dentaires, sont répertoriés sous forme de tableaux récapitulatifs et graphiques pour un meilleur aperçu.

#### ❖ Répartition selon le site de prélèvement

Les prélèvements dentaires ont été effectués sur deux sites différents : les caries profondes et les plaques dentaires. Les résultats montrent que les caries profondes sont les plus représentatifs dans cette étude, avec un pourcentage estimé à 89%.

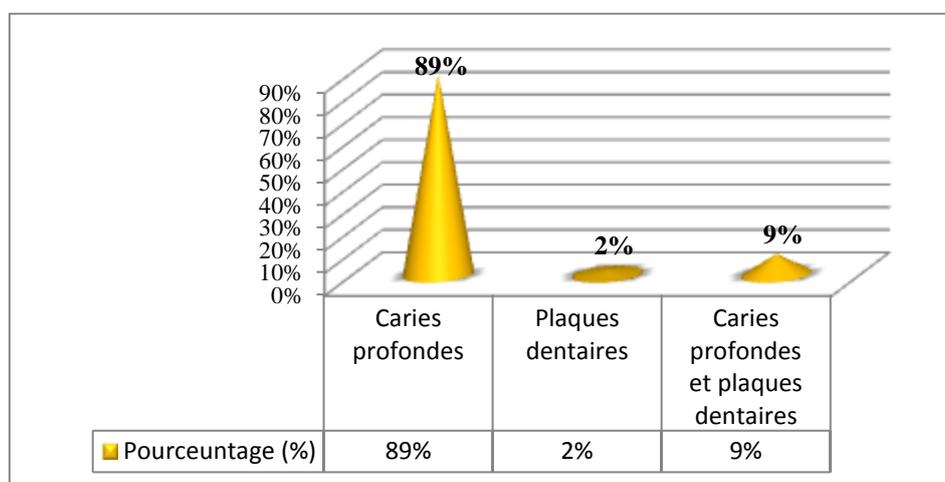


Figure 22 : Répartition selon le site de prélèvement

#### ❖ Répartition selon la fréquence des germes isolés

Sur un total de 50 isolats bactériens, on constate une présence prépondérante du genre *Streptococcus* (72%), suivi par les souches fongiques du genre *Candida* (16%) et *Staphylococcus aureus* (12%).

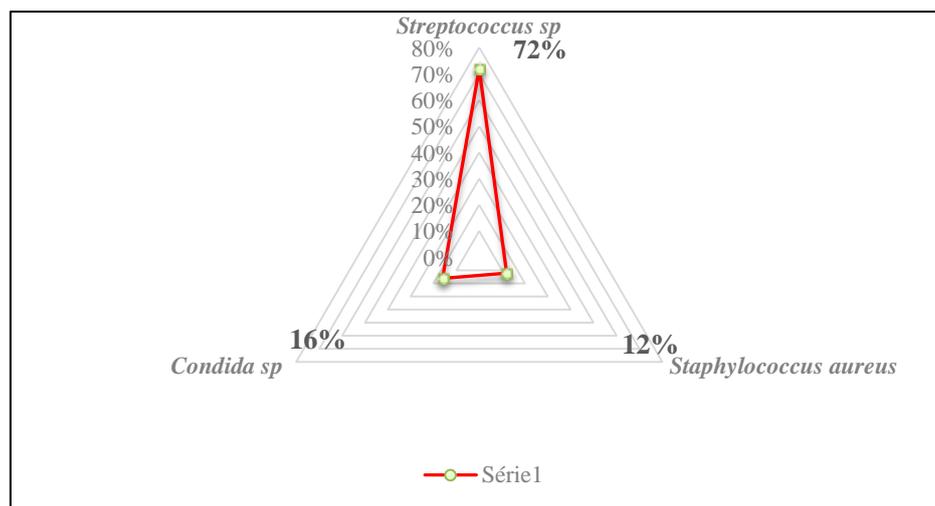


Figure 23: Répartition selon la fréquence des germes isolés

*Streptococcus sp* se présente comme l'agent bactérien le plus retrouvé dans la présente étude des infections bucco-dentaires, avec une fréquence de 72%.

L'ensemble des souches isolées ont été caractérisés en fonction de leurs caractéristiques de coloration de Gram, de leurs caractéristiques morphologiques et de leurs propriétés biochimiques.

Tableau XII : Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées de la cavité buccale

Les souches	<i>Streptococcus sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida sp</i>
Forme	Cocci en chainette (sphère)	Cocci (sphère) grappe de raisin	Ovale (ronde)
Coloration de Gram	+	+	Non déterminé
Oxydase	-	+	Non déterminé
Catalase	-	+	Non déterminé
Coagulase	-	+	Non déterminé
Hémolyse	$\alpha$ -hémolyse	Non déterminé	Non déterminé
Test de filamentation sur sérum (test de blastèse)	Non déterminé	Non déterminé	-

+ : Positive      - : Négative

La cavité buccale humaine contient un nombre considérable d'espèces bactériennes (estimées à plus de 500) (Dewhirst *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que les Streptocoques dominant dans les caries avancées (Munson *et al.*, 2004 ; Aas *et al.*, 2008 ; Chelli-Chentouf *et al.*, 2012). *Streptococcus mutans*, une bactérie anaérobie facultative à Gram positif, est généralement connue comme un agent pathogène majeur de la carie dentaire, elle facilite la destruction de la surface dentaire par la fermentation des glucides en acide lactique (Peters *et al.*, 2012).

En revanche, *Streptococcus salivarius* est un agent étiologique important du microbiote oral. **Kaci et al., (2014)** ont rapporté que *Streptococcus salivarius* colonise la cavité buccale humaine quelques heures après la naissance et y reste sous forme de flore commensale prédominante. De plus, *S. salivarius* est un colonisateur primaire des dents, agissant comme substrat pour la fixation d'autres microbes buccaux (**Nicolas et Lavoie, 2011**).

Par ailleurs, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus courante dans la flore buccale (**Ohara-Nemoto et al., 2008**), parfois isolée du biofilm oral (**Sixou et al., 2007**). Ainsi, *Streptococcus mutans* et *S. salivarius* sont le plus souvent associés aux caries dentaires (**Aas et al., 2008 ; Chava et al., 2012 ; Balto et al., 2017**).

Nos résultats ont révélé la présence d'une souche levuriforme du *Candida* dans la plaque dentaire. Les caractéristiques acidogènes et hétérofermentaires permettent à la souche *Candida sp* de jouer un rôle important dans la progression des caries dentaires (**Rego et al., 2003**). De plus, cette espèce a la capacité de survivre à un pH faible et peut coloniser la cavité buccale en association avec *Streptococcus mutans* ; cette co-agrégation exacerbe le développement des caries (**Peters et al., 2012**).

#### III.3.4. Résultats de l'activité antibactérienne

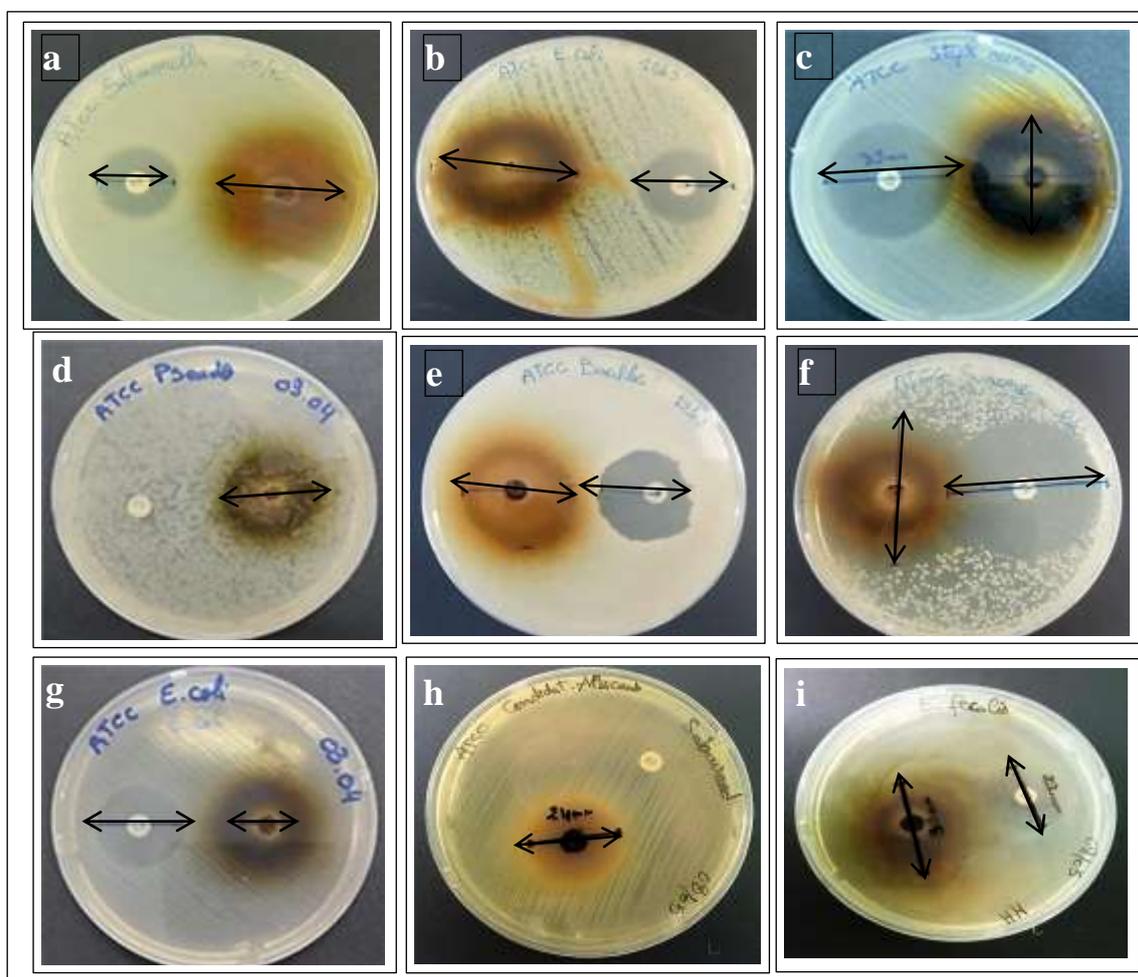
Les estimations de l'activité antimicrobiennes sont basées sur une échelle de mesure établie par **Mutai et al., (2009)**, classées par la capacité antimicrobienne en fonction du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne comme suit :

- Très fortement inhibitrice : (**Diamètre de la zone  $\geq 30$  mm**).
- Fortement inhibitrice : ( **$21 \text{ mm} \leq \text{Diamètre de la zone} \leq 29 \text{ mm}$** ).
- Modérément inhibitrice : ( **$16 \text{ mm} \leq \text{Diamètre de la zone} \leq 20 \text{ mm}$** ).
- Légèrement inhibitrice : ( **$10 \text{ mm} \leq \text{Diamètre de la zone} < 16 \text{ mm}$** ).
- Résistant : (**Diamètre de la zone  $< 10$  mm**).

✚ Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne sur les différents microorganismes (ATCC) vis-à-vis de l'extrait éthanolique sont résumés dans le **Tableau XIII** et la **Figures 27**.

Tableau XIII : Diamètres des zones d'inhibition des souches (ATCC)

Souches ATCC	Extrait brut de <i>Juglans regia</i> L.	Antimicrobien de référence (Aмоxicilline)
	Diamètre (mm)	Diamètre (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	44 ±0.4mm	42±0.1mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	31±0.4mm	32±0.5mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	38±0.2mm	23±0.2mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16±0.1mm	24±0.2mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	35±0.1mm	≤ 6mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	24±0.3mm	≤ 6mm
<i>Salmonella aboney</i> NCTC 6017	29±0.3mm	19±0.1mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	30±0.1mm	22±0.1mm
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	29±0.2mm	15±0.4mm
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	24±0.2mm	≤ 6mm



a : *Salmonella aboney* ; b et g : *Escherichia coli* ; f et c : *Staphylococcus aureus* ; d : *Pseudomonas aeruginosa* ; e : *Bacillus subtilis* ; h : *Candida albicans* ; i : *Enterococcus faecalis*

**Figure 24: Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *J. regia***

(Photos originale, 2024)

Au regard de ces résultats, et selon l'échelle de **Mutai et al., 2009**, l'extrait pure des écorces des jeunes rameaux de noyer présente une excellente activité inhibitrice sur toutes les souches de référence utilisées, avec des diamètres d'inhibition obtenus supérieurs à 10 mm.

Les résultats de cette étude montrent que l'extrait éthanolique brut de *Juglans regia* L. a donné une activité antimicrobienne qui est équivalente ou supérieure en comparaison avec l'antibiotique testé (Amoxicilline).

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique est probablement liée à un effet synergique entre les différents groupements phytochimiques présents, tel que les alcaloïdes, les tannins, les flavonoïdes et les saponines, possédant tous une activité antibactérienne significative (**Sourabie et al., 2010; Bagré et al., 2014; Mamadou et al., 2014 ; Sanogo et al., 2016; Kouadio et al., 2017**). Par ailleurs, l'antibiotique de référence (Amoxicilline) a montré une activité antibactérienne moins importante que celles de l'extrait éthanolique testée, sauf chez *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 et *Escherichia coli* ATCC 25922, il montre une inhibition plus importante que l'extrait éthanolique. Ceci s'explique par le fait que les antibiotiques de références sont des molécules isolées, pures et de concentrations connues (**Sourabie et al., 2010**).

Une autre étude a montré que *J. regia* pourrait être utilisée comme source de composés naturels pour inhiber la croissance de différentes bactéries à Gram négatif (**Sharafati-Chaleshtori et al., 2011**).

Nos résultats diffèrent de ceux de (**Ganfon et al., 2019**), qui indiquent que l'extrait d'acétate d'éthyle possède une activité antibactérienne légère contre *P. aeruginosa* (14 mm). Par ailleurs, (**Noumi et al., 2011**) montrent que l'extrait de noyer contre des isolats cliniques de *P. aeruginosa* a révélé des résultats positifs.

Selon l'étude réalisée par (**Oliveira et al., 2008**), les extraits des coques vertes de noix de *Juglans regia* L. présentaient un potentiel antimicrobien significatif inhibant les bactéries de Gram positif suivant l'ordre : *S. aureus* > *B. cereus* > *B. subtilis*.

Les résultats obtenus par **Emira et al., (2011)** ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle est modérément inhibiteur contre la souche *S. aureus* ATCC 25923, avec un diamètre d'inhibition estimé de 19.66 mm. Cette différence entre la résistance et la sensibilité des *S. aureus* à l'extrait est peut être due soit aux conditions d'extraction soit à l'utilisation d'une variété différente de *J. regia*.

Dans l'ensemble, l'extrait de *J. regia* a une activité antibactérienne plus forte contre les bactéries Gram positifs (29 à 44 mm). L'inhibition la plus élevée a été observée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 avec un diamètre égal à 44 mm par comparaison les bactéries Gram négatifs (16 à 38 mm). **Nostro et al., (2000)**, ont expliqué cette différence par la composition chimique de la paroi cellulaire bactérienne, notamment en présence d'une paroi cellulaire imperméable aux solutés lipophiles chez les bactéries Gram négatifs. Ces bactéries possèdent une couche de lipopolysaccharides (LPS) qui forment une barrière à la diffusion, ce qui rend les bactéries à Gram négatifs moins susceptibles d'être sensibles aux extraits antimicrobiens. En revanche, les bactéries Gram positifs n'ont qu'une couche externe de peptidoglycane, dépourvue d'une forte barrière de perméabilité (**Scherrer et Gerhardt, 1971**).

**Santos et al., (2013)** montrent que les effets antimicrobiens de *J. regia* contre les agents pathogènes proviennent de sa composition chimique. L'écorce de *J. regia* contient des cétones comme la régiolone, la juglone, des composés phénoliques, des flavonoïdes et des stérols. Ainsi, elle est riche en flavonoïdes et naphthoquinones qui sont responsables de l'activité antibactérienne (**Quave et al., 2008**).

En addition, l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. est actif contre la souche fongique *Candida albicans* ATCC 10231, dont le diamètre de la zone d'inhibition est estimé à 24 mm. (**Oliveira et al., 2008**) montrent que l'extrait de *Juglans regia* L. inhibe *in vitro* la majorité des souches fongiques orales, notamment *Candida albicans*. Aussi (**Asma et Yasmine., 2021**) montrent que l'extrait à l'éther de pétrole de *Juglans regia* L. est légèrement inhibiteur contre les souches fongiques, dont le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 et 13 mm. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par **Pandita et al., (2011)**, qui montrent une sensibilité de la souche *Candida albicans* vis-à-vis les extraits de *Juglans regia* L., avec des valeurs plus ou moins proches aux nôtres. Le pouvoir de *J. regia* contre les souches fongique du genre *Candida* peut être utilisé dans le traitement des candidoses buccales.

Aussi, nos résultats corroborent à l'étude de **Noumi et al., (2010)** menée en Tunisie, qui ont montré 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±0.57 mm, 15,66±1.15mm, 11,66±0.57mm et 18,33±0.57mm pour *Candida sp* ATCC 90028 et *Candida sp* ATCC 2091 respectivement.

### Résultats de l'activité anticariogène du bain de bouche

Les résultats obtenus de l'activité anticariogène sur les différents microorganismes pathogènes isolés cliniquement vis-à-vis du bain de bouche, sont résumés dans le tableau et les figures suivants.

Après 24h d'incubation à 37°C et au présence d'une source de CO<sub>2</sub>, les diamètres des zones d'inhibition sont observés autour de bain de bouche formulé à base d'un extrait éthanolique de *Juglans regia* L., en comparaison avec deux antibiotiques de références : Amoxicilline et Bi-orogyl (Spiramycine + Métronidazole).

**Tableau XIV : Diamètre des zones d'inhibition des germes oraux**

Souches cliniques	Bain de bouche		Antibiotique de référence (Bi-orogyl)		Antimicrobienne de référence (Amoxicilline)	
	Diamètres (mm)	Interprétation	Diamètres (mm)	Interprétation	Diamètres (mm)	Interprétation
<i>Streptococcus sp 01</i>	17.5±0.1mm	Mi	46±0.1mm	S	22±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 02</i>	04±0.2mm	Ni	20±0.1mm	S	0	R
<i>Streptococcus sp 03</i>	11.5±0.3mm	Li	40±0.3mm	S	22±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 04</i>	11±0.1mm	Li	40±0.1mm	S	30±0.1mm	S
<i>Streptococcus sp 05</i>	08.5±0.1mm	Ni	20±0.2mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 06</i>	16.5±0.5mm	Mi	30±0.1mm	S	12±0.2mm	R
<i>Streptococcus sp 07</i>	21.5±0.2mm	Fi	40±0.1mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 08</i>	39±0.4mm	Tfi	40±0.2mm	S	20±0.2mm	R
<i>Streptococcus sp 09</i>	14±0.4mm	Li	24±0.5mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 10</i>	12.5±0.2mm	Li	20±0.5mm	S	15±0.3mm	R
<i>Streptococcus sp 11</i>	11.5±0.1mm	Li	46±0.3mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 12</i>	08.5±0.1mm	Ni	29±0.2mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 13</i>	10.5±0.1mm	Li	40±0.2mm	S	25±0.3mm	S
<i>Streptococcus sp 14</i>	18±0.1mm	Mi	15±0.1mm	S	24±0.2mm	S
<i>Streptococcus sp 15</i>	19.5±0.3mm	Mi	20±0.2mm	S	20±0.2mm	R
<i>Streptococcus sp 16</i>	24±0.2mm	Fi	22±0.2mm	S	09±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 17</i>	08.5±0.3mm	Ni	10±0.2mm	S	30±0.2mm	S
<i>Streptococcus sp 18</i>	21.5±0.2mm	Fi	20±0.1mm	S	35±0.1mm	S
<i>Streptococcus sp 19</i>	13.5±0.1mm	Li	40±0.2mm	S	14±0.2mm	R
<i>Streptococcus sp 20</i>	22.5±0.1mm	Fi	16±0.1mm	S	45±0.1mm	S
<i>Streptococcus sp 21</i>	13±0.1mm	Li	40±0.2mm	S	12±0.2mm	R
<i>Streptococcus sp 22</i>	23±0.2mm	Fi	15±0.1mm	S	40±0.1mm	S
<i>Streptococcus sp 23</i>	20±0.2mm	Mi	30±0.1mm	S	14±0.2mm	R

<i>Streptococcus sp 24</i>	20.5±0.2mm	Mi	35±0.1mm	S	12±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 25</i>	04±0.2mm	Ni	25±0.2mm	S	00	R
<i>Streptococcus sp 26</i>	17.5±0.1mm	Mi	45±0.2mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 27</i>	12±0.1mm	Li	45±0.2mm	S	30±0.1mm	S
<i>Streptococcus sp 28</i>	15±0.3mm	Li	30±0.1mm	S	14±0.3mm	R
<i>Streptococcus sp 29</i>	10.5±0.1mm	Li	30±0.3mm	S	12±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 30</i>	13.5±0.3mm	Li	19±0.1mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 31</i>	09±0.2mm	Ni	35±0.1mm	S	17±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 32</i>	12±0.1mm	Li	35±0.3mm	S	0	R
<i>Streptococcus sp 33</i>	14±0.2mm	Li	32±0.4mm	S	0	R
<i>Streptococcus sp 34</i>	09±0.1mm	Ni	43±0.4mm	S	20±0.1mm	R
<i>Streptococcus sp 35</i>	17±0.4mm	Mi	15±0.4mm	S	/	/
<i>Streptococcus sp 36</i>	09±0.1mm	Ni	35±0.2mm	S	/	/
<i>Staphylococcus aureus 01</i>	08.5±0.1mm	Ni	09±0.2mm	R	00	R
<i>Staphylococcus aureus 02</i>	07±0.4mm	Ni	40±0.1mm	S	12±0.1mm	R
<i>Staphylococcus aureus 03</i>	09±0.1mm	Ni	31±0.3mm	S	/	/
<i>Staphylococcus aureus 04</i>	12±0.5mm	Li	15±0.1mm	S	/	/
<i>Staphylococcus aureus 05</i>	15.5±0.2mm	Li	19±0.3mm	S	00	R
<i>Staphylococcus aureus 06</i>	12±0.2mm	Li	13±0.1mm	S	/	/
<i>Candida sp 01</i>	00	Ni	00	/	/	/
<i>Candida sp 02</i>	08.5±0.2mm	Ni	00	/	/	/
<i>Candida sp 03</i>	04.5±0.1mm	Ni	00	/	/	/
<i>Candida sp 04</i>	08±0.1mm	Ni	00	/	/	/
<i>Candida sp 05</i>	12.5±0.1mm	Li	00	/	/	/
<i>Candida sp 06</i>	14±0.2mm	Li	00	/	/	/
<i>Candida sp 07</i>	09±0.1mm	Ni	00	/	/	/
<i>Candida sp 08</i>	00	Ni	00	/	/	/

**Tfi** : très fortement inhibitrice **Fi** : fortement inhibitrice **Mi** : modérément inhibitrice **Li** : légèrement inhibitrice **Ni** : non inhibitrice / : non déterminé ; **R** : résistante ; **S** : sensible

D’après les résultats obtenus, le bain de bouche présente un effet inhibiteur vis-à-vis de 40 germes pathogènes de la cavité buccale, entre les *Streptocoques*, les *Staphylocoques* et les *Candida*, avec des zones d’inhibition qui varient entre 10.5 mm et 39 mm.

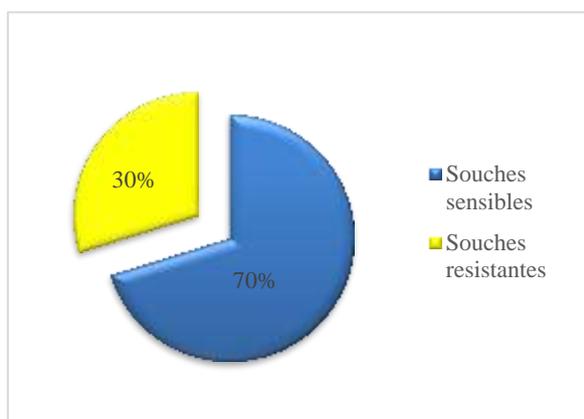


Figure 25: Répartition selon la sensibilité des souches

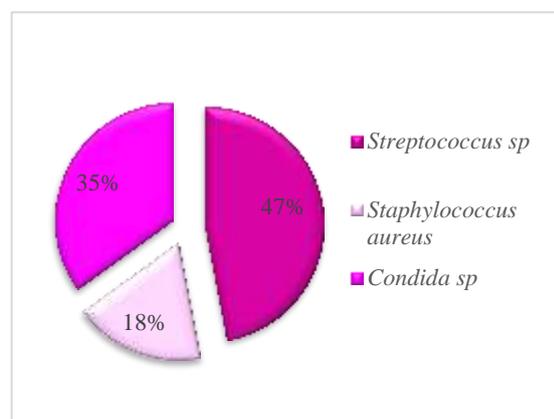
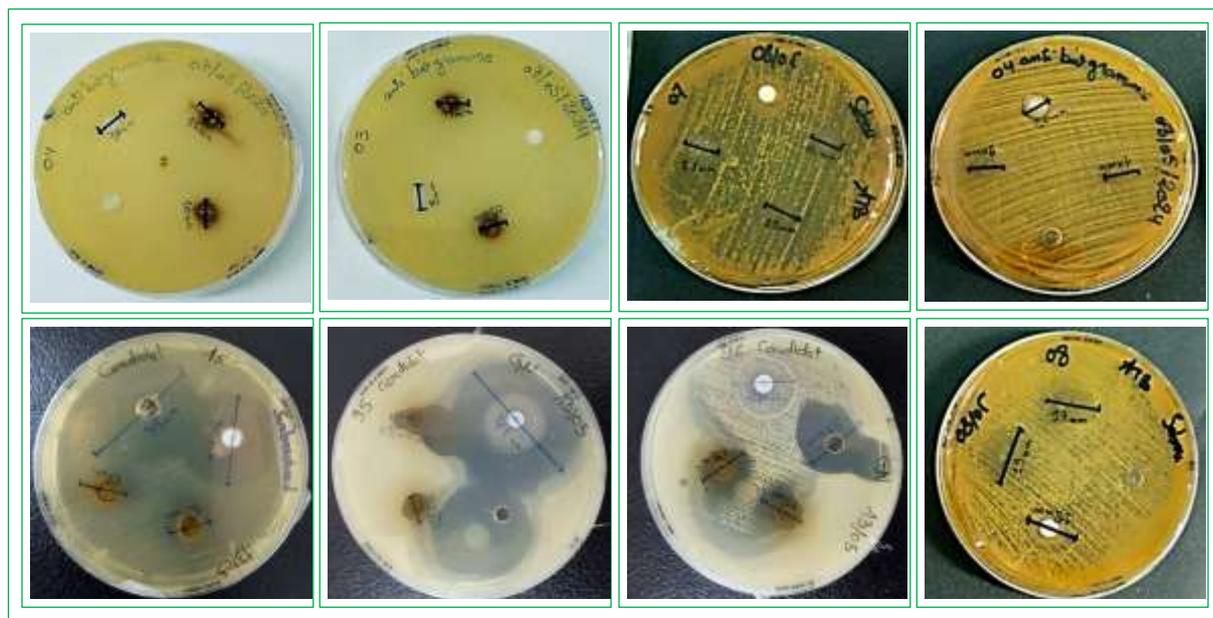


Figure 26: Répartition selon la fréquence des germes résistants





**Figure 29 : Sensibilité des souches de *Candida sp* (Photos originales, 2024)**

Une efficacité très importante de bain de bouche à base de l'extrait éthanolique a été démontrée contre les germes buccaux, avec un diamètre des zones d'inhibition compris entre 10.5mm et 39mm. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par **Rahul, (2011)**, qui ont trouvé que la concentration de 250µg/disque d'extrait peut inhiber la croissance de la plus part des échantillons de la salive.

Une autre étude effectuée en Arabie Saoudite par **Abhary et Al-Hazmi (2016)**, indique que la plante *Salvadora persica* L., également connu sous le nom de miswak a été utilisée par de nombreuses communautés islamiques comme bâtons à mâcher. L'extrait éthanolique de cette plante présente un pouvoir antibactérien important contre les microorganismes à Gram positif « *Streptococcus mutans* », ce qui suggère qu'il existe probablement des agents antimicrobiens sélectifs chez *S. persica*.

Nos résultats se rapprochent à une enquête antérieure réalisée par **Sytykiewicz et al., (2015)**, montrant une réduction significative du taux de portage de *Candida albicans* après l'utilisation du bain de bouche *Juglans regia* L.

D'après nos résultats, on peut dire que l'activité antifongique de notre produit (bain de bouche) est étroitement reliée à la richesse de la plante en métabolites secondaires bioactifs, qui ont été mis en évidence lors du criblage phytochimique, caractérisant des molécules naturelles responsables de cette activité anticandidosique.

D'après ces résultats, on peut conclure que l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L. a une forte activité antimicrobienne contre les germes oraux testés et peut être utilisé comme mesure préventive et thérapeutique en dentisterie.

### III.3.5. Résultats de la concentration minimal inhibitrice, bactéricide et fongicide (CMI /CMB/CMF)

Les résultats des paramètres antibactériens, des paramètres antifongiques (CMI et CMF) et la détermination du pouvoir antibactérien et antifongique de bain de bouche d'écorce de *Juglans regia* L. sont consignés dans le **Tableau XV**.

**Tableau XV : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et profil bactéricide/ bactériostatique, profil fongicide/ fongistatique**

Bain de bouche de <i>Juglans regia</i> L.			
Souches cliniques	CMI	CMB	Interprétation
<i>Streptococcus sp 02</i>	Résistant	/	/
<i>Streptococcus sp 05</i>	Résistant	/	/
<i>Streptococcus sp12</i>	100%	Résistant	/
<i>Streptococcus sp 17</i>	50%	50%	Profil bactéricide
<i>Streptococcus sp 25</i>	Résistant	/	/
<i>Streptococcus sp 31</i>	50%	100%	Profil bactéricide
<i>Streptococcus sp 34</i>	100%	100%	Profil bactéricide
<i>Streptococcus sp 36</i>	100%	100%	Profil bactéricide
<i>Staphylococcus aureus 01</i>	Résistant	/	/
<i>Staphylococcus aureus 02</i>	12.5%	100%	Profil bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus 03</i>	6.25%	50%	Profil bactériostatique
Souches cliniques	CMI	CMF	Interprétation
<i>Candida sp 01</i>	25%	Résistant	/
<i>Candida sp 02</i>	25%	100%	Profil fongicide / fongistatique
<i>Candida sp 03</i>	25%	25%	Profil fongicide
<i>Candida sp 04</i>	25%	25%	Profil fongicide
<i>Candida sp 07</i>	50%	50%	Profil fongicide
<i>Candida sp 08</i>	100%	/	/

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour le bain de bouche sont comprises entre 6,25 ml/ml et 100 ml/ml. Tandis que, les CMB sont comprises entre 25 ml/ml et 100 ml/ml.

D'une manière spécifique, on note que l'extrait éthanolique incorporé dans le bain de bouche montre une action bactéricide contre quatre souches de *Streptococcus sp*, et fongicide contre quatre souches de *Candida sp*. En revanche, l'activité de cet extrait est de type bactériostatique contre deux souches de *Staphylococcus aureus*. Ces résultats diffèrent de

ceux menés par l'étude de (Gafnon *et al.*, 2019), qui ont trouvé que l'extrait de *J. regia* présente un pouvoir bactéricide contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 . Cette différence est probablement due à la souche qui présente un profil de pathogénicité dans notre étude. C'est pour cette raison cette dernière a marqué une action bactériostatique.

Dans l'étude d'Oliveira *et al.*, (2008), *S.aureus* se présente comme le micro-organisme le plus sensible, avec une CMI égal à 0,1 mg/ml.

Parmi les hypothèses avancées concernant le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols, on peut citer, l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens; la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux, tels que, le fer et enfin l'inhibition de métabolisme microbien (Milane, 2004).

Dans la littérature, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens *in vitro* en inhibant l'ADN gyrase (Ohemeng *et al.*, 1993). En outre, l'étude menée par (Sato *et al.*, 1995) a montré l'effet bactéricide des flavonoïdes sur *S.aureus*.

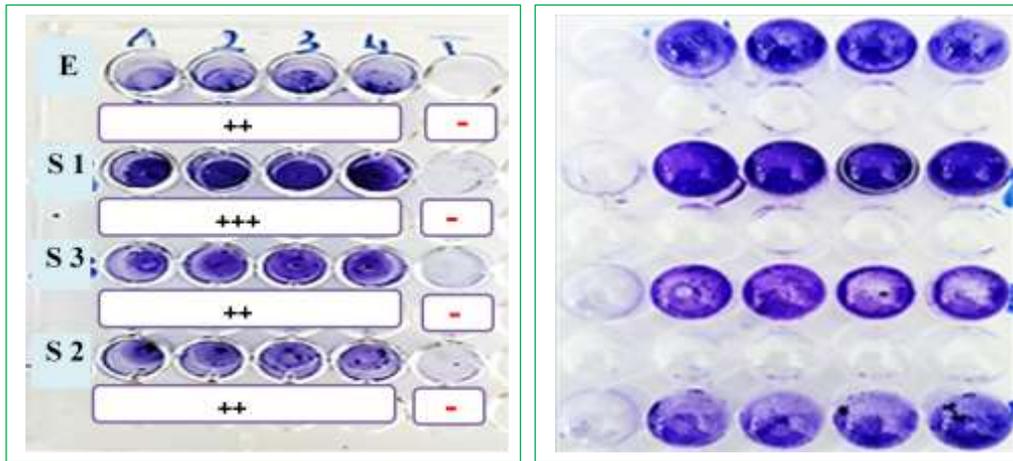
### III.3.6. Résultats de l'activité de l'antibiofilm

#### III.3.6.1. Résultats de la formation de biofilm par la technique de TCP

Il est important de connaître si les souches d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* prélevées sont capables de former des biofilms. Ces dernières ont été mises à un test de biofilm sur microplaque à 96 puits par la technique de culture tissulaire (TCP).

Selon (Bellifa *et al.*, 2013), la méthode TCP est la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm *in vitro*. Cette méthode permet de tester plusieurs souches simultanément, ainsi de déterminer leur capacité d'adhésion.

Les résultats obtenus par la méthode de culture tissulaire (TCP), montrent que *S. aureus* n°1 est fortement productrice de biofilm, avec un profil d'adhésion extrême (+++), en comparaison avec les autres souches qui présentent un profil d'adhésion moyenne (++) .



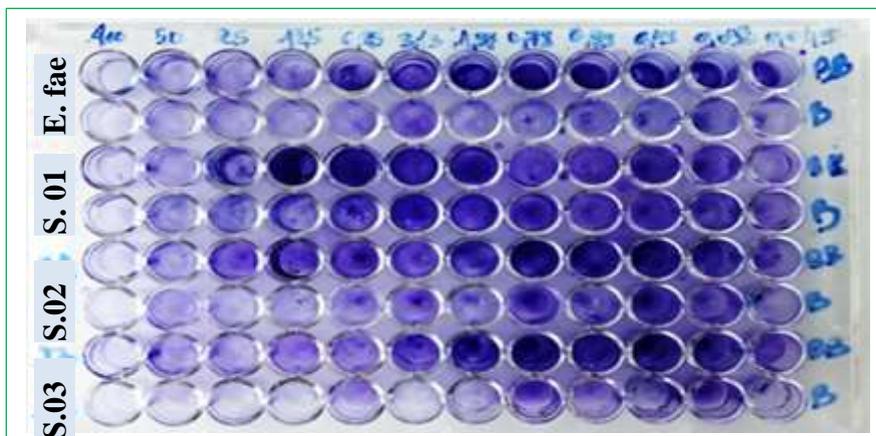
**Figure 30 : Production de biofilm par *E. faecalis* et *Staphylococcus aureus* révélée par la technique de tissu en plaque TCP (Photos originales ,2024)**

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

**III.3.6.2. Résultat de l'activité antibiofilm sur milieu liquide**

Après avoir confirmé que les souches bactériennes d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et les souches de *Staphylococcus aureus* sont productrices de biofilm, la technique de l'antibiofilm a été réalisée comme suit :

Cette étape consiste à évaluer l'activité l'anti-biofilm à différentes concentrations de bain de bouche. Les résultats attendus sont visualisés sur une microplaque de 96 puits après coloration au cristal violet. L'efficacité du traitement a été déterminée selon l'intensité de coloration cristal violet. Les résultats de cette expérience *in vitro* sont illustrés par la **Figure34**.



**Figure 31 : Réduction de biofilm d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et de *Staphylococcus aureus* (Photo originale, 2024)**

D'après les résultats obtenus du test antibiofilm, on peut témoigner que toutes les souches microbiennes soumises à l'essai biologique antibiofilm *in vitro*, sont très sensibles au traitement de bain de bouche testé. On remarque une diminution progressive des biofilms formés en fonction de l'augmentation de la concentration de bain de bouche.

Une concentration à 50 % s'est avérée suffisante pour empêcher la formation de biofilm chez les trois souches de *Staphylococcus aureus*, et éliminer efficacement toute trace de biofilm *in vitro*. La souche *Enterococcus faecalis* ATCC29212 a manifesté un degré de sensibilité antiadhésive importante 12.5 %, en comparaison avec la totalité des souches. En revanche, la totalité des souches ont montré un profil de sensibilité vis-à-vis de l'antibiotique de référence (Bi-orogyl). Ces résultats se rapprochent à ceux menés par **Chaieb et al., (2013)** en Tunisie, sur l'effet antibiofilm de l'extrait d'écorces de *Juglans regia* L. vis-à-vis du biofilm de *S.aureus* ATCC25923, qui ont déterminé une CMIB égale à 43 µg / ml.

Les résultats de **Quave et al., (2008)** montrent que le pouvoir inhibiteur des écorces du noyer fonctionne d'une manière dose-dépendante.

Par ailleurs, **Milek et al., (2022)** ont démontré que les extraits des feuilles et des fruits de *Juglans regia* L. issus de cinq clones différents, présentent une activité antibiofilm d'environ 95 % vis-à-vis des staphylocoques, et peuvent servir comme des agents antimicrobiens précieux contre les infections liées aux *Staphylococcus*.

De plus, nos résultats complètent les travaux de **Dolatabadi et al., (2018)**, qui ont mis en évidence d'activité anti-biofilm plus importante de l'extrait aqueux des feuilles de *Juglans regia* L. par rapport à l'extrait méthanolique.

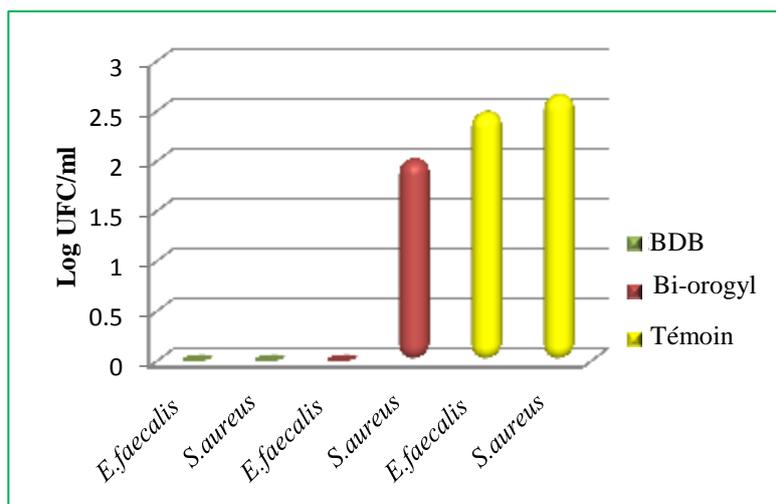
En outre, **Khalid et al., (2020)** ont rapporté un potentiel anti-biofilm plus élevé pour l'extrait méthanolique d'écorces de racines de *Juglans regia* L., contre six souches bactériennes testées : *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *H. influenza*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*.

Selon (**Ghosh et al., 2020**), les composés organiques présentent dans les extraits des plantes peuvent modifier les caractéristiques de la surface (hydrophobicité, caractère hydrophile et rugosité,...) , empêchant ainsi l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm.

Ces résultats suggèrent que l'extrait de *Juglans regia* L. pourrait être une alternative prometteuse aux antibiotiques conventionnels pour lutter contre les infections bactériennes biofilmiques, en particulier celles causées par des bactéries Gram-positives.

### III.3.6.3. Résultat de l'activité antibiofilm sur milieu solide (Eppendorfs)

L'efficacité du bain de bouche a été déterminée selon la réduction décimale des cellules viables (UFC) d' *Enterococcus faecalis* ATCC et de *Staphylococcus aureus* récupérées à partir des biofilms. Les résultats de cette expérience *in vitro* sont illustrés par la Figure 35.



**Figure 32 : Réduction du Log UFC d'*Enterococcus faecalis* ATCC29212 et *Staphylococcus aureus* par le bain de bouche**

D'après les résultats obtenus, on constate que le bain de bouche à base de Siwak de *Juglans regia* L. a totalement réduit le nombre du Log UFC d'*Eenterococcus faecalis* ATCC 29212 et de *Staphylococcus aureus*, par rapport au témoin positif (>105 UFC/ml). Il convient de signaler, que la solution de Bi-orogyl n'a pas pu éradiquer les cellules de *Staphylococcus aureus* cliniquement isolée. Cela est due certainement à la résistance de cette souche.

### III.4. Résultats de l'activité antioxydante

Le dosage au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est l'un des méthodes largement utilisés (Amin et Musa, 2016).cette dernière est choisie en raison de sa simplicité, sa rapidité, sa sensibilité et sa reproductibilité (Boudjelal, 2013). L'activité antioxydante a été évaluée par spectrophotomètre suivant la réduction de radical libre (DPPH), qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517nm. Ce pouvoir réducteur est déterminé par la diminution d'absorbance provoquée par les substances anti-radicalaire

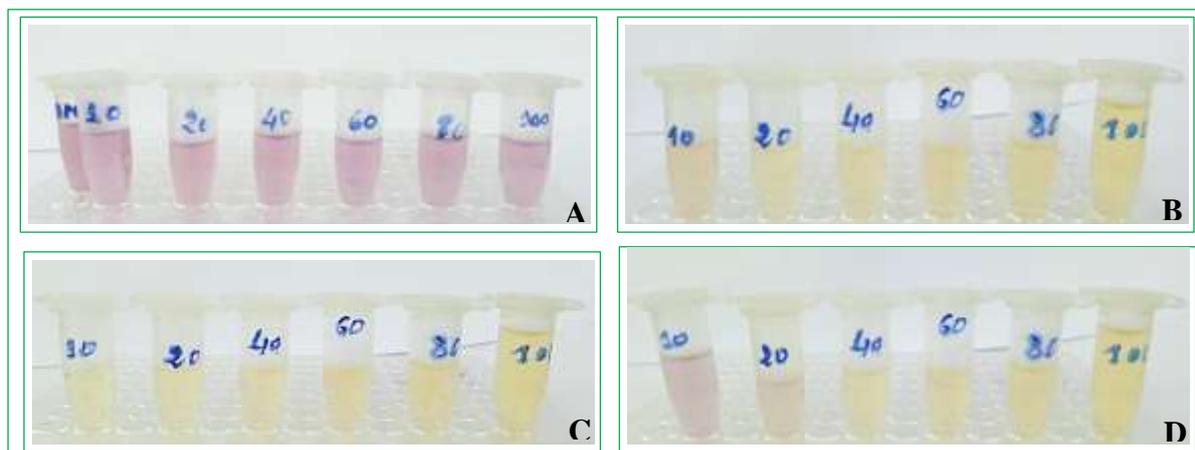
(Hamidi, 2011). Les résultats obtenus lors du test de mesure des pourcentages d'inhibition du radical DPPH sont présentés dans le **Tableau XVI**.

**Tableau XVI : Résultats du test de mesure de pourcentage d'inhibitions du radical DPPH**

Concentration [mg/ml]	Pourcentage d'inhibition %		
	L'extrait de <i>Juglans regia</i> L.	Vitamine E	vitamine C
10	6.60 %	17.61 %	/
20	9.38 %	24.65 %	/
40	31.04 %	31.50 %	40.97 %
60	38.20 %	39.25 %	41.67 %
80	43.4 %	51.33 %	43.75 %
100	59.03 %	55.56 %	45.14 %

On remarque que le pourcentage d'inhibitions du radical libre (DPPH) augmente en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique (**Figure 36**).

Selon ces résultats, on constate que l'extrait éthanolique de *Juglans regia* L., la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) exercent une activité inhibitrice significative.



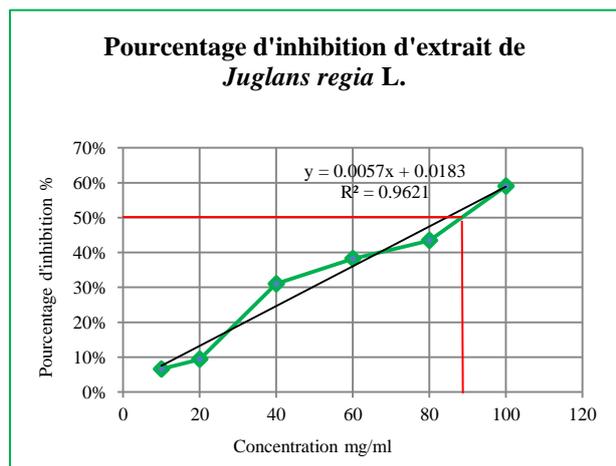
**A : La solution DPPH    B : Acide ascorbique    C : Extrait éthanolique    D : vitamine E**

**Figure 33 : Résultats de l'activité antioxydante (Photos originales, 2024)**

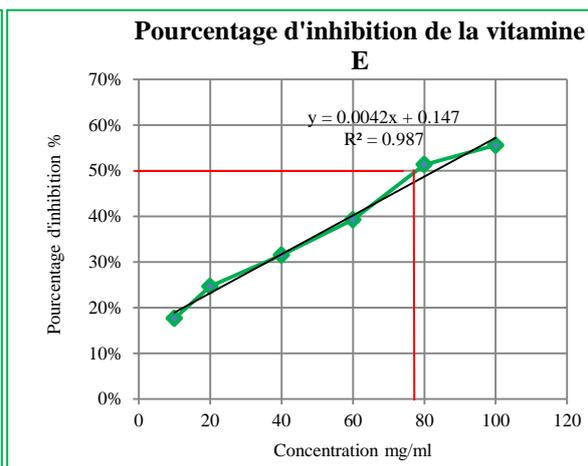
## ❖ Résultats d'IC50

La valeur de l'IC50 est définie comme la concentration de substrats qui provoque une perte de 50% de l'activité du DPPH. Plus IC50 est petite, plus le composé possède une bonne activité antioxydante (Babovic *et al.*, 2010).

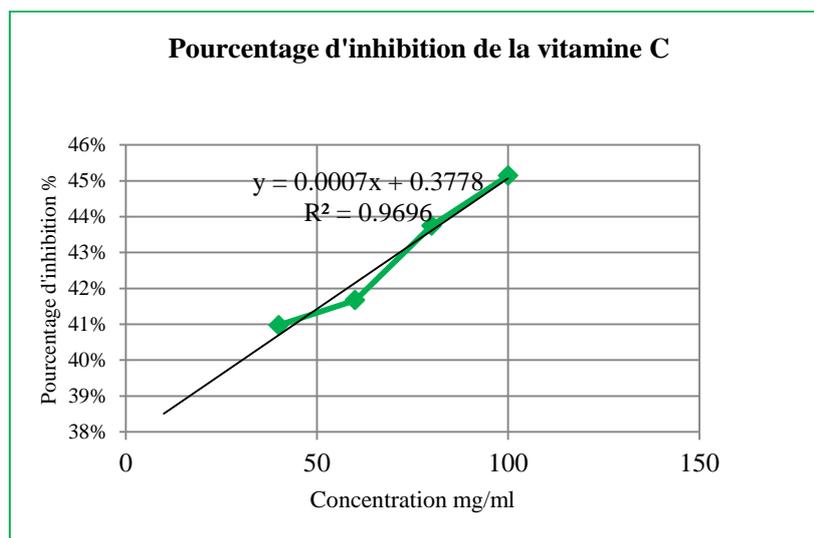
Les graphes suivants montrent le pourcentage d'inhibitions de l'activité du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de *Juglans regia* L., vitamine C et E :



**Figure 34 :** 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 35 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine E



**Figure 36 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine C

L'extrait éthanolique des écorces de *Juglans regia* L. possède une activité anti-radicalaire IC50 (88 mg/ml), inférieure à celle de la  $\alpha$ -tocophérol 78 (mg/ml).

En comparant la concentration inhibitrice 50 % des radicaux libres de DPPH avec les résultats publiés par (**Ghasemi et al., 2011**), qui ont montré l'IC50 égale à 27.6 mg/ml. On constate alors que nos résultats sont totalement différents.

L'étude de (**Noumi et al., 2011**) menée en Tunisie, montre que les écorces de noyer (extrait à l'acétate d'éthyle) possèdent des activités antioxydantes élevées (IC50, 3 µg/ml) corrélées à une forte concentration de tanins et de polyphénols. Cette différence des résultats pourraient être expliquée par les différentes techniques d'extraction.

Selon **Van Helden et al.(1995)**, l'activité antioxydante des plantes est due à leurs richesses en composés phénoliques, présentant une activité antioxydante puissante en empêchant efficacement la formation des radicaux libres.

Selon **Deshpande et al., (2011)**, l'acide ellagique est considéré comme étant une matière antioxydante puissante ayant un effet protecteur.

**Zhang et al., (2009)** ont identifié sept composés phénoliques chez *J. regia* : le pyrogallol, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, le gallate d'éthyle, l'acide protocatéchique, l'acide gallique et le 3,4,8,9,10-pentahydroxydibenzo (b,d) pyran-6-one, possèdent tous une activité antioxydante remarquable.

Selon **Bourais et al., (2022)**, l'extrait méthanolique de la coque possède la capacité de piéger le radical DPPH plus forte, avec une IC50 de  $32,27 \pm 0,69$  µg/mL.

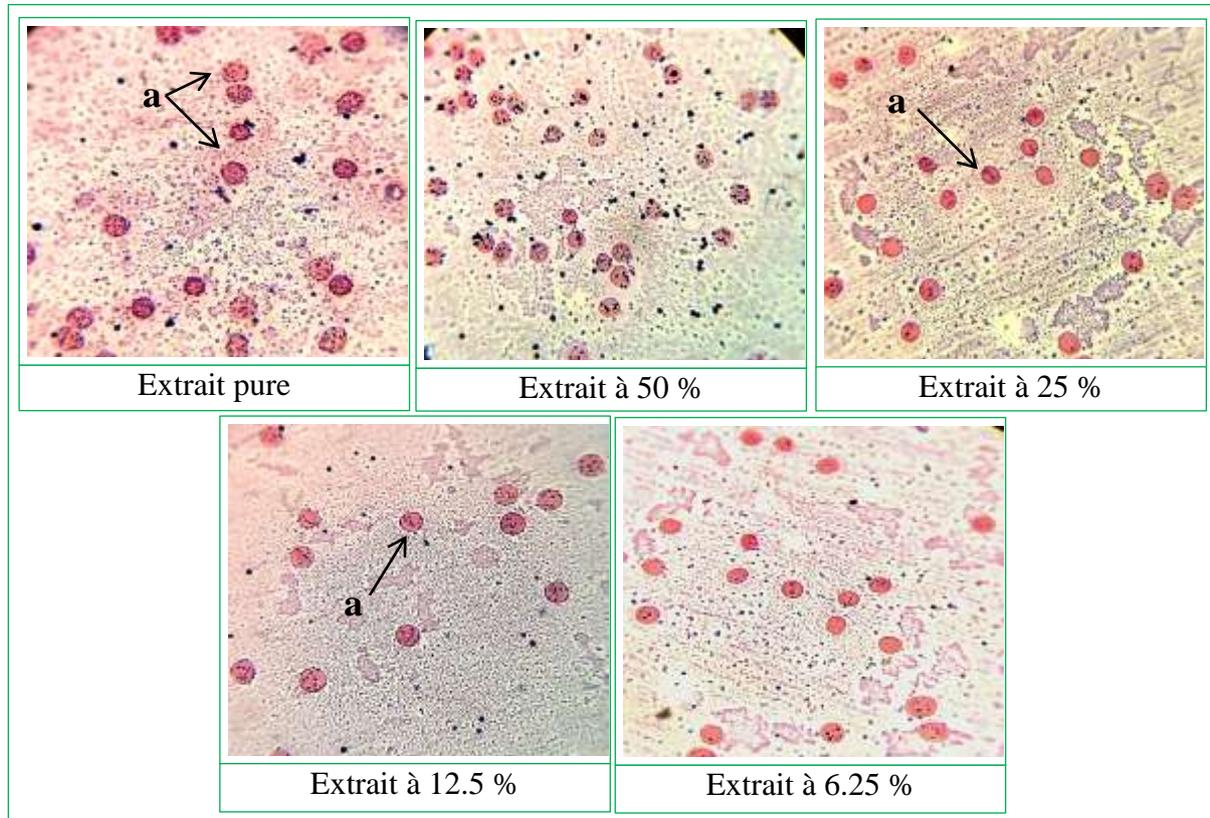
Les composés phénoliques présents, principalement l'acide caféique et les dérivés de la quercétine, sont d'excellents antioxydants, car ils présentent les caractéristiques structurales requises à savoir un groupe ortho-dihydroxy sur un cycle aromatique (**Jalili et Sadeghzade, 2012**).

Des études montrent que l'activité anti-radicalaire est corrélée au taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (**Mariod et al., 2009**).

L'étude de **Zhang et al., (2009)** suggèrent que les activités antioxydantes des composés phénoliques de *J. regia*, peuvent être influencées par le nombre d'hydroxyles dans leurs anneaux aromatiques.

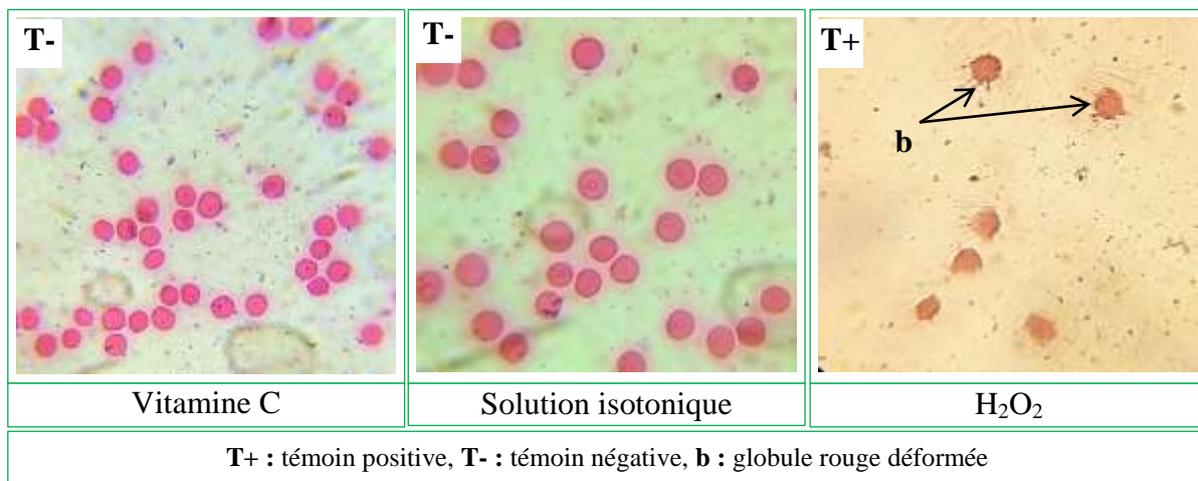
III.5. Résultats de la toxicité érythrocytaire *Ex vivo*

L'observation microscopique (Gx100) des différents échantillons des cellules érythrocytaires (frottis sanguins) est présentée dans les figures ci-dessous :



a : Globule rouge bien arrondi

Figure 37 : Toxicité érythrocytaire à différents concentration de l'extrait éthanolique sous microscope Gx100 (Photos originales, 2024)



T+ : témoin positive, T- : témoin négative, b : globule rouge déformée

Figure 38 : Toxicité érythrocytaire sous microscope Gx100 (Photos originales, 2024)

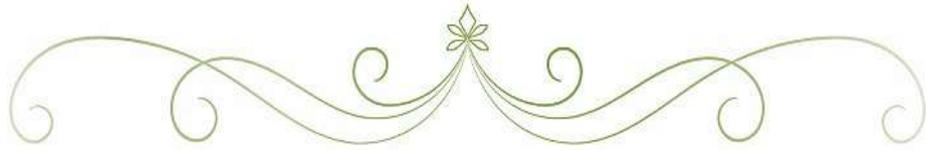
D'après les **Figures 40 et 41**, les globules rouges présentent une morphologie normale, tout en préservant la forme de leur membrane cytoplasmique. Ce qui confirme l'absence de l'effet toxique de l'extrait éthanolique, en comparaison avec les témoins négatifs (vitamine C et la solution isotonique). Contrairement au contrôle positif ( $H_2O_2$ ), les cellules érythrocytaires ont perdu leur morphologie normale, en raison de la déstabilisation membranaire, ainsi leur quantité est diminuée.

Des recherches récentes ont exploré les mécanismes par lesquels les extraits de *Juglans regia* L. confèrent leurs propriétés protectrices contre les dommages des globules rouges, causés par le stress oxydatif ou les réactions inflammatoires. Ces effets protecteurs semblent être attribuables à la présence de molécules bioactives dans le noyer (**Rusu et al., 2020 ; Fizeşan et al., 2021 ; Bhardwaj et al., 2023**).

Cependant, des recherches ont confirmé ce potentiel sur les érythrocytes, en indiquant que l'extrait de *Juglans regia* L. assure une protection contre les dommages aux cellules sanguines après un contact de 30 min à 37°C (**Chaieb et al., 2013 ; Dolatabadi et al., 2018 ; Khalid et al., 2020**).

D'après **Jaiswal et Tailang (2017)**, Les études sur des rats Wistar suggèrent que l'extrait de *Juglans regia* L. ne présente aucune toxicité aiguë ou sub-chronique significative, même à des doses élevées allant jusqu'à 5000 mg/kg. Ces résultats sont confirmés aussi par les études de (**Bhat et al., 2023**).

A la lumière de ces résultats, on peut dire que l'extrait des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. peut avoir un potentiel d'utilisation thérapeutique. En effet, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer profondément la sécurité et l'efficacité de l'extrait de noyer en raison d'une utilisation humaine.



## *Conclusion*



## Conclusion

---

La plante *Juglans regia* L. a été étudiée pour ses propriétés phytochimiques et thérapeutiques, en particulier pour son potentiel dans le traitement notamment des caries (89 %) et des plaques dentaires (2%). Les travaux réalisés ont permis de mettre en évidence divers métabolites secondaires et d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette plante.

Le screening phytochimique des molécules bioactives a révélé la présence des flavonoïdes, des stérols, des terpénoïdes, des saponines et des tanins, connus pour leur bonne activité antioxydante et antimicrobienne, ainsi que leur activité anti-hémolytique.

Le produit formulé à base d'extrait éthanolique (bain de bouche) a montré une bonne stabilité physico-chimique et une conformité microbiologique, ce qui a permis de mettre en valeur certaines propriétés thérapeutiques dans la santé bucco-dentaires.

Le criblage du pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique des écorces de *J. regia in vitro* a été effectué par la méthode de diffusion radiale sur gélose, révélant une forte activité antibactérienne sur toutes les souches de référence. D'une part, le bain de bouche a montré un fort potentiel anticariogène contre les streptocoques oraux, avec des zones d'inhibition très importantes qui varient entre 10,5 mm et 39 mm. D'autre part, le bain de bouche formulé à base de *J. regia* s'est montré très efficace vis-à-vis des biofilms d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et de trois souches *Staphylococcus aureus* cliniquement isolées.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction des radicaux libres (DPPH) a révélé une activité modérée pour l'extrait éthanolique comparativement avec celle de l' $\alpha$ -tocophérol, avec un EC50 égal 88 et 78 mg/ml respectivement. Cette activité antiradicalaire pourrait être due à la présence importante de métabolites secondaires, notamment les polyphénols, les flavonoïdes, les stérols, les terpénoïdes, les coumarines ...

L'extrait éthanolique incorporé dans le bain de bouche formulé comme un principe actif ne présente aucune toxicité érythrocytaire. La stabilisation de la membrane des globules rouges par cet extrait des écorces pourrait être liée à leur composition chimique qui est riche en polyphénols et les flavonoïdes.

Au terme de cette étude, on peut conclure que *Juglans regia* L. est une plante prometteuse et riche en substances biologiquement actives, conférant un grand intérêt

## Conclusion

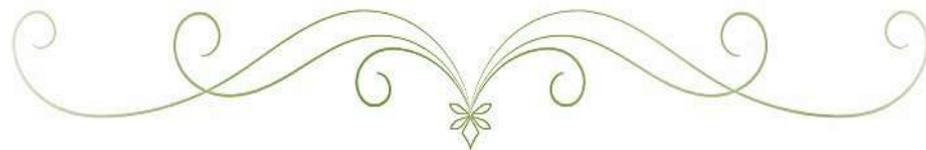
---

pharmacologique notamment dans la prévention de l'apparition des caries et de plaque dentaire.

Cependant, cette étude reste préliminaire et nécessite des études approfondies par des techniques analytiques performantes (HPLC et CG-MS), afin de déterminer les composés chimiques responsables des effets biologiques et pharmacologiques ainsi que leur mécanisme d'action. Il est encourageant d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne par d'autres méthodes *in vitro* et *in vivo*.



## *Références Bibliographiques*



## Références Bibliographiques

---

### A

**Aas, JA, Griffen, AL, Dardis, SR, Lee, AM, Olsen, I., Dewhirst, FE, et Paster, BJ (2008).** Bactéries des caries dentaires des dents primaires et permanentes chez les enfants et les jeunes adultes. *Journal de microbiologie clinique*, 46 (4), 1407-1417.

**Abdelali, S., Takla, A., Meghzili, M., Termoul, Z., Merouane, K., Younes, A., et Zouaghi, I. (2019).** Evaluation de la prescription des antibiotiques en parodontologie par les médecins dentistes.

**Abdelmounaim, K. (2013).** Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus*, 158.

**Abhary, M. et Al-Hazmi, AA (2016).** Activité antibactérienne des extraits de Miswak (*Salvadora persica* L.) sur l'hygiène bucco-dentaire. *Journal de l'Université des sciences de Taibah*, 10 (4), 513-520.

**AFNOR (1986).** Recueil de Norme Française, corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés. AFNOR Ed., Paris, 527 p.

**Aissi, A., & Boudjelal, B. (2014).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire des extraits aqueux de *Juglans regia* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(5), 647-655.

**Akram, E., Jalal, Z.M., PejmanM, S.R., Somayeh, O. (2013).** Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Pharm. Biol.* 51(5), 558–565.

**Ali-Delille, L. (2013).** Les plantes médicinales d'Algérie. 3e édition, Berti Editions, Algérie. ISBN 9789961692028.

**Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. (2012).** Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of *Hyssopus angustifolius*, *Pharm Biol*, V.50 1062-1066.

**Almonte-Flores, DC, Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G. et Rosales-Castro, M. (2015).** Propriétés pharmacologiques et génotoxiques des extraits polyphénoliques d'écorces de *Cedrela odorata* L. et *Juglans regia* L. chez le rongeur. *Médecine complémentaire et alternative fondée sur des données probantes*, 2015 (1), 187346.

## Références Bibliographiques

---

**Amaral, J. S., Castilho, P. C., & Santos-Buelga, C. (2004).** Analyse par HPLC-DAD-ESI/MS des acides phénoliques et des flavonoïdes de *Juglans regia* L. feuilles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(3), 783-790.

**Amin, E. et Musa, A. (2016).** Évaluation des antioxydants, des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes totaux des espèces suaeda collectées dans la zone d'Al Jouf. *Journal européen des plantes médicinales*, 17, 1-6.

**Amin, M. M., Mir Sawhney, S.S., Jassal, M.M.S. (2013).** Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale* Wudpecker, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V. 2, n°1, 1-5.

**Angiosperm Phylogeny Group IV. (2016).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20.

**Antezack, A. (2017).** Importance du contrôle de plaque dentaire individuel en phase thérapeutique et en phase de maintenance chez l'adulte et l'adolescent (Doctoral dissertation).

**Arnal, L., & al. (2009).** Analyse de la diversité génétique du noyer commun (*Juglans regia* L.) en France. *Annales de Forest Science*, 66(5), 504.

**Asma, K. et Yasmine, C. (2021).** Activité antimicrobienne in vitro des extraits de *Salvadora persica* et de *Juglans regia* contre les souches microbiennes de la cavité buccale. *Biocatalyse et biotechnologie agricole*, 33, 102003.

## B

**Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S. et Zizovic, I. (2010).** Extraction au dioxyde de carbone supercritique de fractions antioxydantes d'herbes Lamiacées sélectionnées et leur capacité antioxydante. *Science alimentaire innovante et technologies émergentes*, 11 (1), 98-107.

**Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, (thèse de doctorat).

## Références Bibliographiques

---

**Bagré, I., Ouattara, K., Yoro, B., Meite, S. et Coulibaly, A. (2014).** Mise en évidence des propriétés antistaphylococciques des flavonoïdes totaux de *Thonningia sanguinea* (Vahl). *Phytothérapie*, 12, 360-363.

**Balto, H., Al-Sanie, I., Al-Beshri, S. et Aldrees, A. (2017).** Efficacité des extraits de *Salvadora persica* contre les agents pathogènes oraux courants. *Le journal dentaire saoudien*, 29 (1), 1-6.

**Becquey J., (1997).** Les guides des sylvicultures les noyer a bois. Edition Institut pour le développement forestier Paris, France p 15-25.

**Bekroyves, A., Janat, A., Mamyr, B.B., Boua, B., Fézan, H.T., Ehouan, E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae) ; *Sciences & nature*; V. 4, n°2, 217-225.

**Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

**Bellifa, S., Hassaine, H., Balestrino, D., Charbonnel, N., M'hamedi, I., Terki, IK, ... & Forestier, C. (2013).** Évaluation de la formation de biofilm de *Klebsiella pneumoniae* isolé de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen, Algérie. *Afr J Microbiol Res*, 7 (49), 5558-64.

**Benmansour, B., Benali, M., Aouadhi, M. A. A., Bellakhdar, M. T., & Ramdani, M. (2007).** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Juglans regia* L. contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 9(181-8), 181-188.

**Bennacer, A., Cherif, H.S. (2017).** «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, 41-52.

**Bhardwaj, N., Puri, A., Wadhwan, V., Nangia, R. et Jahan, I. (2023).** Effet antimicrobien de l'écorce de *Juglans regia* avec des antibiotiques couramment utilisés contre les colonisateurs initiaux de la plaque et des caries : une étude comparative. *Journal de pathologie buccale et maxillo-faciale*, 27 (3), 443-454.

## Références Bibliographiques

---

**Bhat, A. A., Shakeel, A., Rafiq, S., Farooq, I., Malik, A. Q., Alghuthami, M. E., Alharthi, S., Qanash, H., & Alharthy, S. A. (2023).** *Juglans regia* Linn.: A Natural Repository of Vital Phytochemical and Pharmacological Compounds. *Life*, 13(2), 380.

**Blumenthal, M., Goldberg, A., & Brinckmann, J. (2000).** *Juglans regia*. Dans *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs* (p. 254-258). Integrative Medicine Communications.

**Bonev, N. (1973).** *Juglans regia* L. In *Flora of Bulgaria* (Vol. 3, pp. 324-325). Bulgarian Academy of Sciences.

**Bonhomme, M. (2019).** Etude botanique de trois espèces de noyers, *Juglans regia*, *Juglans cinerea* et *Juglans nigra*, de leur composition chimique, de leur intérêt thérapeutique et de leur utilisation à l'officine (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

**Boudjelal, A. (2013).** Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).

**Boukhari, F. (2017).** Extraction et analyse de l'huile essentielle et des métabolites secondaires lourds de *Juglans regia* L (Doctoral dissertation, Faculté de Chimie).

**Bourais, I., Benayache, F., & Benkhaled, M. (2022).** Enquête comparative sur les constituants chimiques des grains, feuilles, coque et écorce de *Juglans regia* L., en utilisant l'analyse HPLC-DAD-ESI-MS/MS et l'évaluation de leur activités antioxydantes, antidiabétiques et anti-inflammatoires. *Molécules*, 27(24), 8989.

**Bourais, I., Elmarrkechy, S., Taha, D., Badaoui, B., Mourabit, Y., Salhi, N., Iba, N. (2022).** Enquête comparative des constituants chimiques des grains, des feuilles, de l'enveloppe et de l'écorce de *Juglans regia* L., à l'aide de l'analyse HPLC-DAD-ESI-MS/MS et de l'évaluation de leurs activités antioxydantes, antidiabétiques et anti-inflammatoires. *Molécules*, 27 (24), 8989.

**Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., & Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173-183.

## Références Bibliographiques

---

**Bouzidi, S. (2020).** Les infections bucco-dentaires : prise en charge et le rôle du laboratoire.

**Boyer, E. (2019).** Maladie parodontale, microbiote et fer (Doctoral dissertation, Université de Rennes).

**Bretonneau, J., Fauré, J. (1979).** Le noyer commun (*Juglans regia* L.). In Les arbres fruitiers (pp. 441-450). Editions du Point Vétérinaire.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publishing. Chapitre 28: *Juglans regia*, pp. 418-419.

### C

**Carnat, A., PETITJEAN-FREYTET, C., Muller, D., & LAMAISON, J. (1993).** Teneurs en principaux constituants de la feuille de noyer *Juglans regia* L. Plantes médicinales et phytothérapie, 26(4), 332-339.

**Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., & Silva, B. M. (2010).** Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. Food and chemical toxicology, 48(1), 441-447.

**Chaieb, K., Kouidhi, B., Slama, R. B., Fdhila, K., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2013).** Cytotoxicity, antibacterial, antioxidant, and antibiofilm properties of Tunisian *Juglans regia* bark extract. Journal of herbs, spices & medicinal plants, 19(2), 168-179.

**Chava, V. R., Manjunath, S. M., Rajanikanth, A. V., & Sridevi, N. (2012).** The efficacy of neem extract on four microorganisms responsible for causing dental caries viz *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. J Contemp Dent Pract, 13(6), 769-72.

**Chehtit-Hacid, F., (2016).** 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.

**Chelli-Chentouf, N., Meddah, A.T.T., Mullié, C., Aoues, A. et Meddah, B. (2012).** Activité antimicrobienne in vitro et in vivo des extraits algériens de Hoggar *Salvadora persica* L. contre les souches microbiennes de la cavité buccale des enfants. Journal d'Ethnopharmacologie, 144 (1), 57-66.

## Références Bibliographiques

---

**Cheow, W.S., Chang, M.W., Hadinoto, K., (2011),** 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, 158-165.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2020),** «Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale». 8ème édition, Algérie,.

**Costa, RM, Magalhães, AS, Pereira, JA, Andrade, PB, Valentão, P., Carvalho, M. et Silva, BM (2009).** Évaluation des activités anti-radicalaires et antihémolytiques de la feuille de coing (*Cydonia oblonga*): une étude comparative avec le thé vert (*Camellia sinensis*). *Toxicologie alimentaire et chimique*, 47 (4), 860-865.

### D

**Daglia, M., 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23, 174-181.

**Delille A. (2010).** Les plantes médicinales en Algérie : Diversité, usages et conservation. *Rev Ethnobiol.*;8(1):109-122.

**Deshpande, R.R., Kale, A.R., Ruikar, A.D., Panvalkar, P.S., Kulkarni, A.A., Deshpande, N.R., Salvekar, J.P. (2011).** Antimicrobial activity of different extracts of *Juglans Regia* L. against oral microfora. *Int. J. Pharm. Sci.* 3, 200-201.

**Dewhirst, FE, Chen, T., Izard, J., Paster, BJ, Tanner, AC, Yu, WH, et Wade, WG (2010).** Le microbiome oral humain. *Journal de bactériologie*, 192 (19), 5002-5017.

**Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., & Mahdavi-Ourtakand, M. (2018).** Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 118, 285-289.

**Douhou, N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissihassani I M., Badoc A., et Gmira N., (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibero-marocaine *Thymelaealythroides*; *Bull soc. pharm. Bordeaux*, V.142, 61-78.

**Dupérat, R., & Polese, J.-M. (2008).** *Juglans regia* L.: Noyer commun. In *Ressources génétiques forestières en France* (pp. 441-444). Editions Quae.

## Références Bibliographiques

---

### E

**Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., Eslami, B., (2010).** Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*, *Open Life Sciences*, V. 5.

**Edeoga, H. O. ; Okwu, D. E. ; Edeoga, B. A. (2005).** Phytochemical and pharmacological studies on the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2(2), 44-47.

**Emira, M., Taamalli, W., & Ferchichi, A. (2011).** Évaluation de l'activité antioxydante des feuilles de *Juglans regia* L. et de ses potentialités anticancéreuses sur les lignées cellulaires humaines A549 et MCF-7. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2803-2810.

**Emira, N., Mejdi, S., Najla, T., Hafedh, H., Riadh, K., Eulogio, V. et Amina, B. (2011).** Activités antibactériennes, anticandidales et antioxydantes des extraits de *Salvadora persica* et *Juglans regia* L.. *Journal de recherche sur les plantes médicinales*, 5 (17), 4138-4146.

### F

**Fang, F., Yingxin, Q., Ling, Q., Qing, F., Liangzhong, Z., Shuang, C., Qiang, L., Duo, Z., Ligu, W. (2015).** Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. *Iran J. Basic Med. Sci.* 18, 544– 548.

**Fizeşan, I., Rusu, ME, Georgiu, C., Pop, A., Ştefan, MG, Muntean, DM, Popa, DS (2021).** Effets antitussifs, antioxydants et anti-inflammatoires d'un extrait de septum de noix (*Juglans regia* L.) riche en composés bioactifs. *Antioxydants*, 10 (1), 119.

**Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T. (2004).** Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *BioFactors* 2, 251–253.

### G

**Gallais, A., & Bannerot, H. (1992).** Le noyer (*Juglans regia* L.). In *Les arbres fruitiers* (pp. 441-444). Editions du Point Vétérinaire.

**Ganfou, H., Houvohehou, J. P., Assanhou, A. G., Bankole, H. S., & Gbenou, J. (2019).** Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC) Guill. Et Perr.(Combretaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), 643-651.

## Références Bibliographiques

---

**Gbala, I. D., & Anibijuwon, I. I. (2018).** Antibacterial activity of *Terminalia glaucescens*, *Mangifera indica* and *Mitracarpus villosus* on carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 19(4), 289-300.

**Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, SM, Nabavi, SF, Ebrahimzadeh, MA et Pourmorad, F. (2011).** Influence des facteurs environnementaux sur l'activité antioxydante, la teneur en phénols et en flavonoïdes des coques vertes de noix (*Juglans regia* L.). *Journal de recherche sur les plantes médicinales*, 5 (7), 1128-1133.

**Ghosh, A., Jayaraman, N. et Chatterji, D. (2020).** Inhibition par petites molécules du biofilm bactérien. *ACS oméga* , 5 (7), 3108-3115.

**Gillet, Jacques. (2009).**"Coloration de Gram". *Encyclopædia Universalis*.

**Gupta, A., Behl, T., & Panichayupakaranan, P. (2019).** A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obesity Medicine*, 16, 100142.

## H

**Hamidi, A.(2011).**Etude et évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Myrtus communis*. Thèse de doctorat. Université de Blida. Algérie.

**Harouak, H., Ibijbijen, J. et Nassiri, L. (2021).** Profil chimique de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, *Juglans regia* L. et *Olea europaea* L. var. *Sylvestris* utilisé contre les maladies bucco-dentaires : analyse in vitro entre teneur en polyphénoliques et optimisation de l'extraction aqueuse. *Héliyon*, 7 (5).

**Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. (2009).** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles. *Food Chem.*, 116(3), 714-721.

**Hiroshi, S., Tanaka, J., Kikuchi, M., Fukuda, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2008).** Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and d-galactosamine hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4444–4449.

## Références Bibliographiques

---

**Hosseinzadeh, H., Zarei, H. et Taghiabadi, E. (2011).** Effets antinociceptifs, anti-inflammatoires et de toxicité aiguë des feuilles de *Juglans regia* L. chez la souris. Revue médicale du Croissant-Rouge iranien , 13 (1), 27.

**Huang, M., & Ferraw, J. (1991).** Kuwaiti Plants Distribution, Traditional Medicine, Phytochemistry. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 43(5), 347-353

**Hubert, S., Grzegorz, C. (2015).** Anti-fungal activity of *Juglans regia* leaf extract against *Candida albicans* isolates. Pol. J. Environ. Stud. 24(3), 1339–1348

### J

**Jahanban-Esfahlan, A. (2019).** A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. Molecules, 24(11), 2133.

**Jaiswal, B. S., & Tailang, M. (2017).** *Juglans regia*: A review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 7(9), 390-398.

**Jalili, A. et Sadeghzade, A. (2012).** Profil phénolique comparatif des cultivars de feuilles de noyer persan (*Juglans regia* L.) cultivés en Iran. Afr. J. Biochimie. Rés , 6 , 33-38.

**Jamshid, M., Khalil, S., Hamdollah, D., Bahram, M. (2011).** Anti-diabetic effects of an alcoholic extract of *Juglans regia* in an animal model. Turk. J. Med. Sci. 41(4), 685–691.

### K

**Kaci, G., Goudercourt, D., Dennin, V., Pot, B., Doré, J., Ehrlich, SD,& Delorme, C. (2014).** Propriétés anti-inflammatoires de *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale de la cavité buccale et du tube digestif. Microbiologie appliquée et environnementale, 80 (3), 928-934.

**Kale, A., & Karadeniz, B. (2010).** Évaluation des activités antioxydantes et antibactériennes de *Juglans regia* L. Journal of Medicinal Food, 13(5), 1163-1168.

**Khalid, M., Bilal, M., Munir, H., Shah, SZH, Khurshid, M., El-Shazly, M. et Iqbal, HM (2020).** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne, anti-biofilm et cytotoxique de *Juglans*

## Références Bibliographiques

---

*regia*, Tamarix aphylla L. et acacia modesta d'inspiration naturelle aux potentialités médicinales. J. Application pure. Microbiol , 14 , 1133-1142.

**Kouadio, N. J., Kipre, B. G., Guessennd, N. K., Kouassi, K. A., Yao, K., & Kone, M. W. (2017).** Activity evaluation of leaves' extracts of Funtumia africana Stapf (Apocynaceae) towards Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and phytochemical screening. SM J Med Plant Stud, 1(1), 1001.

### L

**Li, L., R. Tsao, R. Yang, JK Kramer et M. Hernandez.(2007).** Profils d'acides gras, teneurs en tocophérol et activités antioxydantes du cœur (*Juglans ailanthifolia* Var. cordiformis) et du noyer persan (*Juglans regia* L.). Revue de chimie agricole et alimentaire, 55 (4), 1164-1169.

**Liang N. et Kitts D.D., (2014).**Antioxidant property of coffe components: assessment of methods that define mechenisms of action.Molecules. 19(11):19180-19208.

**Liu, J., Zhang, Y., Zhang, J., & Zhang, Y. (2008).** Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Juglans regia* L. Leaves. Journal of Food Science, 73(4), C345-C351.

**Liu, X., Wang, L., & Sun, B. (2007).** Activité antibactérienne et antifongique des feuilles de *Juglans regia* L. Journal of Applied Microbiology, 103(2), 418-425.

**Luczak, J., & Kujawska, M. (1989).** Composition of fatty acids in the seed oil of *Juglans regia* L. from various regions of Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 58(4), 577-582.

### M

**Mamadou, R. S., Moussa, I., Sessou, P., Yehouenou, B., Agbangnan, P. D., Illagouma, A. T.,& Ikhiri, K. (2014).** Etude phytochimique, activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique d'extraits de *Sebastiania chamaelea* (L.) Müll. Arg. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, 37, 10-17.

**Manning, W. E. (1978).** La classification au sein des Juglandacées. Annales du jardin botanique du Missouri, 65(4), 1058-1087.

## Références Bibliographiques

---

**Mariod, AA, Ibrahim, RM, Ismail, M. et Ismail, N. (2009).** Activité antioxydante et teneur phénolique des fractions riches en phénols obtenues à partir de tourteaux de cumin noir (*Nigella sativa*). *Chimie alimentaire*, 116 (1), 306-312.

**Membre de la Commission Européenne de la Pharmacopée., (2012)** «Pharmacopée Européenne », 7emeédition, Strasbourg.

**Milane, H. A., Ubeaud, G., Vandamme, T. F., & Jung, L. (2004).** Isolation of quercetin's salts and studies of their physicochemical properties and antioxidant relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(13), 3627-3635.

**Milek, M., Ciszkowicz, E., Lecka-Szlachta, K., Miloś, A., Zaguła, G., Pasternakiewicz, A. et Dżugan, M. (2022).** Composition minérale, potentiel antioxydant, anti-uréase et antibiofilm des feuilles et des fruits non mûrs. *Acta Universitatis Cibiniensis. Série E : Technologie alimentaire* , 26 (1), 69-82.

**Mohammed, A., & Al-Marzoqi, A. H. (2018).** Évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait de *Juglans regia* L. contre des agents pathogènes d'origine alimentaire. *Journal of King Saud University - Science*, 30(4), 454-458.

**Munson, MA, Banerjee, A., Watson, TF et Wade, WG (2004).** Analyse moléculaire de la microflore associée aux caries dentaires. *Journal de microbiologie clinique*, 42 (7), 3023-3029.

**Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1), 143-148.

## N

**Nicolas, GG et Lavoie, MC (2011).** *Streptococcus mutans* et streptocoques oraux dans la plaque dentaire. *Revue canadienne de microbiologie*, 57 (1), 1-20.

**Nostro, A., Germanò, M. P., D'Angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology*, 30(5), 379-384.

**Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Valentin, E. et Bakhrouf, A. (2010).** Propriétés antifongiques des extraits de *Salvadora persica* et *Juglans regia* L. contre les souches orales

## Références Bibliographiques

---

de Candida. Revue européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses , 29 , 81-88.

**Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Hajlaoui, H., Ksouri, R., Valentin, E. et Bakhrouf, A. (2011).** Activités antibactériennes, anticandidales et antioxydantes des extraits de *Salvadora persica* et *Juglans regia* L.. Journal de recherche sur les plantes médicinales , 5 (17), 4138-4146.

**Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., Hamdani, G., Bouzlama, L., & Bakhrouf, A. (2012).** Activités antioxydantes et identification par RP-HPLC des polyphénols dans l'extrait d'acétate d'éthyle des écorces de *Juglans regia* L traitées en Tunisie. Journal of Medicinal Plants Research, 6(8), 1468-1475.

### O

**Ogunmoyole, T., Kade, IJ et Korodele, B. (2011).** Propriétés antioxydantes in vitro des extraits aqueux et éthanoliques de noix (*Juglans regia*). Journal de recherche sur les plantes médicinales , 5 (31), 6839-6848.

**Ohara-Nemoto, Y., Haraga, H., Kimura, S. et Nemoto, TK (2008).** Présence de staphylocoques dans les cavités buccales d'adultes en bonne santé et trafic nasal-oral de la bactérie. Journal de microbiologie médicale , 57 (1), 95-99.

**Ohemeng, KA, Schwender, CF, Fu, KP et Barrett, JF (1993).** Activité inhibitrice de l'ADN gyrase et antibactérienne de certaines flavones (1). Lettres de chimie bioorganique et médicinale , 3 (2), 225-230.

**Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, IC, Bento, A., Estevinho, L. et Pereira, JA (2008).** Phénols totaux, potentiel antioxydant et activité antimicrobienne des coques vertes de noix (*Juglans regia* L.). Toxicologie alimentaire et chimique, 46 (7), 2326-2331.

**Organisation Mondiale de la Santé;(OMS),(2000).** monographs on selected medicinal plants. Volume 1. Geneva:

**Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1999).** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale.

## Références Bibliographiques

---

**Ouis, F., & Zitouni, A. (1996).** Mise en évidence d'une activité antioxydante des feuilles de *Juglans regia* L. vis-à-vis des radicaux libres DPPH. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, 319(12), 823-827.

**Ouräïni ,D., Agoumi, A., Alaoui, M. I., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., Belabbas, M. A., (2007).** 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, ,6-14.

### P

**Pandita Nancy, PN, Mantri Manasi, MM et Alice Varghese, AV (2011).** Activité antiplaque de *Juglans regia* L. et caractérisation de la juglone de *Juglans regia* L.

**Parivash, R., Najmeh, K., Sedigheh, A., Mahbubeh, S. (2011).** Anti-diabetic effects of walnut oil on alloxan-induced diabetic rats. *Afr. J. Pharmacy Pharmacol.* 5(24), 2655–2661.

**Parle, T. I. (2023).** *Juglans regia* Linn: A Phytopharmacological Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 1-12

**Percival S.L., Malic S., Cruz H. et Williams D.W. (2011).** Introduction to Biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine.* 6 : 41-68.

**Peters, BM, Jabra-Rizk, MA, O'May, GA, Costerton, JW et Shirtliff, ME (2012).** Interactions polymicrobiennes : impact sur la pathogénèse et les maladies humaines. *Revue de microbiologie clinique*, 25 (1), 193-213.

**Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S., & Berset, C. (2000).** Determination of biologically active phenols and polyphenols in food. *Talanta*, 51(4), 709-718.

**Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.). (2012).** 9<sup>e</sup> Édition. Strasbourg : EDQM.

**Pisoschi, A. M., et Negulescu, G. P. (2012).** Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01).

**Poyrazolu, E.C., Biyik, H. (2010).** Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydin Turkey. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4, 2318–2323.

## Références Bibliographiques

---

### Q

**Quave, CL, Plano, LR, Pantuso, T. et Bennett, BC (2008).** Effets des extraits de plantes médicinales italiennes sur la croissance planctonique, la formation de biofilm et l'adhérence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Journal d'ethnopharmacologie* , 118 (3), 418-428.

### R

**Raheleh, J., Mahmood, S., Ghafari, M., Salami, K., Hourri, V., et al. (2016).** Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 402–409.

**Rahimipannah, M., Hamedi, M., Mirzapour, M. (2010).** Antioxidant activity and phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract. *Afr. J. Food Sci. Technol.* 1, 105–111.

**Rahul,A (2011).***Juglans regia*, synthses –eFlore,Tela Botanica,.

**Raja, G., Shaker, I. A., Sailaja, I., Swaminathan, R., Babu, K. S., & Basha, S. S. (2012).** Nutritional analysis of nuts extract of *Juglans regia* L. *International Journal Of Bioassays*, 68-73.

**Rego, M. A. D., Koga-Ito, C. Y., & Jorge, A. O. C. (2003).** Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida* spp. in children. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17, 332-336.

**Rhayour, R. (2002).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois plantes : *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* et *Mentha piperita*. Thèse de doctorat, Université de Blida.

**Rosaria, A., Floriana, D., Giuseppe, A.M., Simone, R., et al. (2019).** Antibacterial and anti-biofilm activities of walnut pellicle extract (*Juglans regia* L.) against coagulase-negative staphylococci. *Nat. Prod. Res.* 35, 1–5.

**Ruijun, W. (2015).** Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 771–775.

## Références Bibliographiques

---

**Rusu, ME, Fizesan, I., Pop, A., Mocan, A., Gheldiu, AM, Babota, M., et Popa, DS (2020).** Septum du noyer (*Juglans regia* L.) : évaluation des molécules bioactives et des effets biologiques in vitro. *Molécules* , 25 (9), 2187.

### S

**Sabatier S. (1999).** Variabilité morphologique et architecturale de deux espèces de noyers : *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L. et de deux noyers hybrides interspécifiques. Thèse de Doctorat. Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, France.

**Sanchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food science and technology international*,8(3), 121-137.

**Sanogo, Y., Guessennd, N. K., Bi, H. T., Kouadio, N. J., Konan, F. K., Bamba, M., & Dosso, M. (2016).** Evaluation in vitro de l'activité des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries responsables de maladies courantes en Afrique et criblage phytochimique. *International Journal of Biological and Chemical sciences*, 10(3), 1139-1152.

**Santos, A., Barros, L., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013).** Feuilles et décoction de *Juglans regia* L. : Différences de performance concernant les composés bioactifs et les effets antioxydants et antitumoraux in vitro. *Industrial Crops and Products*, 51, 430-436.

**Sato, M., Tsuchiya, H., Miyazaki, T., Ohyama, M., Tanaka, T. et Iinuma, M. (1995).** Activité antibactérienne des flavanostilbènes contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Lettres en microbiologie appliquée* , 21 (4), 219-222.

**Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins; *Phytochemistry*; 30: 3875- 3883.

**Scherrer, R. et Gerhardt, P. (1971).** Tamisage moléculaire par la paroi cellulaire et le protoplaste de *Bacillus megaterium*. *Journal de bactériologie* , 107 (3), 718-735.

**Schroeder, P. A. ; Messing, R. A. (1949).** Relation between mortality from cardiovascular disease and treated water supplies: variations in states and 163 largest cities. *Journal of the American Water Works Association*, 41(10), 1031-1038.

## Références Bibliographiques

---

**Selaimia, A., Addab, N., Fetni, S., Hamlaoui, F., Zerguine, A., & Mahloul, K. (2020).** Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* L. de l'Est Algérien. *Journal of Faculty of Medicine of Oran*, 4(2), 579-586.

**Senhaji, O. ; Nemattalab, S. ; Boudabous, A. (2005).** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9(4), 247-253.

**Shah, S. A., & Rather, A. A. (2018).** *Juglans regia* L.: A comprehensive review on its traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(4), 431-440.

**Shah, TI, Ganesh, N. et Akthar, S. (2013).** Évaluation phytochimique préliminaire et potentiel antibactérien de différents extraits de feuilles de *Juglans Regia* : un fruit sec omniprésent du Cachemire-Inde. *Pharm Sci Rev Res* , 19 , 93-96.

**Sharafati-chaeshtori, R., Sharafati-chaeshtori, F., Rafieian-kopaei, M. et Ashrafi, K. (2011).** Composés phénoliques éthanoliques du noyau de noix et son effet antimicrobien. *SSU\_Journals* , 19 (4), 525-532.

**Sharififar, F., Yassa, N., & Mozaffarian, V. (2010).** Bioactivity of major components from the seeds of *Bunium persicum* (Boiss.) Fedtch. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 342-348.

**Sixou, M., Diouf, A., & Alvares, D. (2007).** Biofilm buccal et pathologies buccodentaires. *Antibiotiques*, 9(3), 181-188.

**Sourabie, T. S., Nikiema, J. B., Lega, I., Nacoulma, O. G., & Guissou, I. P. (2010).** Etude in vitro de l'activité antibactérienne d'extraits d'une plante de la pharmacopée burkinabé: cas d'*Argemone mexicana* L.(Papaveraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(6).

**Sytykiewicz, H., Chrzanowski, G., Czerniewicz, P., Leszczyński, B., Sprawka, I., Krzyzanowski, R., & Matok, H. (2015).** Antifungal activity of *Juglans regia* (L.) leaf extracts against *Candida albicans* isolates. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(3).

## Références Bibliographiques

---

### T

**Tajamul,I.S.,Ekta, S.,Gowhar, A., (2014).** «*Juglans regia* Linn»,A Phytopharmacological Review, World Journal of Pharmaceutical Sciences, V.2, n.4, , 364-373.

**Tuqa, A., Alaa, A., Shima, A., Nora, A., et al. (2017).** Antibacterial effect of *Juglans regia* L. bark extract at diferent concentrations against human salivary microfora. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 3(4), 214–217.

### U

**Upadhyay, V., Kambhoja, S. et Harshaleena, K. (2010).** Activité antifongique et analyse phytochimique préliminaire d'extraits d'écorce de tige de *Juglans regia* linn. IJPBA , 1 (5), 442.

### V

**Van Helden, M., van Heest, HP, van Beek, TA et Tjallingii, WF (1995).** Développement d'un essai biologique pour tester des échantillons de sève de phloème de laitue pour la résistance à *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera, Aphididae). Journal d'écologie chimique, 21, 761-774.

**Verma, G. et Sharma, V. (2020).** Une mise à jour scientifique sur *Juglans Regia* Linn. Journal asiatique de recherche et de développement pharmaceutique, 8 (3), 166-175.

### W

**Wichtl, M. (éd.). (2004).** Médicaments à base de plantes et produits phytopharmaceutiques : un manuel de pratique sur une base scientifique. Presse CRC.

### Y

**Yadav, R., Munin, A., (2011).** Phytochemical analysis of some medicinal plants, Journal of Phytology, V.3, n°12, (2011), 10-14.

**Youdim, KA, Shukitt-Hale, B. et MacKinnon, S. (2000).** Les polyphénols améliorent la résistance des globules rouges au stress oxydatif : in vitro et in vivo (1). Biochim Biophys Acta, 1519, 117-22.

## Références Bibliographiques

---

### Z

**Zakavi, F., Golpasand Hagh, L., Daraeighadikolaei, A., Farajzadeh Sheikh, A., Daraeighadikolaei, A. et Leilavi Shooshtari, Z. (2013).** Effet antibactérien de l'écorce de *Juglans regia* contre les bactéries pathologiques buccales. *Revue internationale de dentisterie*, 2013 (1), 854765.

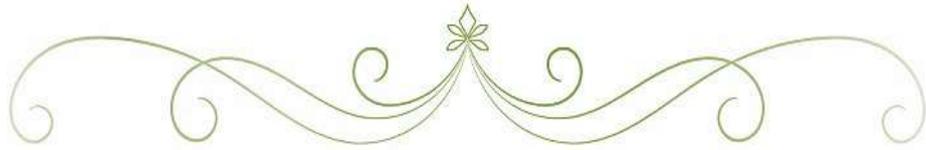
**Zakavi, F., Golpasand Hagh, L., Daraeighadikolaei, A., Farajzadeh Sheikh, A., Daraeighadikolaei, A. et Leilavi Shooshtari, Z. (2013).** Effet antibactérien de l'écorce de *Juglans regia* contre les bactéries pathologiques buccales. *Revue internationale de dentisterie*, 2013 (1), 854765.

**Zameer, F., Rukmangada, M., Chauhan, J.B.,(2016),** Evaluation of adhesive and antiadhesive properties of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their inhibition by herbal plants, *Iran J Microbiol*, V. 8, 108–19.

**Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T. et Wang, Z. (2009).** Composés phénoliques antioxydants issus des cerneaux de noix (*Juglans regia* L.). *Chimie alimentaire*, 113 (1), 160-165.

**Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wua, T., Wang, Z. (2009).** Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem* 113, 160–165.

**Zurek, N. (2022).** Criblage phytochimique et propriétés bioactives du pollen de *Juglans regia* L. *Antioxydants*, 11(11), 2046.



## *Annexes*



Annexe 1

Instruments, Appareillages et réactifs utilisés

Tableau XVII : Matériel utilisé

Appareillage	Verrerie	Produit chimique	Milieux de culture	Autre matériel
Broyeur	Bécher	Ethanol 96%	Bouillon nutritif	Papier filtre
Etuve	Erlenmeyers	Méthanol	BHIB (Brain	Boîtes de Pétri
Balance	à Tubes	L'eau distillée	Heart Infusion	Pipettes Pasteur
Plaque chauffante	essais	L'eau physiologique	Broth)	Ecouvillons
Agitateur magnétique	Flacons	Trichlorure de fer (FeCl <sub>3</sub> )	Gélose nutritive (GN)	Barreau magnétique
Vortex	Fiole jaugée	Hydroxyle de sodium (NaOH)	Gélose au sang cuit (GSC)	Lames / lamelles
Evaporateur rotatif	Entonnoir	Acide chlorhydrique (HCL)	Gélose au sang frés (GSF)	Seringues
Poupinelle/ Autoclave	Montre en verre	NH <sub>4</sub> OH	Milieu Muller-Hinton (MH)	Spatule
Bain Marie	Eprouvette	Chloroforme	VRBL	Eppendorfs
Spectrophotomètre	Flacons en verre	KOH	Sabouraud	Pissette
Réfrigérateur		Solution d'ammoniaque	Bouillon tryptone sel eau (TSE)	Micropipettes
Frigo		Acide sulfurique H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	BGT (bouillon glucosé tamponné)	Embouts
La jarre		Ninhydrine à 0.2 %		Microplaques à 96 puits
Bec bunsen		CuSO <sub>4</sub> à 2%.		Spatule métallique
Centrifugeuse		Propanol		
Distillateur		DPPH		
Balance de précision		Dragendroff		
Microscope optique		Iode		
Centrifugeuse		Liqueur de Fehling		
pH mètre		Colorant de fushine		
		Crystal violet		
		Lugol		
		Benzoate de Sodium		
		Eau diminéralisée		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
		PBS		
		Acide ascorbique		
		α-tocophérol		
		May-Grünwald		
		Solution Giemsa		
		Huile à émersion		



**Figure 39: Solution DPPH**  
(Photo originale, 2024)



**Figure 40 : Spectromètre UV-visible**  
(Photo originale, 2024)



**Figure 41: Vitamine C**  
(Photo originale, 2024)



**Figure 42 : Bi-Orogyl**  
(Photo originale, 2024)

### ➤ Milieu de culture

Pour préparer le milieu MH au sang cuit, on commence par la liquéfaction d'un flacon de gélose MH (Muller Hinton). Ensuite, on ajoute 5 % de sang humain total pendant que la gélose est encore chaude.



**Figure 43 : Le milieu MH au sang cuit**  
(Photo originale, 2024)



**Figure 44: Le milieu MH**  
(Photo originale, 2024)

Annexe 2

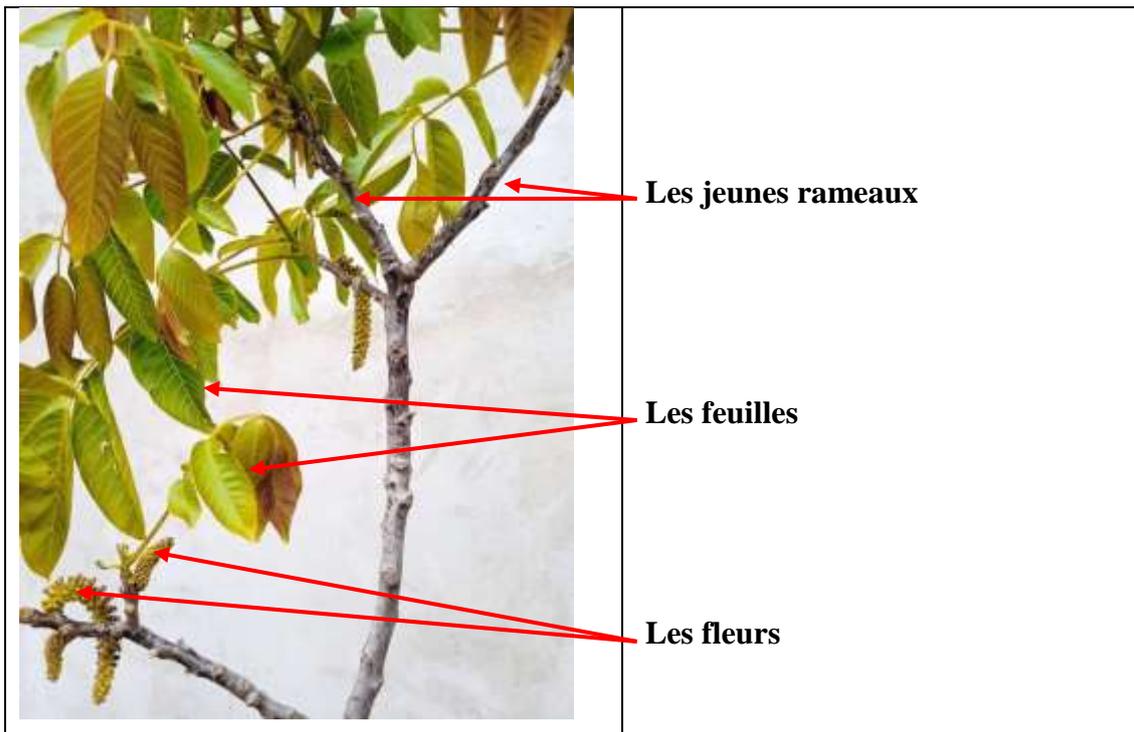


Figure 45 : Les différentes parties aériennes de la plante *Juglans regia* L.  
(Photo originale, 2024)

Annexe 3

Screening phytochimique

Tableau XVIII : Résultats des tests phytochimiques

Métabolites secondaire	Indicateur de la réaction	Observation	Résultats
Coumarine	Apparition d'un trouble		++
Tanin (catéchique)	Coloration bleu verdâtre		+++
Flavonoïdes	Incolore		++++
Saponines	Indice de mousse		++++ (4 -5 cm)
Quinones	Coloration rouge violette		+++
Anthraquinones	Coloration rouge		++++
Anthraquinones libre	Coloration rose vif		++++

## Annexes

---

**Tableau XVIII : Résultats des tests phytochimiques (suite)**

Anthraquinones combinées (O-hétéroside)	Coloration rose		-
Anthraquinones combinées (C-hétéroside)	Coloration rouge plus ou moins intense		+
Alcaloïdes	rouge		+
Terpénoïdes	brune rougeâtre		++++
Acide aminé et protéine	Coloration violette avec une teinte rougeâtre		+
Amidon	coloration bleu violet		+
Glycosides	violette		+++

**Tableau XVIII : Résultats des tests phytochimiques (suite)**

Anthocyanes (leuco-anthocyanes)	rouge		++++
Lipides	Coloration violette		-
Composé réducteurs	Apparition d'un précipité rouge brique		++++
phénols	Coloration bleue noirâtre ou verte foncée		+++
Acide organique	Coloration jaune		+++
Stéroïdes (insaturés)	Coloration rouge		++++

Annexe 4

Questionnaire



## Questionnaire sur la santé bucco-dentaire

Nom et prénom : .....

âge : .....

- |   | Oui                      | Non                      |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1- Bon état de santé général.   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2- Présence de lésion carieuse.   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3- Sous traitement d'antibiotique.  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4- Utilisation de bain de bouche au cours du dernier mois.                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5- Présence d'une maladie chronique : diabète, hypertension artérielle,...) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6- Suivi d'un traitement anticancéreux (chimiothérapie).                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7- Utilisation d'un agent chimique anti-plaque avant 6 mois.                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8- Dernier brossage (minimum 2 h).  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |



## Annexe 5

## Fiche de prélèvement

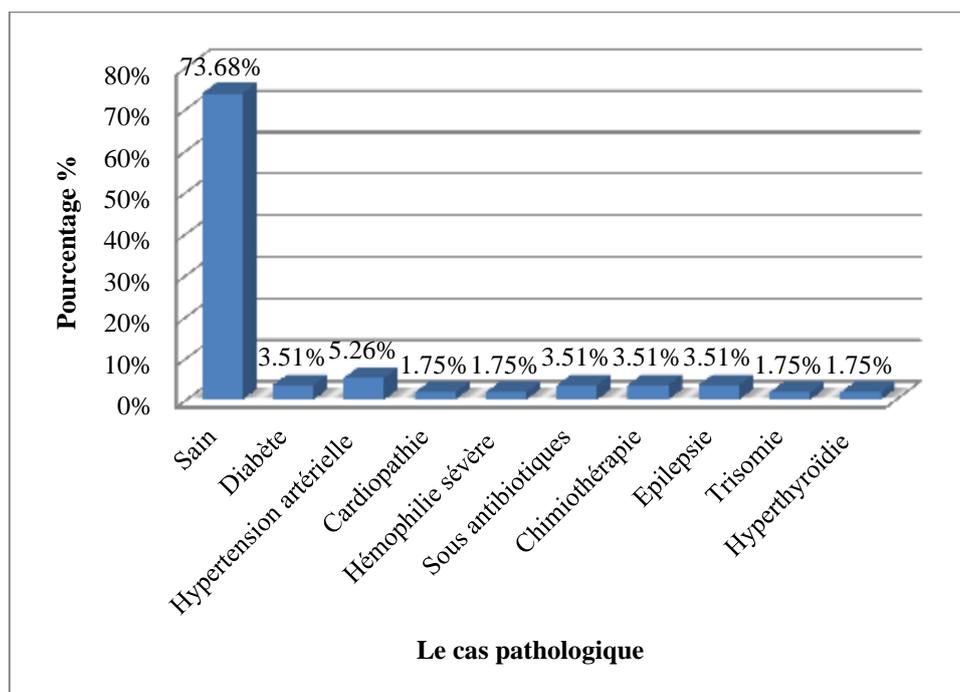
N°	Age (ans)	Sexe	site de prélèvement	Critère spéciale
01	24	H	Carie profonde	Sain
02	12	H	Carie profonde	Sain
03	45	F	Carie profonde	Saine
04	60	H	Carie profonde	Sain
05	15	F	Carie profonde	Saine
06	28	H	Carie profonde	Sous traitement d'épilepsie
07	11	F	Carie profonde	Sous chimiothérapie
08	36	H	Carie profonde	Sain
09	40	F	Carie profonde	Saine (trisomie)
10	17	H	Carie profonde	Sain
11	20	H	Carie profonde	Sain
12	45	F	Carie profonde	Saine
13	32	F	Carie profonde	Sous traitement de HTA
14	51	F	Carie profonde	Saine
15	18	F	Carie profonde	Sous traitement de l'hyperthyroïdie
16	20	F	Carie profonde	Saine
17	48	H	Carie profonde	Sain
18	25	H	Carie profonde	Sain
19	08	H	Carie profonde	Hémophile sévère
20	15	F	Carie profonde	Saine
21	12	H	Carie profonde + plaque dentaire	Sain
22	17	H	Carie profonde + plaque dentaire	Sous traitement des antibiotiques
23	31	F	Carie profond	Saine
24	34	H	Carie profonde + plaque dentaire	Sain
25	14	H	Carie profonde	Cardiopathie
26	15	F	Carie profonde	Saine
27	11	H	Carie profonde	Sain
28	70	F	Plaque dentaire	Saine
29	24	H	Carie profonde	Sous traitement de diabète
30	09	H	Carie profonde	Sain
31	35	H	Carie profonde	Sain
32	25	F	Carie profonde	Saine
33	38	H	Carie profonde	Sain
34	47	H	Carie profonde	Sain
35	23	H	Carie profonde	Sain
36	54	F	Carie profonde	Sous chimiothérapie
37	11	F	Carie profonde	Saine
38	35	F	Carie profonde + plaque	Sous traitement de HTA

## Annexes

			dentaire	
39	29	F	Carie profonde	Sous traitement des antibiotiques
40	54	H	Carie profonde + plaque dentaire	Sous traitement de HTA
41	67	H	Carie profonde	Sous traitement de HTA et diabète
42	33	F	Carie profonde	Saine
43	17	F	Carie profonde	Saine
44	31	F	Carie profonde	Saine
45	32	H	Carie profonde	Sous traitement d'épilepsie
46	16	F	Carie profonde	Saine
47	46	H	Carie profonde	Sain
48	17	F	Carie profonde	Saine
49	16	F	Carie profonde	Saine
50	26	F	Carie profonde	Saine
51	29	H	Carie profonde	Sain
52	36	F	Carie profonde	Saine
53	29	H	Carie profonde	Sain
54	47	H	Carie profonde	Sain
55	29	H	Carie profonde	Sain
56	50	F	Carie profonde	Saine
57	18	F	Carie profonde	Saine

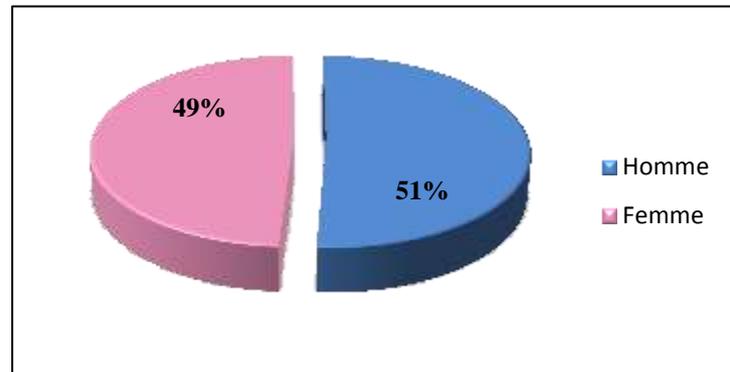
### Résultats de l'étude clinique des infections bucco-dentaires

#### ❖ Répartition selon le cas pathologique



### ❖ Répartition des patients selon le sexe

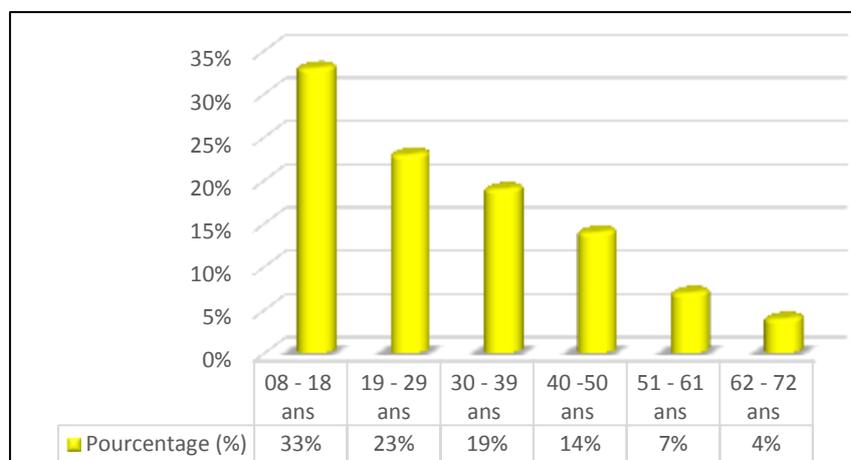
Dans la population étudiée, on constate une prédominance masculine avec un taux de 51%, soit un sex-ratio de 1.04.



**Figure 46: Répartition selon le sexe**

### ❖ Répartition des patients selon la tranche d'âge

Dans le présent travail, les infections bucco-dentaires touchent une population relativement jeune moins de 18 ans, avec un âge moyen de 29.77 ans et une médiane de 29.



**Figure 47 : Répartition selon la tranche d'âge**

Annexe 6

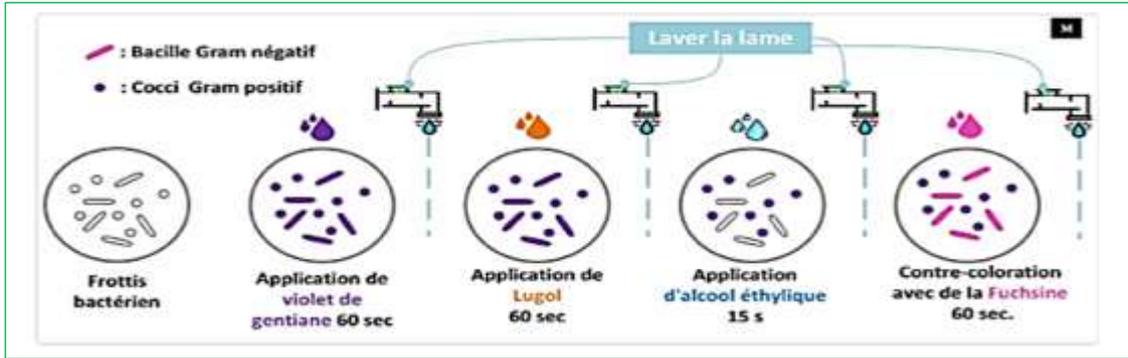


Figure 48 : Les étapes de la coloration de Gram

Résultats de la coloration de gram : observation au microscope optique (Gr ×100)

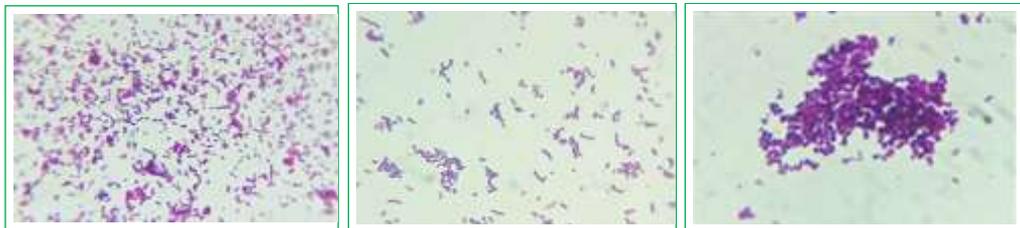


Figure 49 : *Staphylococcus aureus* : cocci en grappe de raisin, Gram positif

(Photos originales, 2024)

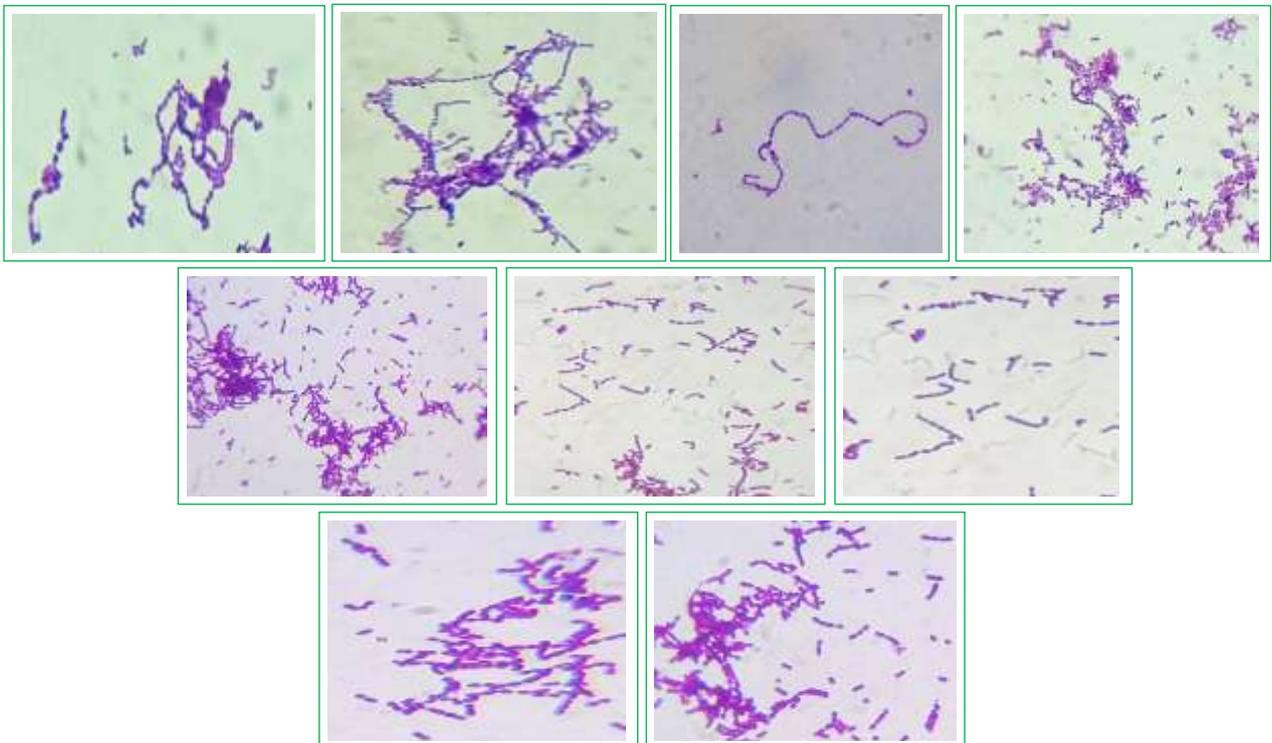


Figure 50 : *Streptococcus sp* : cocci en chaînette, Gram positif (Photos originales, 2024)

**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.

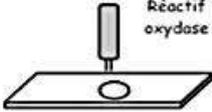
NN-diméthyl-paraphénylène diamine  
incolore

→  
oxydation

Produit coloré  
rose violacé

**3. Technique**

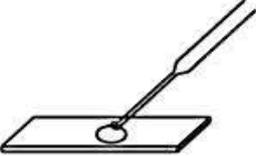
- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque



Réactif oxydase



Culture sur GO

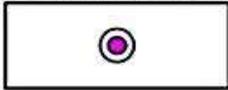
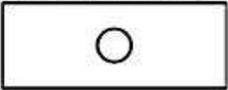


**Remarques :**

- 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 : Oxydase +	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite : 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



*Streptococcus* sp (oxydase négative) ; *Staphylococcus aureus* (oxydase positive)

**Figure 51 : Résultats de test oxydase ( Photos originales, 2024)**

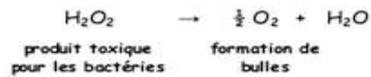
## LA CATALASE

### 1. Intérêt

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

### 2. Principe

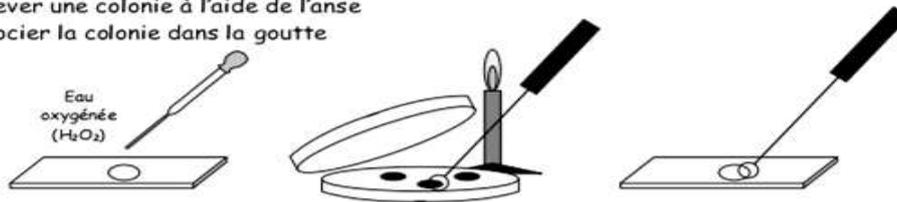
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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 +)



*Streptococcus sp* (catalase négative) ; *Staphylococcus aureus* (catalase positive)

**Figure 52 : Résultats de test catalase ( Photos originales, 2024)**

### Teste de coagulase

*Staphylococcus aureus* est connu pour produire de la coagulase, qui peut coaguler le plasma en gel dans un tube ou agglutiner des coques dans une lame. Ce test est utile pour différencier *S.aureus* des autres staphylocoques à coagulase négative. La plupart des souches de *S.aureus* produisent deux types de coagulase, la coagulase libre et la coagulase liée. Alors que la coagulase libre est une enzyme sécrétée de manière extracellulaire, la coagulase liée est une protéine associée à la paroi cellulaire. La coagulase libre est détectée dans le test de coagulase en tube et la coagulase liée est détectée dans le test de coagulase sur lame. Le test de coagulase sur lame peut être utilisé pour dépister les isolats de *S.aureus* et la coagulase en tube peut être utilisée pour la confirmation.

#### 1. Teste de coagulas sur lame

- **Principe :** La coagulase liée est également appelée facteur d'agglutination. Il réticule les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du fibrinogène dans le plasma pour former un caillot de fibrine qui se dépose sur la paroi cellulaire. En conséquence, les coques individuelles se collent les unes aux autres et une agglomération est observée.
- **Procédure :** Des suspensions denses de Staphylocoques issues de cultures sont réalisées sur les deux extrémités d'une lame de verre propre. L'un doit être étiqueté comme « test » et l'autre comme « contrôle ». La suspension de contrôle sert à exclure toute fausse positivité due à l'autoagglutination. La suspension test est traitée avec une goutte de plasma citraté et bien mélangée. L'agglutination ou l'agglutination des coques dans les 5 à 10 secondes est considérée comme positive. Certaines souches de *S.aureus* peuvent ne pas produire de coagulase liée et ces souches doivent être identifiées par un test de coagulase en tube.

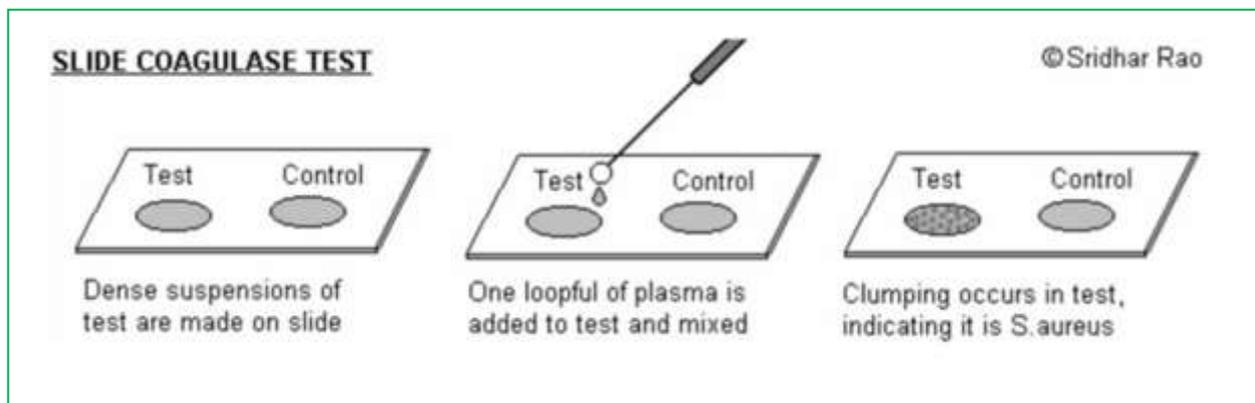


Figure 53 : Teste de coagulase sur lame

## Annexes

### 2. Teste de coagulase en tube :

- **Principe :** La coagulase libre sécrétée par *S.aureus* réagit avec le facteur de réaction de la coagulase (CRF) dans le plasma pour former un complexe qui est la thrombine. Cela convertit le fibrinogène en fibrine, entraînant la coagulation du plasma.
- **Procédure :** Trois tubes à essai sont prélevés et étiquetés « test », « contrôle négatif » et « contrôle positif ». Chaque tube est rempli de 0,5 ml de plasma de lapin dilué à 1/10. Au tube étiqueté test, 0,1 ml de bouillon de culture de bactéries testées pendant une nuit est ajouté. Au tube étiqueté contrôle positif, 0,1 ml de bouillon de culture pendant une nuit de *S.aureus* connu est ajouté et au tube étiqueté contrôle négatif, 0,1 ml de bouillon stérile est ajouté. Tous les tubes sont incubés à 37° C et observés pendant quatre heures maximum. Un résultat positif est indiqué par une gélification du plasma qui reste en place même après retournement du tube. Si le test reste négatif pendant quatre heures à 37° C, le tube est conservé à température ambiante pour une incubation d'une nuit.

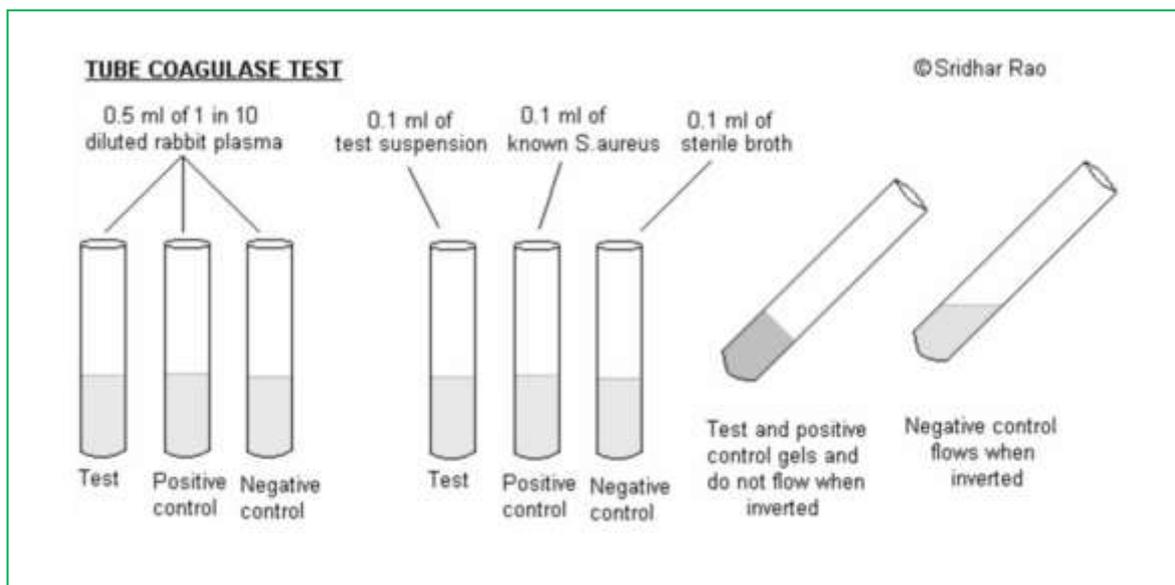


Figure 54 : Teste de coagulase en tube

### Test de blastèse

Le test de blastèse, également connu sous les noms de test de Taschdjian ou test de filamentation, est une méthode de diagnostic rapide permettant d'identifier *Candida albicans*. Ce test repose sur la capacité de *C. albicans* à produire des tubes germinatifs, des structures hyphales allongées, lorsqu'il est incubé dans du sérum à 37°C. Un résultat positif au test se caractérise par la formation d'un tube germinatif au moins trois fois plus long que le diamètre de la cellule de levure normale après 3 heures d'incubation.

#### Étapes du test de blastèse

1. Préparation du milieu : Un bouillon blastèse (sérum) est préparé et ensemencé à partir d'une colonie suspecte de *Candida albicans*.
2. Incubation : Le milieu est incubé pendant 3 heures à 37°C.
3. Observation : Après l'incubation, un montage d'état frais est réalisé pour observer les tubes germinatifs caractéristiques de *Candida albicans*.

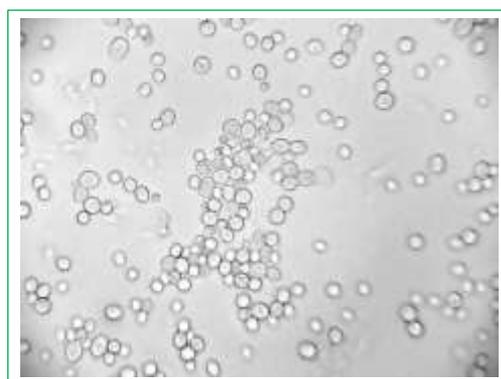
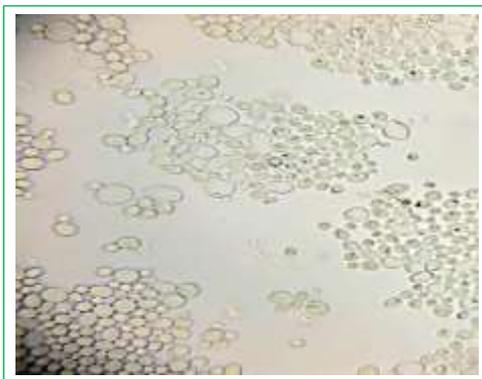


Figure 55 : *Candida sp* x40 (Photos originales, 2024)

### ❖ Confection du frottis sanguins

La réalisation manuelle d'un frottis sanguin a été faite en plusieurs étapes :

- Une goutte de sang a été déposée à 1 cm de l'extrémité de la lame,
- Une seconde lame à étalement inclinée de 45° a été glissée vers la goutte de sang jusqu'à la toucher,
- La goutte du sang a été laissé étaler le long de l'arête de la lame à étalement,
- Faire 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.

Annexe 7

Rendement d'extraction

	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>eme</sup> essai	Rendement (%)	Ecart-type
Extrait éthanolique des écorces de <i>Juglans regia</i> L	12,71 %	12,47 %	12,59 %	0,00169706

Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de bain de bouche

Tableau XIX : L'écart type des résultats de test d'aromatogramme

Souches utilisés	Bain de bouche des écorces des rameaux de <i>Juglans regia</i> L.			
	(1 <sup>er</sup> essai) Diamètres (mm)	(2 <sup>eme</sup> essai) Diamètres (mm)	Moyenne	Ecart-type
<i>Streptococcus sp 01</i>	15	20	17.5	3,53553391
<i>Streptococcus sp 02</i>	00	08	04	5,65685425
<i>Streptococcus sp 03</i>	12	11	11.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 04</i>	10	12	11	1,41421356
<i>Streptococcus sp 05</i>	09	08	08.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 06</i>	18	15	16.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 07</i>	22	21	21.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 08</i>	38	40	39	1,41421356
<i>Streptococcus sp 09</i>	18	10	14	5,65685425
<i>Streptococcus sp 10</i>	11	14	12.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 11</i>	11	12	11.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 12</i>	09	08	08.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 13</i>	11	10	10.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 14</i>	16	20	18	2,82842712
<i>Streptococcus sp 15</i>	20	19	19.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp16</i>	20	28	24	5,65685425
<i>Streptococcus sp 17</i>	10	07	08.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 18</i>	23	20	21.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 19</i>	14	13	13.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 20</i>	30	15	22.5	10,6066017
<i>Streptococcus sp21</i>	12	14	13	1,41421356
<i>Streptococcus sp 22</i>	20	26	23	4,24264069

## Annexes

---

**Tableau XIX : L'écart type des résultats de test d'aromatogramme (suite)**

<i>Streptococcus sp 23</i>	20	20	20	0
<i>Streptococcus sp 24</i>	22	19	20.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 25</i>	04	04	04	0
<i>Streptococcus sp 26</i>	20	15	17.5	3,53553391
<i>Streptococcus sp 27</i>	11	13	12	1,41421356
<i>Streptococcus sp 28</i>	20	10	15	7,07106781
<i>Streptococcus sp 29</i>	10	11	10.5	0,70710678
<i>Streptococcus sp 30</i>	15	12	13.5	2,12132034
<i>Streptococcus sp 31</i>	08	10	09	1,41421356
<i>Streptococcus sp 32</i>	12	12	12	0
<i>Streptococcus sp 33</i>	15	13	14	1,41421356
<i>Streptococcus sp 34</i>	10	08	09	1,41421356
<i>Streptococcus sp 35</i>	20	14	17	4,24264069
<i>Streptococcus sp 36</i>	09	09	09	0
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	09	08	08.5	0,70710678
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	09	05	07	2,82842712
<i>Staphylococcus aureus 3</i>	09	09	09	0
<i>Staphylococcus aureus 4</i>	12	12	12	0
<i>Staphylococcus aureus 5</i>	14	17	15.5	2,12132034
<i>Staphylococcus aureus 6</i>	13	11	12	1,41421356
<i>Candida sp 1</i>	00	00	00	0
<i>Candida sp 2</i>	09	08	08.5	0,70710678
<i>Candida sp 3</i>	09	00	04.5	6,36396103
<i>Candida sp 4</i>	08	08	08	0
<i>Candida sp 5</i>	11	14	12.5	2,12132034
<i>Candida sp 6</i>	13	15	14	1,41421356
<i>Candida sp 7</i>	09	09	09	0
<i>Candida sp 8</i>	00	00	00	0

Annexe 8

Résultat des CMI/CMB

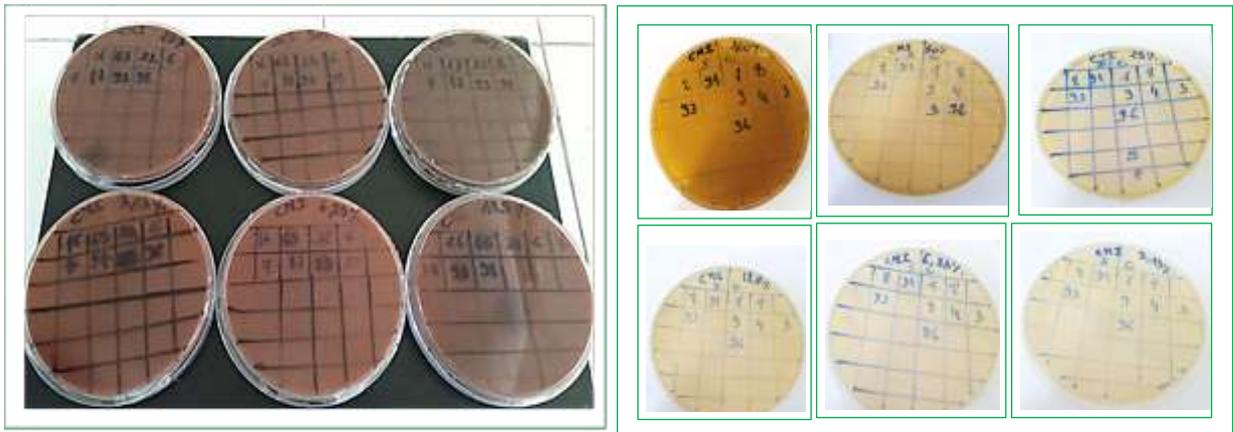


Figure 56 : Résultats des CMI pour les *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Photos originales, 2024)

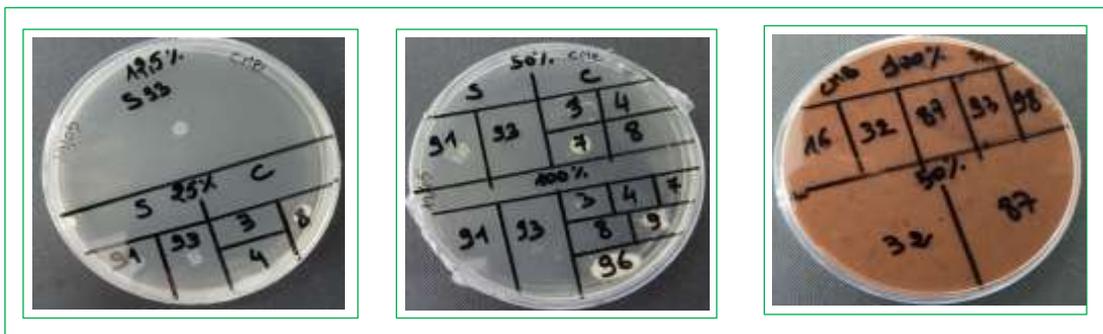


Figure 57 : Résultat des CMB pour les *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Photos originales, 2024)

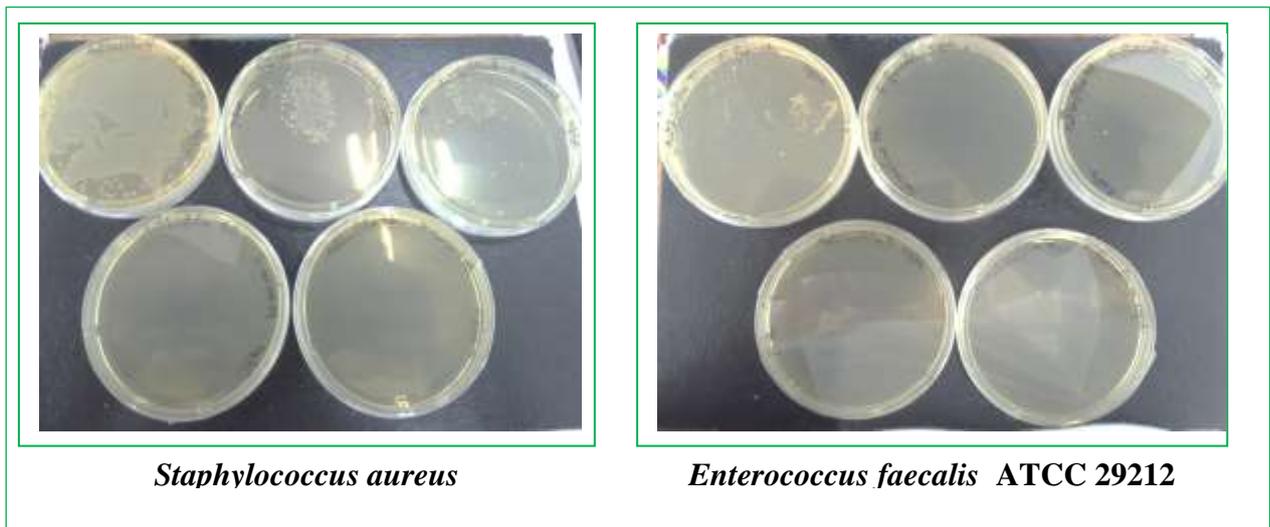


Figure 58 : Résultats de test antibiofilm *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* (Photos originales, 2024)

Tableau XX : Résultats du test de DPPH (les densités optiques)

Concentration [mg/ml]	DO de l'extrait de <i>Juglans regia</i>		DO de la vitamine E		DO de la vitamine C
	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>eme</sup> essai	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>eme</sup> essai	Essai
10	0.087	0.182	0.140	0.140	0.303
20	0.080	0.181	0.110	0.110	0.172
40	0.067	0.132	0.100	0.100	0.085
60	0.063	0.115	0.098	0.075	0.084
80	0.053	0.110	0.075	0.067	0.081
100	0.047	0.071	0.067	0.065	0.079

Annexe 9

Etude statistique

Analyse de variance ANOVA: un facteur

**1. Comparaison de l'effet antibactérienne de l'extrait éthanologique des écorces des jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'amoxicilline sur les ATCC**

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérienne de l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'amoxicilline sur les ATCC.
- H1 : y'a une différence significative entre l'effet antibactérienne de l'extrait éthanologique des écorce de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'amoxicilline sur les ATCC.

RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
Diamètre d'inhibition d'extrait	10	300	30	61,7777778
Diamètre d'inhibition d'AMX	10	177	17,7	203,344444

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	756,45	1	756,45	5,70642471	0,02806346	4,4138734
A l'intérieur des groupes	2386,1	18	132,561111			
Total	3142,55	19				

La probabilité = 0.028 < à 0.05, H0 est rejetée et H1 est retenu, donc y'a une différence significative entre l'effet antibactérienne de l'extrait éthanologique des écorce de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'amoxicilline sur les ATCC.

## Annexes

### 2. Comparaison de l'effet antibactérienne du bain de bouche et le Bi-Orogyl sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérienne du bain de bouche et le Bi-Orogyl sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires.
- H1 : y'a une différence significative entre l'effet antibactérienne du bain de bouche et le Bi-Orogyl sur des bactéries d'origine des prélèvements dentaires.

#### RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
Diamètre d'inhibition de bain de bouche	50	653,5	13,07	45,4388776
Diamètre d'inhibition de Bi-orogyl	50	1214	24,28	218,246531

#### ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3141,6025	1	3141,6025	23,8284137	4,0888E-06	3,93811088
A l'intérieur des groupes	12920,585	98	131,842704			
Total	16062,1875	99				

La probabilité = 4.088 > à 0.05 H0 est fortement retenu, donc le bain de bouche possède une activité antibactérienne semblable à celle de Bi-Orogyl.

### 3. Comparaison de l'effet antibactérienne du bain de bouche et l'Amoxicilline sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'effet antibactérienne du bain de bouche et l'Amoxicilline sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires.
- H1 : y'a une différence significative entre l'effet antibactérienne du bain de bouche et l'Amoxicilline sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires.

#### RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
Diamètre d'inhibition de bain de bouche	50	653,5	13,07	45,4388776
Diamètre d'inhibition d'AMX	30	506	16,8666667	147,843678

## Annexes

### ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	270,275208	1	270,275208	3,23634602	0,07588908	3,96347192
A l'intérieur des groupes	6513,97167	78	83,5124573			
Total	6784,24688	79				

La probabilité = 0.087 > à 0.05 H0 est retenu, donc le bain de bouche possède une activité antibactérienne semblable à celle de l'Amoxicilline sur les bactéries d'origine des prélèvements dentaires.

#### 4. Comparaison de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'alpha tocophérol

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'activité anti oxydante de l'extrait éthanolique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'alpha tocophérol.
- H0 : y'a une différence significative entre l'activité anti oxydante de l'extrait éthanolique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et le  $\alpha$ -tocophérol.

### RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
pourcentage d'inhibition d'extrait de <i>Juglans regia</i> L,	6	1,8765	0,31275	0,04107226
pourcentage d'inhibition de la VIT E	6	2,199	0,3665	0,02225789

### ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	0,00866719	1	0,00866719	0,27371439	0,61224617	4,9646027
A l'intérieur des groupes	0,31665078	10	0,03166508			
Total	0,32531796	11				

## Annexes

---

La probabilité= 0.612 > à 0.05 H0 est retenu, donc l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. possède une activité antioxydante semblable à celle de l'alpha tocophérol.

### 5. Comparaison de l'activité antioxydante de l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'acide ascorbique

- H0 : il n'y a pas de différence significative entre l'activité antioxydante de l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'acide ascorbique.
- H0 : y'a une différence significative entre l'activité antioxydante de l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. et l'acide ascorbique.

### RAPPORT DÉTAILLÉ

---

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
pourcentage d'inhibition d'extrait de <i>Juglans regia</i> L,	6	1,8765	0,31275	0,04107226
pourcentage d'inhibition de la VIT C	4	1,7153	0,428825	0,00036589

### ANALYSE DE VARIANCE

---

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,03233617	1	0,03233617	1,252982	0,29546336	5,31765506
A l'intérieur des groupes	0,20645898	8	0,02580737			
Total	0,23879516	9				

La probabilité= 0.295 > à 0.05 H0 est retenu, donc l'extrait éthanologique des écorces de jeunes rameaux de *Juglans regia* L. possède une activité antioxydante semblable a celle de l'acide ascorbique.