



Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

Laboratoire : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

TAROQ Amal

Etude du potentiel antibactérien et antioxydant *in vitro* et exploration des effets pharmacologiques *in vivo* du *Laurus nobilis* L. et *Syzygium aromaticum* L.

Soutenue le 24/10/ 2020 devant le jury composé de :

Pr. Badiaa Lyoussi	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	Président
Pr. Abdelhak Belhaj	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteur
Pr. Younes Filali-Zegzouti	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteur
Pr. Abdelkader Gourch	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	Rapporteur
Pr. Mohammed Benyahya	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	Examineur
Pr. Mourad Errasfa	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Fès	Examineur
Pr. Abdelfattah Abdellaoui	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	Directeur de thèse

Dédicace

A mes chers parents Ali et Hannou

En témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur amour, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études. Que dieu leurs procure bonne santé et longue vie.

A mes chers frères et sœurs Mohamed, Mustapha, Hassan, Rachida, Khalid et Fatima.

A ma fille Alae, qui me fait oublier tous mes soucis avec leur douce parole et leur charmant sourire enfantin. Merci pour le bonheur que tu m'apporter.

A mon beau-frère Saïd et mes belles sœurs qui m'ont beaucoup soutenue et encouragé pendant toute la période d'étude.

A mes nièces et neveux

A mes chères amis Fatima, Yassine, Imane, Meryem, Soukaina Youssef, Hassan et Driss.

A toute la famille Taroq

A tous mes autres ami(e)s

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Remerciement

C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse, et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Cette thèse n'aurait été possible sans l'intervention de nombreuses personnes. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs précieux conseils.

*En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse le Professeur **ABDELLAOUI Abdelfattah** pour l'accueil qu'il m'a accordé dans son laboratoire, pour sa disponibilité, ses conseils, son suivi tout au long de mes années de recherche, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et sa confiance tout au long de la préparation de ce travail. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements s'adressent à Madame le professeur **Badiaa Lyoussi**, directrice du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnemental, pour ses encouragements et son soutien. Je tiens à remercier Madame le Professeur **Badiaa Lyoussi**, pour l'honneur et le plaisir qu'il me fait en acceptant la présidence du jury de ma thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.*

*Je remercie infiniment les professeurs **Abdelhak Belhaj**, **Younes Filali-Zegzouti** et **Abdelkader Gourch** d'avoir accepté d'être les*

rapporteurs de cette thèse Je leurs suis particulièrement reconnaissante de m'avoir accompagné dans cette dernière étape de travail.

*Mes vifs remerciements s'adressent également aux examinateurs de cette thèse : Monsieur le Professeur **Mourad Errasfa** et Monsieur le Professeur **Mohammed Benyahya** pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.*

*Je ne saurais oublier le soutien et les encouragements de mes collègues du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnementale : **Fatima El kamari**, **Yassine Elatki**, **Meryem Bakour**, **Imane Aouam**. Je vous remercie pour votre esprit d'équipe, votre soutien pendant les moments difficiles de ce travail, et Je vous souhaite tous une bonne continuation.*

Enfin, mes remerciements iront à tous les personnes dont l'empreinte restera dans ce travail plus encore dans ma mémoire, pour leurs conseils scientifiques, leurs aides, leurs talents, leurs motivations, ...

Listes des publications

1. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine El atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of *laurus nobilis* from Morocco. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research 2018 ;11(12) :540-543.
2. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine El atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. phytochemical screening, polyphenols content and a novel source of antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *laurus nobilis* from morocco. International journal of pharmaceutical sciences and research 2019 ; 10(8) : 3770-3776.
3. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Bouchra Oumokhtar, Imane Aouam, Yassine El atki Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical Screening of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2018 ;48(1) : 58-61.
4. **Amal Taroq**, Meryem Bakour, Yassine EL atki, Fatima El kamari, Imane Aouam, Fatima Zahra Talbi, Nawal Hammas, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Comparative study of the effects of *Laurus nobilis* and *Syzygium aromaticum* aqueous extracts on urine volume and renal fonction in rat. International journal of pharmaceutical sciences and research 2020. Acceptée.
5. Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Yassine El atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. chemical composition of essential oils from *vitex agnus-castus* L. growing in morocco and it's *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research 2018 ; 11(10) : 365-368.
6. Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Yassine El atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. *Cymbopogon Nardus* L. Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2018 ; 50(1) : 14-17.
7. Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Yassine El atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenols content, flavonoid concentration and antioxidant

- activities of leaves extracts of *vitex agnus-castus* L. growing wild in morocco 2019 ;10(4): 1670-1676.
8. Imane Aouam, Yassine El atki, **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco. Journal of pharmaceutical sciences and research 2018 ;10(11) :2689-2692.
 9. Imane Aouam, Yassine El atki, Mustapha Taleb, **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum*. Materials Today: Proceedings 2019 ;579-586.
 10. Imane Aouam, Yassine El atki, **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of two moroccan *thymus* essential oils. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research 2019 ;12(1) : 447-451.
 11. Imane Aouam, Yassine El atki, **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Bouchra Oumokhtar, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Thymus citriodorus* L. Growing Wild in Morocco: Preventive Approach against Nosocomial Infections. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2019 51(1) : 72-75.
 12. Yassine El atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Kaotar Nayme, Mohammed Timinouni, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research 2019 ; 10(2) : 63-7.
 13. Yassine El atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Badiia Lyoussi, Bouchra Oumokhtar, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. Arabian Journal of Chemistry 2019.
 14. Yassine El atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, **Amal Taroq** Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. antioxidant activity of two wild *teucrium* species from Morocco. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2019 ; 10(6) : 2723-2729.
 15. Yassine El atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, **Amal Taroq** Badiia Lyoussi, Mustapha Taleb, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. Materials Today : Proceedings 2019 : 777-783.

16. Yassine El atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, **Amal Taroq**, Abdelkader Gouch, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. Journal of pharmaceutical sciences and research 2019.
17. Meyrem Bakour, Najoua Soulo, Nawal Hammas, Hinde El Fatmi, Abderrazak Aboulghazi, **Amal Taroq**, Abdelfattah Abdellaoui, Nouri Al-Waili, Badiaa Lyoussi. The antioxydant content and protective effect of Argan and Syzygium aromaticum essential oil in hydrogène peroxide induced biochemical and histological changes. International journal of Molecular Sciences 2018 ; 19,610.
18. Fatima Zahra Tabli, Fatiha El Kayyat, Hajar El Omari, Saâd Fadil, **Amal Taroq**, Abdellatif Janati Idrissi, Abdelhakim El Ouali Lalami. Cartography and Epidemiological study of Leishmaniasis disease in Sefrou province (2007-2010), central north of Morocco. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases 2020.

Listes des communications affichées

1. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2019). Antioxidant activities, total phenolic and flavonoids content variation of buds extract of *Syzygium aromaticum* L. International colloquium: valorisation of natural and synthetic biomolecules in novel drug-vector nanostructures Fez, Morocco, 15-16 April 2019.
2. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia mesatlantica* de la région d'Ifrane. 1^{ère} journée Scientifique dédiée aux doctorants, Biotechnologie, Ecologie et Valorisation des Phyto-ressources, Faculté des sciences Dhar El Mahraz de Fés, Maroc 25 Décembre 2017.
3. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Composition chimique, activité antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc. 1^{ère} journée Scientifique dédiée aux doctorants, Biotechnologie, Ecologie et Valorisation des Phyto-ressources, Faculté des sciences Dhar El Mahraz de Fés, Maroc 25 Décembre 2017.
4. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Antioxidant activities and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of *Laurus nobilis* from Morocco. TRAMECH IX, Fés, Maroc 22-25 November 2017.
5. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Phytochemical Screening of the essential oils of *Laurus nobilis*.L and *Illicium verum*.L against pathogenic resistant bacteria. 1^{er} congrès Arabe des plantes médicinales et aromatiques, Faculté des sciences et techniques Fés, Maroc 18 et 19 October 2017.
6. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Screening phytochimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *rosmarinus officinalis*. 1^{ère} édition du Symposium international sur les effets bénéfiques de l'huile d'Argan sur la santé humaine, Faculté des sciences et technique d'Errachidia, Maroc 04-06 Mai 2017.

7. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Activités antioxydantes et variations en teneur du polyphénol et flavonoides totaux de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.L. 1^{ère} édition du Symposium international sur les effets bénéfiques de l'huile d'Argan sur la santé humaine, Faculté des sciences et technique d'Errachidia, Maroc 04-06 Mai 2017.
8. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Phytochemistry of the essential oil of *Illicium verum* : Preventive approach against the pathogenic bacteria. La deuxième édition du congrès international des sciences pharmaceutiques (CISPharm 2017), faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, Maroc 17-18 Février 2017.
9. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Imane Aouam, Yassine EL atki, Badiiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2016). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* : rôle dans la conservation alimentaire. 1^{ère} édition du congrès national innovation et management de la qualité des aliments « CNIMQA », faculté des sciences Dhar El Mahraz, Fés, Maroc 28 et 29 Décembre 2016.
10. **Amal Taroq**, Soumaya Zizi Badiiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2014). Identification et effet diurétique du miel de *Ziziphus Lotus*. International conference Api-phytotherapy « Api-research for sustainable development » palais des congrès Fés, Maroc 20-22 Mai 2014.

Listes des communications orales

1. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2016). Phytochemistry of the essential oil of *Illicium verum*: preventive approach against the pathogenic bacteria. La 5^{ème} édition internationale des journées jeunes chercheurs de chimie thérapeutique 2016 : Place de la phytothérapie et la chimie médicinale dans le processus de « DRUG DISCOVERY » (PPCMPDD 2016, faculté polydisciplinaire de Taza, Maroc 28 et 29 Novembre 2016).
2. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2016). Phytochimie et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* du nord du Maroc. Colloque international sous thème substances naturelles stress et métabolismes cellulaires, Faculté des sciences et techniques Settat, Maroc 15 et 16 Décembre 2016.
3. **Amal Taroq**, Fatima El kamari, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui (2017). Activités antioxydantes, et variations de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes de trois extraits des feuilles du *Laurus nobilis* du Maroc. La deuxième édition du congrès international des sciences pharmaceutiques (CISPharm 2017), faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, Maroc 17-18 Février 2017.

Liste des tableaux

Tableau 1 : taxonomie du <i>Syzygium aromaticum</i>	77
Tableau 2: Les isolats cliniques utilisés dans les tests antimicrobiens.....	81
Tableau 3 : composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L. ...	100
Tableau 4 : composition chimique de l'huile essentielle du <i>Syzygium aromaticum</i> L.....	101
Tableau 5 : Diamètres d'inhibitions des antibiotiques et des huiles essentielles de laurier et du clou de girofle.....	102
Tableau 6: CMI et CMB des huiles essentielles de <i>Laurus nobilis</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	104
Tableau 7 : teneur en polyphenols, flavonoides et activité antioxydante totale des huiles essentielles du <i>Laurus nobilis</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	106
Tableau 8 : IC ₅₀ du DPPH des huiles essentielles <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Laurus nobilis</i> comparée au BHT.....	108
Tableau 9 : IC ₅₀ du pouvoir réducteur des huiles essentielles.....	109
Tableau 10 : rendement des extraits de <i>Syzygium aromaticum</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	109
Tableau 11 : les valeurs des IC ₅₀ pour les différents extraits exprimés en moyenne \pm SD (n = 3).....	113
Tableau 12 : les valeurs des IC ₅₀ pour les différents extraits exprimées en moyenne \pm SD (n = 3).....	114
Tableau 13 : rendements des extraits de <i>Laurus nobilis</i> et de <i>Syzygium aromaticum</i>	115
Tableau 14 : Les valeurs des IC ₅₀ des différents extraits de <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Laurus nobilis</i> par méthode de soxhlet. IC ₅₀ BHT = 0.10mg/ml	119

<i>Tableau 15 : les valeurs de IC₅₀ pour les différents extraits par le test de FRAP par la méthode de soxhlet. IC₅₀ BHT = 0.12mg / ml</i>	120
<i>Tableau 16 : Effet du Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et furosemide sur le volume urinaire (ml / 24 h) chez les rats normaux durant neuf jours.</i>	126
<i>Tableau 17 : Effet du Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et furosémide sur le niveau d'électrolytes urinaire chez les rats wistars normaux après neuf jours de traitement.....</i>	127
<i>Tableau 18 : Effet de Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et furosémide sur les taux d'électrolytes sériques chez les rats normaux après neuf jours de traitement.....</i>	128
<i>Tableau 19 : Effect du Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et furosemide sur les taux d'urée sanguine, Creatinine, Albumin, et filtration glomerulaire chez les rats normaux après neuf jours de traitement.....</i>	129
<i>Tableau 20 : Effet de Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et du furosémide sur l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique, la clairance osmolaire, la clairance et la réabsorption de l'eau libre chez les rats normaux après neufs jours de traitement.....</i>	130
<i>Tableau 21 : Effet du Syzygium aromaticum, Laurus nobilis et furosemide sur inhibition de l'anhydrase carbonique, et sur les activités salurétique et natriurétique chez les rats normaux après neuf jours du traitement.</i>	131
<i>Tableau 22 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine, et albumine chez les rats wistar.</i>	137
<i>Tableau 23 : Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait de laurus nobilis sur les taux sériques de la créatinine ; l'urée, la protéine, et l'albumine chez les rats wistar.</i>	142

Liste des figures

<i>Figure 1: structure chimique de quelques monoterpènes</i>	<i>41</i>
<i>Figure 2 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane</i>	<i>42</i>
<i>Figure 3 : sites de production des radicaux libres.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 4 : génération extracellulaire des radicaux libres</i>	<i>51</i>
<i>Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action protéique de l'acide hypochloreux, proche de celui du peroxyde d'hydrogène (Winter et al., 2008).....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 6 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH· entre l'espèce radicalaire DPPH· et un antioxydant (AH) (Molyneux ; 2004).....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 7: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2014)</i>	<i>59</i>
<i>Figure 8 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques</i>	<i>66</i>
<i>Figure 9 : Anatomie du parenchyme rénal</i>	<i>68</i>
<i>Figure 10 : les feuilles du Laurus nobilis L</i>	<i>73</i>
<i>Figure 11: Aspect morphologique de Laurus nobilis (Beloued, 2005).....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 12 : Feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons floraux</i>	<i>77</i>
<i>Figure 13 : Montage expérimental d'hydrodistillation.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 14 : montage expérimental de l'appareil soxhlet.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 15 : Principe de la chromatographie en phase gazeuse (Tranchant, 2004)</i>	<i>86</i>
<i>Figure 16 : Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (photo prise à la Cité d'innovation Fès)</i>	<i>87</i>

<i>Figure 17 : activité anti-radicalaire de l'huile essentielle du Syzygium aromaticum</i>	107
<i>Figure 18 : activité antiradicalaire de l'huile essentielle du Laurus nobilis</i>	107
<i>Figure 19 : activité antioxydante de l'huile essentielle du Syzygium aromaticum par méthode de FRAP</i>	108
<i>Figure 20 : activité antioxydante de l'huile essentielle du Laurus nobilis par méthode de FRAP</i>	109
<i>Figure 21 : teneur en polyphénols dans les différents extraits des bourgeons de Syzygium aromaticum L. et des feuilles de Laurus nobilis L.</i>	110
<i>Figure 22 : teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de Syzygium aromaticum L et des feuilles de Laurus nobilis L.</i>	111
<i>Figure 23 : teneur en flavone et flavonol dans différents extraits de Syzygium aromaticum et des feuilles de Laurus nobilis</i>	112
<i>Figure 24 : teneur en activité antioxydante totale dans les différents extraits de Syzygium aromaticum et des feuilles de Laurus nobilis</i>	113
<i>Figure 25 : teneur en polyphenols dans les différents extraits de Syzygium aromaticum et des feuilles de Laurus nobilis par méthode de soxhlet.</i>	116
<i>Figure 26 : teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de Syzygium aromaticum et des feuilles de Laurus nobilis par méthode de soxhlet</i>	117
<i>Figure 27 : teneur en flavone et flavonol dans différents extraits de Syzygium aromaticum et des feuilles de Laurus nobilis par méthode de soxhlet</i>	118
<i>Figure 28 : activité antioxydante totale des extraits de Laurus nobilis et Syzygium aromaticum par méthode de soxhlet</i>	119
<i>Figure 29 : Examen histologique du tissu rénal ; (a) : groupe eau distillée : tissu normal ×100 ; (b) : groupe Syzygium aromaticum : tissu normal ×100 ; groupe Laurus nobilis: tissu normal ×100; (d): groupe furosemide: tissu normal ×100.</i>	132

<i>Figure 30 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur les enzymes hépatiques chez les rats wistar.</i>	135
<i>Figure 31 : Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur le profile lipidique chez le rat wistar</i>	136
<i>Figure 32 : analyse histologique du foie chez les rats Wistar stressés et les non- stressés...</i>	138
<i>Figure 33 : analyse histologique des reins chez les rats Wistar stressés et les non- stressés</i>	139
<i>Figure 34 : Effet du peroxyde d'hydrogène l'extrait de laurus nobilis sur les enzymes hépatiques.....</i>	140
<i>Figure 35 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait de laurus nobilis sur le profile lipidique chez les rats wistar.</i>	141
<i>Figure 36 : coupes histologiques du foie des rats Wistar stressés et non stressés</i>	143
<i>Figure 37 : coupes histologiques des reins des rats Wistar stressés et non stressés</i>	144
<i>Figure 38 : Gamme d'étalonnage d'acide gallique</i>	174
<i>Figure 39 : Gamme d'étalonnage d'acide ascorbique</i>	174
<i>Figure 40 : Gamme d'étalonnage de la Quercétine pour dosage des flavones et flavonols..</i>	175
<i>Figure 41 : Gamme d'étalonnage du Rutin pour dosage des flavonoïdes totaux</i>	175

Résumé

La présente thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles végétales notamment de deux plantes très utilisées dans la pharmacopée traditionnelle marocaine : *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis*.

Ce travail a pour objectif de déterminer la composition chimique et les activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* extraites par hydrodistillation. Il a également pour but d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits non volatiles des deux plantes et d'explorer les extraits aqueux pour des études *in vivo*, chez le rat wistar à fin d'évaluer leurs effets diurétiques et anti-stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène.

Les résultats du criblage phytochimique par CG/SM des huiles ont montré que le 1,8-cinéole (26.76 %), 1- α -pinène (8.63 %), linalool (7.78 %), 2-carène (7.81 %), α -terpineol (6.94 %) et eugenyl methylether (6.63 %) sont les composés majoritaires de l'huile essentielle du *Laurus nobilis*, alors que celle du *Syzygium aromaticum* est dominée par l'eugenol (87.03 %).

Concernant l'activité antibactérienne, toutes les souches bactériennes testées ont été sensibles aux deux huiles essentielles. Les diamètres d'inhibition allant de 13.75 \pm 0.4 à 20 \pm 0.4 mm pour *Syzygium aromaticum* et de 13.3 \pm 0.4 à 26.6 \pm 0.4 mm pour *Laurus nobilis*. L'étude de l'activité antioxydante des deux huiles essentielles a montré un pouvoir antioxydant très fort comparé au témoin (BHT).

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux, éthanolique, méthanolique et acétate d'éthyle des deux plantes par différents tests montre que ces extraits possèdent effectivement un potentiel antioxydant remarquable.

L'exploration *in vivo* de l'effet diurétique des extraits aqueux des deux plantes, chez le rat wistar, montre un effet protecteur contre l'hépto-néphrotoxicité induite par H₂O₂. En effet, les résultats de cette étude expérimentale ont montré que les extraits aqueux des deux plantes ont augmenté le débit urinaire, ainsi ils ont protégé les rats contre les dommages de stress oxydatif induit par H₂O₂.

Mots-clés : Huile essentielle, stress oxydant, antioxydant, *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis*, effet protecteur, effet diurétique.

Abstract

The present thesis is part of the development of natural plant resources mainly two plants widely used in the traditional Moroccan pharmacopoeia : *Syzygium aromaticum* and *Laurus nobilis*.

The aim of this work is to determine the chemical composition and the antibacterial and antioxidant activities of the essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Laurus nobilis* extracted by hydro-distillation. Furthermore, an evaluation of the antioxidant activity of non-volatile extracts of the two plants will be performed and their aqueous extracts will be explored *in vivo* using Wistar rat in order to evaluate their diuretic and anti-oxidative stress effects. The oxidative stress is induced by hydrogen peroxide.

The results of the phytochemical screening by CG/MS of the essential oils showed that 1,8-cineole (26.76%), 1- α -pinene (8.63%), linalool (7.78%), 2-carene (7.81%), α -terpineol (6.94%) and eugenyl methylether (6.63%) are the main compounds of *Laurus nobilis*, while that of *Syzygium aromaticum* is dominated by eugenol (87.03%).

Regarding antibacterial activity, all the bacterial strains tested were sensitive to the two essential oils. The inhibition diameters ranged from 13.75 ± 0.4 and 20 ± 0.4 mm for *Syzygium aromaticum* and from 13.3 ± 0.4 to 26.6 ± 0.4 mm for *Laurus nobilis*. The study of the antioxidant activity of the two essential oils showed a very strong antioxidant activity in comparison to the control (BHT).

The evaluation of the antioxidant activity of different extraction, namely the aqueous, ethanolic, methanolic and ethyl acetate extracts of the two plants by different tests showed that they have remarkable antioxidant potentials.

In vivo exploration of the diuretic effect of the aqueous extracts of the two plants, using Wistar rats' model, showed a protective effect against hepato-nephrotoxicity induced by H₂O₂. Indeed, the results of this experiment demonstrated that the aqueous extracts of the two plants increased the urine flow, hence they protected the rats against the damage of oxidative stress induced by H₂O₂.

Keywords : Essential oil,, oxidative stress, antioxidant, *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis*, protective effect, diuretic effect.

Listes des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association française de normalisation

AGPI : Acide gras polyinsaturés

ABTS : 2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid

AAT : Activité antioxydante totale

ALT : Alanine aminotransférase

AST : Aspartate aminotransférase

Ac : Acide

As : Ascorbique

ATP : Acide triphosphate

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CO₂ : Dioxyde de carbon

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

Cl : Chlore

CHU : Centre hospitalière universitaire

CTX : Cefotaxime

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

Cosm : Clairance osmotique

CH₂O : Clairance de l'eau

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrozyl

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ERO : Espèce réactive d'oxygène

E.coli : Escherichia coli

Ext : Externe

Eq : Equivalent

ERN : Espèce réactive de l'azote
FRAP: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
Fe: Fer
GPx: Glutathion peroxidase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HOCl : Acide hypochloreux
HE : Huile essentielle
IC₅₀ : Concentration inhibant 50% de l'activité
IN : Infection nosocomial
Int : Interne
K⁺ : Potassium
K : Kanamycine
LDL : Lipoprotéine de haute densité
LDH : Lactate déshydrogénase
LN : *Laurus nobilis*
MDA : Malondialdehyde
Mb nucléaire : Membrane nucléaire
MHA : Mueller Hinton Agar
MHB : Mueller Hinton bouillon
MS : Matière sèche
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NO₂ : Dioxyde d'azote
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OH* : Radical hydroxyle
ORAC : Oxygen Radical Absorbance
PAM : Plante aromatique et médicinale
PPM : Phosphomolybdate
PC : Poids corporelle
PG : gallate propylée
SOD : Superoxyde dismutase

SA : *Syzygium aromaticum*

SEM : Erreur type de la moyenne

TBHQ : Tétrahydroxytoluène

TTC : Triphényltétrazolium

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultraviolet

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

Table des matières

Dédicace	2
Remerciement.....	3
Listes des publications	5
Listes des communications affichées	8
Listes des communications orales	10
Liste des tableaux	11
Liste des figures	13
Résumé	16
Abstract	17
Listes des abréviations	18
Table des matières	21
Introduction générale.....	33
Partie I : revue bibliographique.....	35
Chapitre I : Les plantes médicinales et aromatiques	36
I. Généralité sur les plantes médicinales et aromatiques.....	36
II. Les huiles essentielles	37
1. Définition	37
2. Origine et localisation des huiles essentielles	37
3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	38

4.	Les techniques d'extraction des huiles essentielles.....	38
4.1.	Hydrodistillation	38
4.2.	Entrainement à la vapeur d'eau.....	38
4.3.	Extraction par expression à froid	39
4.4.	Enfleurage	39
4.5.	Extraction par les solvants	39
4.6.	Extraction par le CO2 supercritique	39
4.7.	Extraction par micro-onde	39
5.	Les métabolites secondaires et composition chimique des huiles essentielles	40
5.1.	Les composés terpéniques.....	40
5.1.1.	Les monoterpènes	41
5.1.2.	Les sesquiterpènes	41
5.2.	Composés aromatiques	41
6.	Méthodes d'analyses des huiles essentielles	42
6.1.	Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	42
6.2.	Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)	43
7.	Les propriétés biologiques et thérapeutiques des huiles essentielles	43
8.	Toxicité des huiles essentielles	45
9.	Principaux domaines d'application	47
	Chapitre II : Stress oxydatif : radicaux libres et défense antioxydant.....	49

I.	Espèces réactives oxygénés (ERO).....	49
II.	Sources des radicaux libres	49
1.	Production intracellulaire	49
2.	Production extracellulaire	50
III.	Stress oxydant	51
IV.	Pathologies liées au stress oxydant	52
V.	Exemple du stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	53
1.	Réaction de fenton.....	53
2.	Mécanisme de toxicité de H ₂ O ₂	53
3.	Conséquence d'excès d'H ₂ O ₂ dans l'organisme	54
4.	Métabolisme d'H ₂ O ₂ dans l'organisme	54
VI.	Les antioxydants.....	55
1.	Les antioxydants naturels	55
1.1.	Antioxydants endogènes : enzymatiques	55
1.2.	Les antioxydants exogènes : non enzymatiques	56
2.	Les antioxydants synthétiques.....	57
VII.	Mécanisme d'action des antioxydants.....	57
VIII.	Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité antioxydante.....	58
1.	Test DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl).....	58
2.	Méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	59

3. Méthode de blanchissement du β -carotène	60
4. Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	60
5. Méthode d'ABTS	60
6. Le pouvoir réducteur	61
Chapitre III : Infections Nosocomiales	62
I. Historique.....	62
II. Définition des infections nosocomiales en réanimation pédiatrique	62
III. Différentes infections nosocomiales pédiatriques	63
IV. Espèces bactériennes étudiées	64
1. <i>Escherichia coli</i>	64
2. <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	64
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
4. <i>Staphylococcus aureus</i>	65
5. <i>Proteus mirabilis</i>	65
V. Résistance bactérienne	66
1. Inactivation de l'antibiotique	66
2. Modification de la cible de l'antibiotique	67
3. Pompe à efflux d'antibiotiques	67
Chapitre IV : Anatomie du rein et effet diurétique	68
I. Anatomie et physiologie du rein	68

1. Rein	68
2. Néphron.....	69
II. Différentes fonctions du rein	69
1. Filtration glomérulaire.....	70
2. Réabsorption.....	70
3. Sécrétion tubulaire.....	70
III. Autres fonctions du rein	70
IV. Diurétiques	71
1. Définition	71
2. Classification des diurétiques.....	71
2.1. Diurétiques de l'anse.....	71
2.2. Diurétiques thiazidiques et apparentés.....	71
2.3. Diurétiques distaux	71
V. Quelques plantes à effet diurétique.....	72
Chapitre V : Monographie des plantes étudiées.....	73
I. <i>Laurus nobilis</i>	73
1. Classification.....	73
2. Description botanique	73
3. Répartition géographique	74
4. Composition chimique	75

5.	Utilisation des feuilles du <i>Laurus nobilis</i>	75
6.	Quelques propriétés pharmacologiques du <i>Laurus nobilis</i>	75
II.	<i>Syzygium aromaticum</i>	76
1.	Historique	76
2.	Origine et description botanique	76
3.	Taxonomie.....	77
4.	Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Syzygium aromaticum</i>	77
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES		79
I.	Matériels	80
1.	Matériels biologiques	80
1.1.	Critères de choix des plantes.....	80
1.2.	Matériel végétal	80
1.3.	Matériel animal	81
1.4.	Souches bactériennes	81
1.5.	Milieu de culture	82
1.6.	Antibiotiques.....	82
II.	Méthodes.....	83
1.	Méthodes d'extraction.....	83
1.1.	Hydrodistillation	83
1.2.	Macération	84

1.3.	Extraction par soxhlet	84
2.	Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	85
2.1.	Analyse chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).....	85
2.2.	Chromatographie en phase gazeuse	85
2.3.	Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	86
3.	Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	88
3.1.	Préparation de l'inoculum bactérien	88
3.2.	Antibiogramme en milieu solide.....	88
3.3.	Méthode de diffusion sur disque.....	88
3.4.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	89
3.5.	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	89
4.	Evaluation in vitro de l'activité antioxydante	90
4.1.	Test de la réduction du fer (FRAP).....	90
4.2.	Test de piégeage du radical libre DPPH	90
4.3.	Capacité antioxydante totale (CAT)	91
5.	Détermination de la teneur en composés phénoliques	91
5.1.	Estimation quantitative des polyphénols totaux	91
5.2.	Estimation quantitative des flavonoïdes totaux	92
5.3.	Estimation quantitative des flavones et flavonols.....	92
6.	Evaluation de l'effet protecteur du stress oxydatif par H ₂ O ₂ chez les rats Wistar.....	92

6.1.	Préparation de l'extrait des plantes étudiées	92
6.2.	Induction du stress oxydatif	93
6.3.	Prélèvement sanguin	93
6.4.	Etude histologique	93
7.	Evaluation de l'effet diurétique des deux plantes étudiées	95
7.1.	Traitement des rats	95
7.2.	Conception expérimental	95
7.3.	Analyses biochimiques	95
8.	Expression des résultats et analyse statistique	96
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....		97
Chapitre I : Analyse phytochimique et activité antibactérienne des huiles essentielles du <i>Laurus nobilis</i> L. et <i>Syzygium aromaticum</i> L.....		98
I.	Introduction.....	98
II.	Résultats et discussion	98
1.	Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Laurus nobilis</i> L.....	98
2.	Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Syzygium aromaticum</i> L.....	101
3.	Activité antibactérienne comparative des huiles essentielles de <i>Laurus nobilis</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	102
III.	Conclusion.....	104
Chapitre II : Activité antioxydante et quantification des composés phénoliques des huiles essentielles et de différents extraits du <i>Laurus nobilis</i> L. et <i>Syzygium aromaticum</i> L.....		105

I.	Introduction.....	105
II.	Résultats.....	106
1.	Activité antioxydante des huiles essentielles	106
1.1.	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante totale	106
1.2.	Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH	106
1.3.	Activité antioxydante mesurée par le test de FRAP	108
2.	Dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits du <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Laurus nobilis</i> par la méthode de macération.....	109
2.1.	Rendement des extraits de <i>Laurus nobilis</i> et de <i>Syzygium aromaticum</i>	109
2.2.	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavones et flavonols des extraits.....	110
2.2.1.	Teneur en polyphénols.....	110
2.2.2.	Teneur en flavonoïdes totaux	111
2.2.3.	Teneur en flavones et flavonols.....	111
2.3.	Activité antioxydante totale	112
2.4.	Activité antioxydante mesurée par le test DPPH.....	113
2.5.	Activité antioxydante mesurée par le test de FRAP	114
3.	Dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits du <i>Syzygium aromaticum</i> L et <i>Laurus nobilis</i> L par méthode de soxhlet.....	114
3.1.	Rendement des extraits de <i>Laurus nobilis</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	114
3.2.	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavones et flavonols des extraits.....	115
3.2.1.	Teneur en polyphénols.....	115

3.2.2	Teneur en flavonoïdes totaux	116
3.2.3	Teneur en flavone et flavonol	117
3.3.	Activité antioxydante totale	118
3.4.	Activité antioxydante mesurée par le test DPPH.....	119
3.5.	Activité antioxydante par le test de FRAP.....	120
III.	Discussion	120
1.	Teneur en phénols et activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	120
2.	Rendement, dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits par macération et soxhlet.....	122
Chapitre III : effet de l'extrait aqueux du <i>Laurus nobilis</i> L. et du <i>Syzygium aromaticum</i> L. sur le volume urinaire et la fonction rénale en comparaison avec le furosemide		125
I.	Introduction.....	125
II.	Résultats et discussion	125
III.	Conclusion.....	133
Chapitre IV : Exploration de l'effet protecteur des extraits aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Laurus nobilis</i> contre l'hépto-néphrotoxicité provoquée par le peroxyde d'hydrogène chez les rats wistar		134
I.	Introduction.....	134
II.	Résultats.....	135
1.	Effet protecteur de l'extrait du <i>Syzygium aromaticum</i> .L contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène	135

1.1.	Effet du peroxyde d'hydrogène et de l'extrait du <i>Syzygium aromaticum</i> sur les enzymes hépatiques chez le rat wistar	135
1.2.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait aqueux du <i>Syzygium aromaticum</i> sur le profile lipidique chez le rat wistar.....	136
1.3.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du <i>Syzygium aromaticum</i> sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine et albumine chez le rat wistar	136
1.4.	Effet du H ₂ O ₂ et l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i> sur le tissu hépatique et rénal.....	137
1.4.1.	Foie	137
1.4.2.	Rein.....	138
2.	Effet protecteur de l'extrait aqueux de <i>Laurus nobilis</i> L. contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène.	139
2.1.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du laurus nobilis sur les enzymes hépatiques chez les rats wistar.	139
2.2.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait aqueux du <i>Laurus nobilis</i> sur le profil lipidique chez les rats wistar.	140
2.3.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du <i>Laurus nobilis</i> sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine et albumine chez les rats wistar	141
2.4.	Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du <i>Laurus nobilis</i> sur le tissu hépatique et rénal.....	142
2.4.1.	Foie	142
2.4.2.	Rein.....	143
III.	Discussion	144
	Conclusion générale et perspectives	147

Références	150
Annexe	174

Introduction générale

Retracer l'histoire de la phytothérapie, c'est tracer l'histoire de l'humanité elle-même. Avant l'introduction des médicaments chimiques, l'Homme s'appuyait sur les propriétés curatives des plantes médicinales qui ont été la principale source de produits utilisés pour maintenir la santé. On estime que 80% des habitants du monde vivent dans des pays les moins développés, et selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) 80% des populations dépendent exclusivement de la médecine traditionnelle. Ce qui signifie que plus de 3.3 milliards de personnes dans les pays moins développés utilisent régulièrement des plantes médicinales [1].

Les plantes aromatiques et médicinales ont actuellement une importance considérable en raison de leurs attributs particuliers, en tant que source importante de composés phytochimiques thérapeutiques pouvant conduire au développement de nouveaux médicaments. La plupart des composés phytochimiques d'origine végétales tels que les phénols et les flavonoïdes ont des effets positifs sur la santé, d'où l'intérêt pour la recherche et l'application industrielle de plantes aromatiques et médicinales pour soulager, soigner et prévenir les problèmes de santé.

Des bactéries dangereuses résistantes aux antibiotiques ont été observées avec une fréquence croissante au cours des dernières décennies [2]. Cette résistance aux antibiotiques peut se produire via trois mécanismes généraux : la prévention de l'interaction du médicament avec la cible, l'efflux de l'antibiotique lors de la cellule et la destruction ou la modification directe du composé [3]. Tandis que les bactéries précédemment identifiées résistantes aux antibiotiques continuent de gagner en fréquence et en nombre dans le monde, de nouveaux problèmes de résistance sont apparus récemment qui compliquent d'avantage et entravent le traitement des maladies infectieuses critiques [4]. L'épidémie actuelle de résistance bactérienne est attribuée en partie à la surutilisation d'antibiotiques [5].

Les espèces réactives d'oxygène (ERO) étaient considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme aérobie qui ont été éliminées par les antioxydants [6]. La surproduction des ERO résultante d'une exposition à des agents oxydants provoque un

déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants engendrant ainsi des dommages dans les biomolécules (ADN, protéines, acides aminés et lipides) qui peuvent donner lieu au stress oxydatif qui donne naissance à diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives [7,8] et cardiovasculaire, diabète et le cancer [9,10].

Actuellement il existe des thérapies contre diverses pathologies, mais elles présentent de sérieux effets secondaires le plus souvent indésirables. Pour diminuer ces effets secondaires des recherches sont focalisées sur les produits naturels végétales dont le but est la recherche des molécules bioactives.

Dans ce contexte, l'objectif principal de notre travail est la recherche des ressources naturelles alternatives aux médicaments dont la composition contienne des molécules chimiques.

Pour atteindre l'objectif globale, nous avons procédé par l'extraction des huiles essentielles des deux plantes étudiées *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par la méthode d'hydrodistillation, et l'extraction par macération et soxhlet en utilisant de l'eau et des solvants organiques. Dans un premier temps on a commencé par l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des huiles essentielles et celle des extraits puis une analyse quantitative des polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante totale, et enfin une évaluation du pouvoir antibactérien contre des bactéries résistantes responsables des infections nosocomiales au service pédiatrique. Dans un deuxième temps, on est passé à l'étude *in vivo* par l'investigation des extraits aqueux des deux plantes pour étudier l'effet diurétique et évaluer l'effet protecteur contre l'hépatonephrotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez le rat wistar.

Dans ce présent travail, nous présentons dans la première partie une synthèse bibliographique dont la quelle nous avons donné des informations sur les plantes aromatiques et médicinales, aussi sur les méthodes d'extractions des huiles essentielles et des différents extraits, et à la fin des aperçus sur leurs activités biologiques et pharmacologiques étudiées. Quant à la deuxième partie du travail présente les différentes approches méthodologiques utilisées *in vitro* et *in vivo*.

La dernière partie est consacrée à la description et l'analyse des résultats obtenus dans le sens d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne *in vitro* d'une part, et d'autre part mettre en valeur l'effet diurétique et l'effet protecteur contre la toxicité hépatonephrotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène des extraits aqueux des deux plantes *in vivo* chez les rats wistar.

PARITIE I : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les plantes médicinales et aromatiques

Les plantes ont, tout le temps, été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutiques [11,12]. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires [13]. L'utilisation des plantes par l'Homme est une pratique antique[14]. De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cette utilisation reste archaïque ne se base sur aucun critère scientifique. En effet, les plantes possèdent un réservoir de substances immenses pour se protéger contre les microorganismes, les insectes et les mauvaises herbes[14]. Une plante médicinale est définie par la pharmacopée par une plante dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuse, également appelées « drogue végétale »[15].

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle pouvant jouer un rôle important dans le développement socio-économique de certaines régions économiquement défavorisées.

Le Maroc est un producteur de PAM. Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats permettant l'installation d'une flore riche (plus de 4200 espèces) et une diversité de ressources phylogénétiques en PAM (600 espèces). Le Maroc occupe la première place parmi les pays du Sud de la Méditerranée pour sa richesse en plantes endémiques [16]. Cette voie vers la médecine par les plantes « phytothérapie » peut s'expliquer par le fait que les plantes sont accessibles et abondantes, rendant ainsi la phytothérapie préférable surtout dans les pays en voie de développement selon « OMS 2002 ». Les PAM ont été utilisées dans le domaine thérapeutique, alimentaire, industriel, cosmétique...[17]

II. Les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles, essence ou également appelé huile volatile, l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe obtenu des plantes aromatiques. Il s'agit de substances odorantes, lipophile, volatiles de consistance huileuse, synthétisé et stocké dans certains tissus végétaux spécialisés, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeon, de fleurs, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits [18].

Selon la pharmacopée européenne [19] : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale, soit entrainer par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

Selon AFNOR (Association Française de Normalisation) [20] : « ce sont des produits généralement odorants, obtenus soit par entrainement à la vapeur d'eau , de végétaux ou de parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certaines citrus. Cette définition excluant les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction ».

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle très important dans la protection des plantes en tant qu'antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides et aussi contre les herbivores de ces plantes. Ils peuvent également attirer certains insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines, ou repousser d'autres indésirables [21].

2. Origine et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal et sont localisées dans toutes les parties de la plante avec des quantités variables. Elles se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées et elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures : les poches (Myrtacées, Rutacées) ou les canaux sécréteurs, les poils sécréteurs (Lamiacées) et les cellules sécrétrices (Zingibéracées, Lauracées) [22]. Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice : les sommités fleuries (ex : lavande, menthe...), dans les racines ou rhizomes (

ex : vétiver, gingembre) , dans l'écorces (ex : cannelles), le bois (ex : camphrier), les fruits (ex : citron), les graines (muscade) [23,24].

3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, densité, solubilité dans l'alcool, viscosité, pouvoir rotatoire, point d'ébullition et congélation. Les HEs sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles ce qui fait la différence avec les huiles fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans l'alcool que dans les solvants organiques usuels. Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation et très altérables. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité, c'est la raison à laquelle l'utilisation de flacons en verre opaque est très recommandée. Leurs densité est généralement inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de clou de girofle ou de cannelle) [25]. La plupart des huiles essentielles sont colorées : jaune pâle pour les huiles du laurier et romarin, rougeâtre pour la cannelle et jaune foncé pour citronnelle [26].

4. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

4.1. Hydrodistillation

Elle est la plus répandue, car elle convient à la majorité des plantes. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et par conséquent la libération des molécules odorantes. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange hétérogène (l'huile-eau). Ces vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [16, 20].

4.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est traversé par un courant de vapeur d'eau qui va tirer les substances volatiles hydrophobes. Après condensation, la séparation se fait par décantation. Cette méthode minimise les altérations hydrolytiques en apportant une amélioration à la qualité des huiles essentielles.

4.3. Extraction par expression à froid

C'est une méthode spécifique à l'extraction des huiles essentielles des agrumes : mandarines, oranges, citrons... c'est une méthode très simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion des poches à essence localisées au niveau de l'écorce du fruit pour en recueillir le contenu [28].

4.4. Enfleurage

L'enfleurage est une ancienne technique, et assez difficile. Elle est basée sur la forte affinité des molécules odorantes pour les graisses. Elle est réservée principalement aux fleurs. Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques de verre enduites d'une mince couche de graisse froide. Les substances volatiles diffusent et sont absorbées par la graisse et ensuite ces graisses sont épuisées à l'alcool. Ce dernier récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide.

4.5. Extraction par les solvants

Cette technique est utilisée pour les organes végétaux présentant une faible concentration en huile essentielle qu'on ne peut pas extraire par hydrodistillation. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant, à bas point d'ébullition, qui sera par la suite éliminé par distillation sous pression. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse [29]. Le solvant choisi devra posséder une stabilité face à la chaleur et sa température d'ébullition sera basse pour faciliter son élimination.

4.6. Extraction par le CO₂ supercritique

Dans cette extraction par le dioxyde de carbone liquide ou supercritique, un courant de CO₂ à forte pression fait éclater les poches à essence. Cette méthode est meilleure que l'hydrodistillation en termes de coût, d'énergie, d'économie, du rendement et de qualité du produit obtenu du fait que le dioxyde de carbone est incolore, inodore, ininflammable et non toxique [2, 22].

4.7. Extraction par micro-onde

L'extraction par micro-onde consiste à chauffer l'extractant (eau ou solvant organique) mis en contact avec la plante sous l'énergie micro-ondes ce qui permet un chauffage homogène, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées

dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Cette méthode d'extraction permet un gain de temps et d'énergies considérables avec une qualité du produit obtenu [30].

5. Les métabolites secondaires et composition chimique des huiles essentielles

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces métabolites secondaires interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversité des composés secondaires. Ces derniers présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction [31]. Ce mélange de constituants appartient à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes volatils et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

5.1. Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels largement répandus dans le règne végétal de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique). Leur particularité structurale la plus importante est la présence, dans leur squelette, d'unités isoprénique (2-méthyl-1,3-butadiène) à cinq atomes de carbone (C_5H_8) [32]. Ainsi, ils sont classés selon :

- Le nombre de carbone : les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), et moins fréquemment les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}).
- Leurs fonctions : cétones (menthone, camphre, thuyone), alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), éthers-oxydes (cinéole), aldéhydes (citral, citronellal)
- Leur structure : linéaire (farnésène, farnésol) ou cyclique : monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchouli, viridiflorol).

5.1.1. Les monoterpènes

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être acycliques comme le myrcène, ocymène..., ou cycliques comme le pinène, camphène..., et même aromatiques comme le p-cymène, aussi, ils peuvent contenir des atomes d'oxygènes

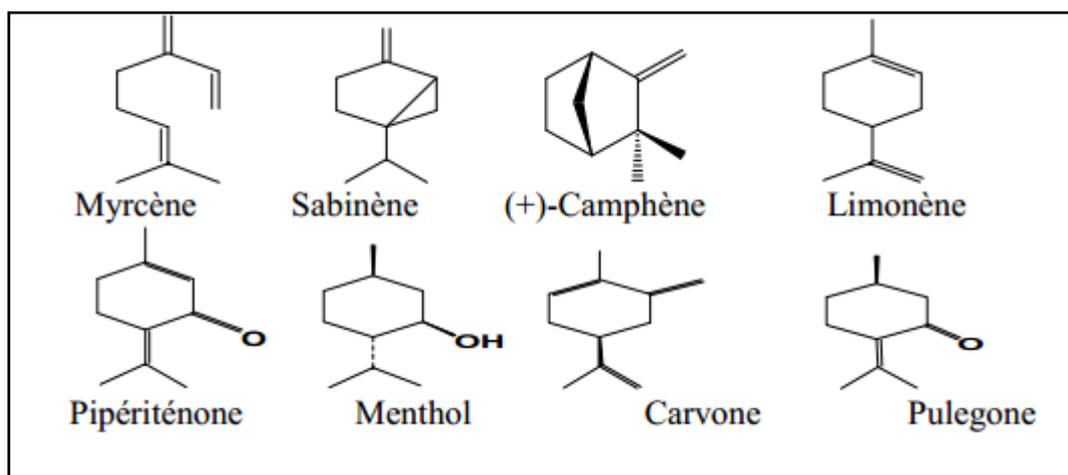


Figure 1: structure chimique de quelques monoterpènes

5.1.2. Les sesquiterpènes

Ils sont formés par assemblage de trois unités isopréniques (C₅). Cependant leur structure ainsi que leur fonction restent même que celles des monoterpènes.

5.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropanes (C₆-C₃), ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe est caractérisée par des composés odorants bien connus comme l'eugénol, l'estragole, la vanilline, l'anéthole et bien d'autres. Ils sont caractéristiques des huiles essentielles du clou de girofle, la cannelle, le basilic, l'estragon...[22, 32] (Figure 2).

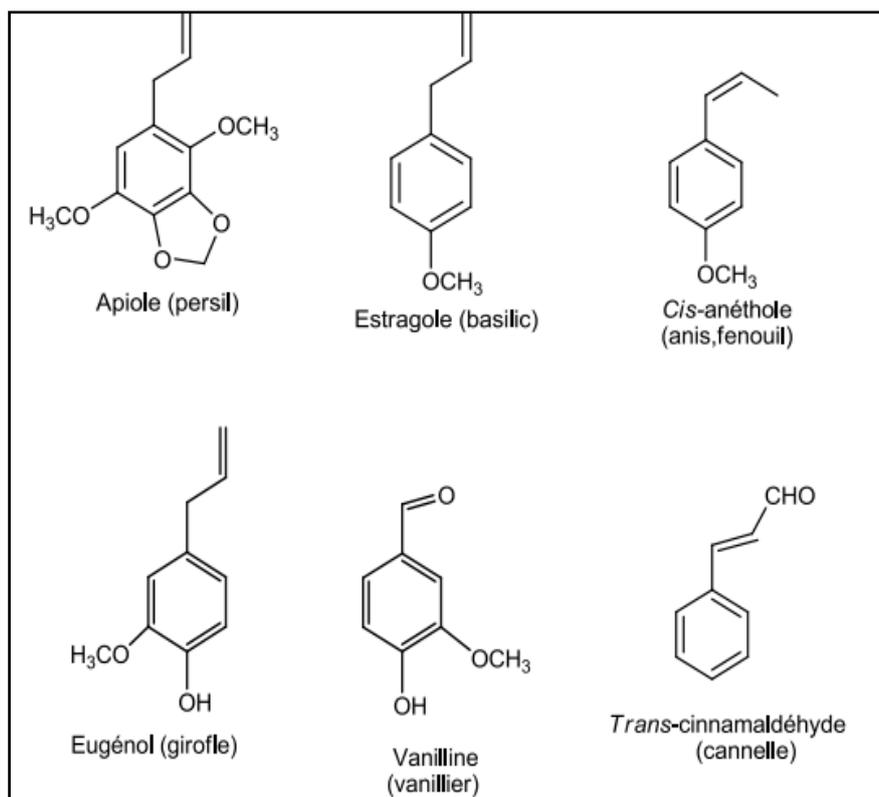


Figure 2 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane

6. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont considérées comme une matière première destinée à divers secteurs d'activités tels que la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire, d'où la connaissance de la composition chimique reste une étape importante et nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs méthodes et techniques. Ces méthodes consistent à l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation mais aussi d'analyse, c'est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. La méthode a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptible d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est aussi une méthode

d'analyse. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. En effet les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Les indices de rétention sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrit dans la littérature). Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse CPG/SM [33].

6.2. Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

La spectrométrie de masse est une technique analytique qualitative de choix pour les composés organiques. Elle permet de recueillir des informations en vue d'élucider la structure des espèces présentes même en faible quantité dans un échantillon. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétentions (IR) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants avec les caractéristiques de produits de référence [34].

7. Les propriétés biologiques et thérapeutiques des huiles essentielles

Depuis des millénaires, l'Homme a utilisé les huiles essentielles d'une manière empirique pour guérir et prévenir les maladies. Les propriétés médicinales des huiles essentielles sont très nombreuses.

Les effets anti-inflammatoires ont été décrit pour les huiles essentielles de *Calluna vulgaris*, *Geum urbanum*, *Juniperus communis* et *Salix caprea* [35]. Récemment, des études ont montré que les huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, donnaient des tests d'inhibition positifs sur la lipoxigénase L-1 de soja, modèle de la lipoxigénase humaine (5-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation [36]. Dans une autre étude, il a été montré que celles de *Chromolaena odorata* présentaient des actions positives sur la fonction Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase [37]. Une étude très récente a montré un effet anti-inflammatoire très significatif de l'huile essentielle de

Bougainvillea glabra [38]. Il existe certaines huiles essentielles qui présentent des activités anti-tumorales in vitro. Elles sont utilisées dans des traitements préventifs que curatifs. L'huile essentielle du *Cymbopogon flexuosus* a été étudiée d'une part pour déterminer sa toxicité in vitro contre douze lignées de cellules cancéreuses humaines et d'autre part pour évaluer l'activité anticancéreuse in vivo à l'aide de modèles de tumeurs solide chez les rats. Les résultats ont montré des effets de cytotoxicité significatifs et dose dépendant, l'huile de lemon grass a une activité anticancéreuse prometteuse et entraîne une perte de viabilité de cellules tumorales en activant le processus apoptique [39]. Une étude est faite sur l'huile essentielle de bergamote (*Citrus bergamia*) a montré une efficacité anticancéreuse in vitro contre les cellules de neuroblastoma SH-SY5Y humaines [40]. Une étude est faite par Pudziuelyte L et al [41] sur l'huile essentielle d'*Elsholtzia ciliata* a montré une activité antiproliférative sur trois lignées de cellules cancéreuses testées (glioblastome humain (U87), cancer du pancréas (Panc-1) et cancer du sein triple négatif (MDA MB231)) in vitro à des concentrations élevées. Kumar et al a réalisé une étude qui vise à évaluer l'activité cytotoxique des clous de girofle vis-à-vis des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 humain, on conclut que les clous de girofle sont des produits naturels présentant une excellente cytotoxicité envers les cellules MCF-7 ; ils constituent donc des sources prometteuses pour le développement d'agents anticancéreux [42]. Une étude est faite dans le but d'évaluer l'effet protecteur de l'huile essentielle du clou de girofle contre la cirrhose du foie induite par le thioacétamide, en inhibant la prolifération anormale des cellules hépatiques et en diminuant au même temps le stress oxydatif [43].

Les huiles essentielles ont une action manifeste sur le système digestif. Elles sont efficaces contre la formation de gaz au niveau abdominal (huiles essentielles de basilic, d'anis) et elles favorisent la formation des sucs gastriques nécessaires à une bonne digestion (huiles essentielles de cumin, d'estragon, de menthe poivrée).

Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Les huiles essentielles agissent sur les bactéries à Gram positif aussi bien que sur Gram négatif. L'origan, le thym, la sauge, le romarin et le clou de girofle sont des plantes aromatiques dont leurs huiles essentielles sont très riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité inhibitrice microbienne.

Différentes études antérieures et récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles. Une étude antérieure a été faite pour évaluer l'effet inhibiteur de l'huile d'oignon sur la croissance de quatre bactéries Gram (négatif) et quatre autres Gram (positif), cette étude a révélé l'effet antibactérien de cette huile sur toutes les bactéries à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* [44]. L'huile essentielle du *Thymus vulgaris* est très reconnue par son activité antibactérienne, cette réputation est due à sa richesse en thymol (composés phénolique) [45]. Il existe plusieurs huiles essentielles douées du pouvoir antibactérien même contre des souches résistantes : *Pseudomonas aeruginosa*, *staphelococcus aureus* [46,47].

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*. De nombreuses huiles essentielles incluant les huiles de thym, citronnelle, clou de girofle et de cannelle révèlent leur potentiel antifongique ont été décrites [18,48,49]. Une étude de Raimundo et al [50] a montré que l'huile essentielle du fruit de *Grindelia integrifolia* a une activité fongicide contre les principales maladies d'origine alimentaire et les champignons responsables de la détérioration des aliments du genre *Aspergillus* et *Penicillium*. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* présente un effet inhibiteur contre trois genres de champignons : *Cladosporium sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp* [51].

8. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent un mélange de molécules actives, bien qu'elles soient d'origine naturelle. Les huiles essentielles peuvent révéler de graves effets secondaires et par conséquent être dangereuses pour la santé. Pour cela l'utilisation des huiles essentielles n'est à prendre à la légère. Les effets toxiques sont très variables d'une huile à une autre et dépend aussi de la sensibilité des consommateurs. Elles doivent être prise à bon escient et à dose adapté et de choisir le mode d'administration adéquat, et ce afin d'éviter la survenue d'effets indésirables, voire même l'interaction avec d'autres médicaments. Ainsi, les huiles essentielles peuvent être irritants, allergisants, cytotoxiques, neurotoxiques, néphrotoxiques, hépatotoxiques, ...

On distingue les toxicités suivantes :

➤ Toxicité par voie orale

Un pourcentage élevé des huiles essentielles couramment utilisées présentent une toxicité par voie orale faible avec des doses létales à 50% (DL50) supérieures à 5 g/kg. Cependant l'huile essentielle d'origan présente une toxicité élevée presque 1.4 g/kg (chez l'animal). Il existe d'autres huiles essentielles toxiques exemples : huiles essentielles de thuya, chénopode, de boldo et l'essence de moutarde [22]. L'eugénol, qui est un composé de l'huile de thym provenant de *thymus, capitatus, cilicus, funkii* et *vulgaris* est hépatotoxique. Chez l'enfant, une quantité aussi faible d'huile de girofle contenant de l'eugénol comme composé majoritaire a entraîné une insuffisance hépatique Presque fatale [52].

➤ Toxicité dermique

L'application locale des huiles essentielles, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations, allergies voire photosensibilisation. C'est le cas de l'huile essentielle de thym, et de l'origan, qui sont connues pour leur pouvoir agressif et irritant. L'huile essentielle de cannelle qui est dermocaustique et allergisante pour les personnes sensibles, et les essences d'agrumes (citron, pamplemousse, ...) qui sont photosensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition durable au soleil [53].

➤ Cytotoxicité

Certaines huiles essentielles peuvent se révéler cytotoxiques sur les cellules humaines et animales. En effet, il a été démontré que les huiles essentielles d'origan, de différentes variétés, présentent une forte cytotoxicité sur des cellules humaines cancéreuses. Une étude a mis en évidence l'activité cytotoxique de l'huile essentielle du calamansi (*Citrus microcarpa*), les résultats suggèrent que cette huile a une activité cytotoxique plus grande sur le MCF-7 (cellules tumorales mammaires) et que cette activité peut-être directement attribuée à la quantité élevée de D-limonène et à d'autres terpènes [54]. Egalement, il a été démontré que les huiles essentielles de lavande et du thym sont cytotoxiques sur les cellules animales [52,55,56].

➤ Neurotoxicité

L'utilisation prolongée de certaines huiles essentielles peuvent être convulsivantes et abortives. C'est le cas des huiles essentielles du Thuya, la sauge officinale et l'absinthe qui provoquent des effets neurotoxiques [57].

9. Principaux domaines d'application

Les huiles essentielles sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance en raison de leurs diverses propriétés. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme pharmaceutique par leurs pouvoirs analgésiques, antiseptique, antidiabétique...en alimentation vue leurs activité antioxydante et leurs effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique en raison de leur propriété odoriférante.

➤ Aromathérapie

L'aromathérapie est ainsi un domaine de la phytothérapie, c'est une médecine alternative, qu'est basée sur l'utilisation des composés aromatiques extraits de plante, les huiles essentielles. Ces dernières ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs, ainsi, elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, la kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans le domaine d'esthétique [58,59].

➤ Agro-alimentaire

Vue les propriétés antiseptiques et aromatisants, les huiles essentielles sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier...). Elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées...) et en confiserie (bonbon, chocolat...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments pour des longues durées en évitant les moisissures.

➤ Cosmétologie et parfumerie

Les HEs sont très recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de Jasmin, de rose, de violette, de verveine... les HEs sont aussi consommées en cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres.

➤ Pharmacie

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe ...) et sous la forme de préparations galéniques. Plus de 50% de médicaments sont à la base de composants actifs de plantes. La propriété aromatisant des huiles essentielles permettent de masquer l'odeur désagréable de médicaments administré par voie orale.

Chapitre II : Stress oxydatif : radicaux libres et défense antioxydant.

I. Espèces réactives oxygénés (ERO)

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne [60]. Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines, sont, les ions peroxydes, des radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition [61]. Les radicaux libres sont des espèces chimiques à très forte réactivité.

II. Sources des radicaux libres

1. Production intracellulaire

La production des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources essentiellement enzymatiques. Les oxydases (NADPH oxydase) constituent un « point d'entrée » en produisant l'anion superoxyde dont dérivent d'autres ERO. Il existe d'autres sources de production des radicaux libres telles que, les déshydrogénases, cyclo et lipoxigénase et la xanthine oxydase. Chez la plupart des organismes eucaryotes, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène : il s'agit de la respiration aérobie. Cette respiration conduit à la production d'eau (**figure3**). Cette réaction peut cependant laisser fuir des électrons qui vont produire des espèces radicalaires de l'oxygène. De même, les radicaux libres sont produits in vivo sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaire (macrophages). Le stress intellectuel ou thermique peut influencer la production des radicaux libres [62, 63].

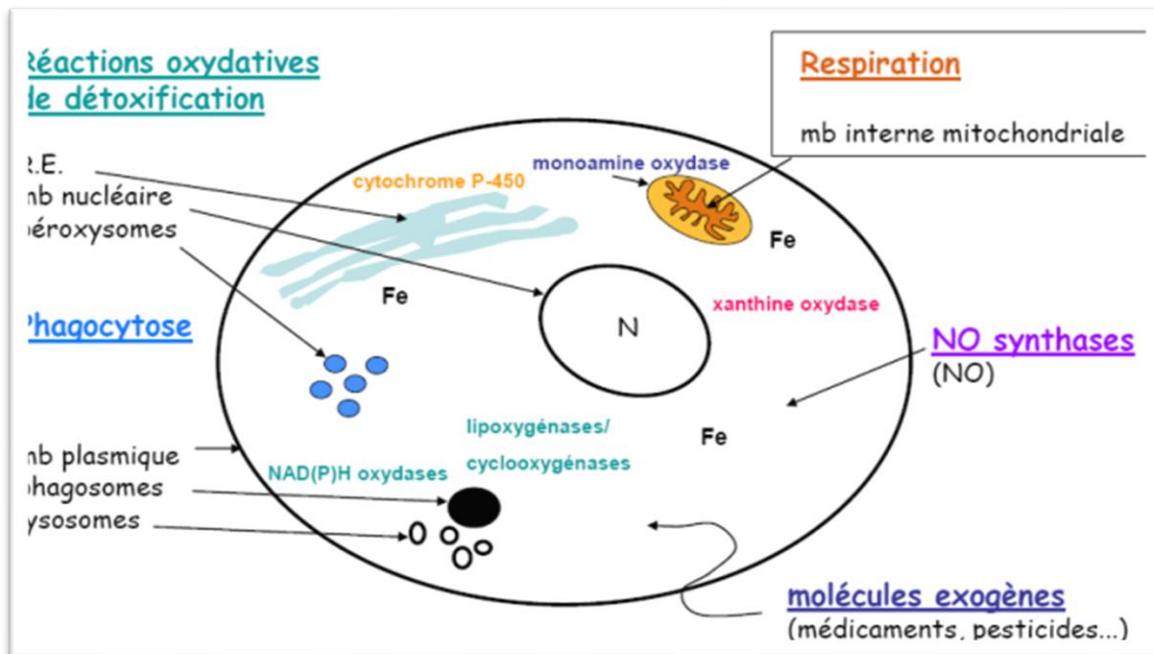


Figure 3 : sites de production des radicaux libres

2. Production extracellulaire

Plusieurs facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont à l'origine de l'augmentation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans ce dernier.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent d'une façon directe ou indirecte être impliqués dans la production et la génération des radicaux libres (**figure 4**). Les rayonnements UV ainsi que l'exposition prolongée au soleil induisent la synthèse de O_2^- , $OH\cdot$ et H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisant [64].

L'oxyde et le dioxyde d'azote (NO et NO_2) sont largement présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisante, polluant industriels, pesticides...), ainsi qu'une alimentation riche en graisse saturées et en sucres, consommation d'alcool et une alimentation déséquilibrée qui est pauvre en vitamines et oligo-éléments, sont autant d'éléments favorisant la production de radicaux libres [65].

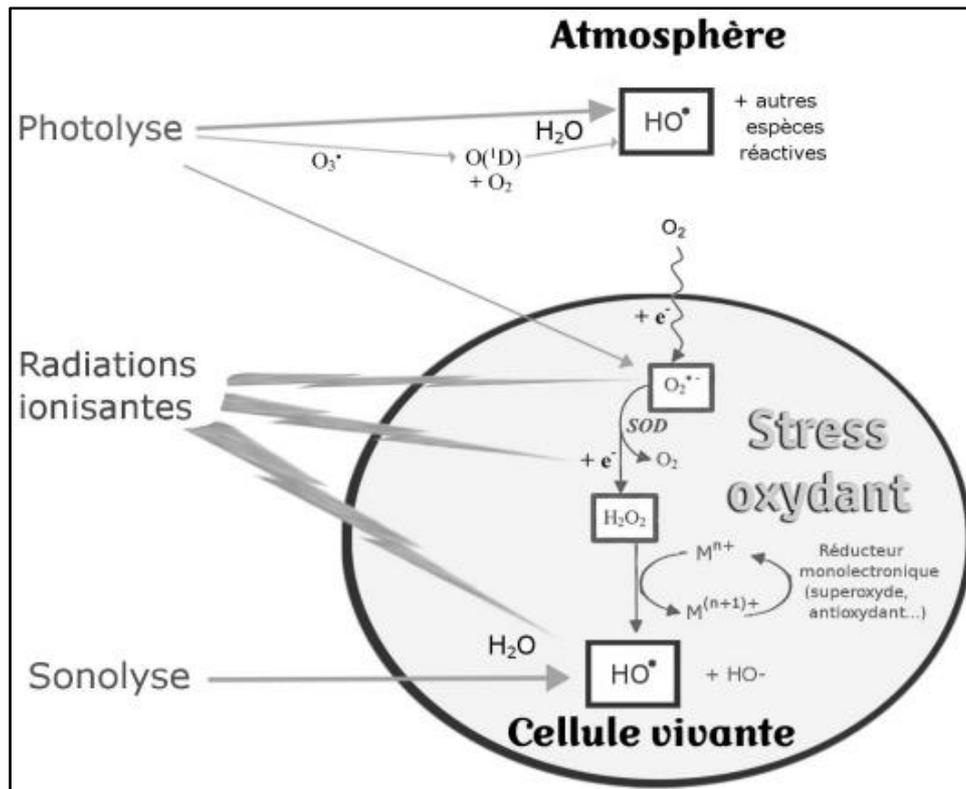


Figure 4 : génération extracellulaire des radicaux libres

III. Stress oxydant

A l'état normal, il existe un équilibre entre la production des ERO et la capacité antioxydante intracellulaire [66], dans ces conditions, les cellules présentent un état redox physiologique optimal, on dit alors que la balance Oxydant/Antioxydant est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (endogène d'origine inflammatoire, ou exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants tel que le tabac, alcool, pollution...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports en micronutriments antioxydants, inactivation enzymatique) ou une combinaison de ces deux facteurs, un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif [67,68]. Ce déséquilibre va se traduire par de nombreuses oxydations au niveau des macromolécules biologiques telles que les acides gras polyinsaturés AGPI (fixation d'un radical sur une double liaison), les protéines (modification de leur structure) et de l'ADN (rupture des chaînes bicaténares) cibles des espèces réactives de l'oxygène.

Les espèces réactives d'oxygène réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne des modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la

cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire plusieurs cibles peuvent être affectées.

- Oxydation d'ADN : l'ADN nucléaire et mitochondrial sont des cibles privilégiées des ERO. Les modifications les plus répandues sont l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques et le squelette désoxyribose provoquant ainsi le clivage de deux brins et des mutations génétiques [39, 63]. Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation. Il existe des systèmes de réparation de l'ADN mais lorsqu'ils sont débordés, ces systèmes ne sont plus suffisants et cela entraîne des altérations du matériel génétique qui peuvent causer des mutations, des cancers ou la mort cellulaire [69].
- Altération des protéines : les protéines sont formées d'acides aminés qui peuvent agir avec les radicaux libres. Parmi les acides aminés les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute modification dans le fonctionnement de celle-ci comme : la non reconnaissance des récepteurs par les ligands et perte de l'activité enzymatique [70, 71].
- Altération des membranes lipidiques : les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les radicaux libres peuvent arracher un atome d'hydrogène aux chaînes latérales d'acides gras des lipides pour former des radicaux alkyles. Ceux-ci vont ensuite réagir avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. La peroxydation lipidique entraîne une désorganisation des lipides membranaires, résultant ainsi une altération de sa fluidité et par conséquent une lyse cellulaire [63, 72, 73].

Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets nocifs des radicaux libres. Ce sont des enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres.

IV. Pathologies liées au stress oxydant

Actuellement, plusieurs problèmes de santé découlent du stress oxydant. L'oxydation des lipides et l'attaque des lipoprotéines circulantes par les ERO induisent à la formation d'athérosclérose [74], tandis que l'oxydation de l'ADN via la formation de dérivés toxiques de l'oxygène ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du

cancer. De même les ERO agissent sur le glucose et sur les protéoglycanes, ce qui provoque le diabète de type II et par conséquent les concentrations anormalement élevés de glucose dans l'organisme déclenchent les complications liées au diabète telles que l'insuffisance rénale, la rétinopathie diabétique [75, 76]. Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, ou la mort neuronale. De plus, les radicaux libres en excès seraient impliqués plus ou moins directement dans le vieillissement cognitif [77, 78].

V. Exemple du stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

1. Réaction de fenton

Environ de 2% d'oxygène respiré est transformé en O₂^{·-} cela se fait au niveau de la mitochondrie. L'anion superoxyde O₂^{·-} est considéré comme un radical primaire, lui-même est un précurseur d'autres espèces réactifs oxygénées telles que le radical hydroxyle OH[·] et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

2. Mécanisme de toxicité de H₂O₂

H₂O₂ est un métabolite endogène physiologique retrouvé dans toutes les cellules vivantes de l'organisme, son action est intense au foie, la rate, le sang et les tissus vascularisés. Le mécanisme de toxicité le plus répandue pour le peroxyde d'hydrogène repose sur la dénaturation des protéines. Le pouvoir oxydant de H₂O₂ est très élevé par rapport à d'autres éléments tels que l'acide hypochloreux (HOCl). Le mécanisme du peroxyde d'hydrogène est comparable à celui de l'acide hypochloreux. Ce mécanisme est fondé sur la rivalité entre les réactions d'oxydations moléculaires et la réaction de repliement de la protéine à son équilibre. Les réactions d'oxydation entraînent le déliage et l'agrégation des protéines (**figure 5**). Le H₂O₂ connu parmi les oxydants de basse cinétique avec les cystéines, va activer des protéines chaperonnes beaucoup plus lentement, ceci oblige l'existante de douces conditions de déploiement, comme la chaleur pour réagir avec la cystéines [79].

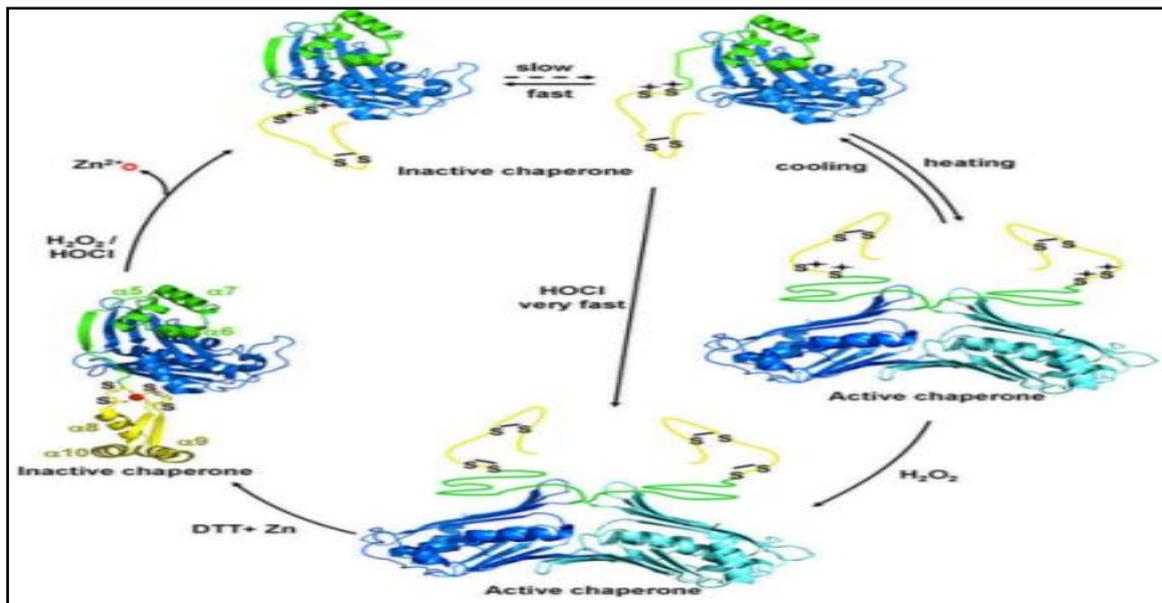


Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action protéique de l'acide hypochloreux, proche de celui du peroxyde d'hydrogène (Winter et al., 2008)

3. Conséquence d'excès d'H₂O₂ dans l'organisme

A cause de la haute réactivité de H₂O₂, ce dernier va indirectement attaquer les lipides membranaires, l'ADN et d'autres entités cellulaires.

Certains travaux mettent en relief l'existence d'une oxydation préférentielle par le peroxyde d'hydrogène de nombreuses acide aminé du corps humain, en particulier la cystéine. L'excès d'eau oxygénée endogène serait une source de stress oxydatif dont l'ADN est une cible préférée. En effet, la guanine en réagissant avec le radical hydroxyle OH., tant à s'apparier avec l'adénine au lieu de la cytosine, et par conséquent provoque des mutations au niveau de l'ADN et donc des changements ou altérations du message génétique [80].

4. Métabolisme d'H₂O₂ dans l'organisme

Le processus de désintoxication physiologique du peroxyde d'hydrogène dans l'organisme est possible par l'intermédiaire de deux principales enzymes : la glutathion peroxydase et les catalases. Elles permettent de gérer la concentration de H₂O₂ dans différentes parties de la cellule et à chaque niveau. La glutathion peroxydase se charge de l'accumulation dans le cytosol et les mitochondries, tandis que la catalase intervient pour traiter les grandes quantités accumulées dans les peroxysomes. Il existe d'autres éléments à savoir les caroténoïdes et la vitamine E qui participent à la réalisation de cette action. On ne

peut pas négliger la participation des globules rouges dans la détoxification vue leur concentration importante en catalase.

VI. Les antioxydants

Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules. Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes [81]. Ces derniers ont été largement utilisés dans le contrôle du rancissement oxydatif des lipides dans les aliments, qui est une cause majeure de détérioration de la qualité, des pertes nutritionnelles, du changement de saveur et la décoloration. Outre la prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires [82]. Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) [81].

1. Les antioxydants naturels

1.1. Antioxydants endogènes : enzymatiques

La cellule est pourvue de système de défense très efficace. Les antioxydants enzymatiques sont capables d'éliminer les radicaux libres de façon permanente et efficace en transformant l'anion OH^\cdot et le H_2O_2 en produits non toxiques : l'eau et l'oxygène moléculaire [83]. Les antioxydants sont principalement trois enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase et les peroxydases.

- Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.
- La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes, dans les érythrocytes et les peroxysomes hépatiques, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

- L'activité du glutathion peroxydase ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur.

Il existe d'autres enzymes jouant un rôle négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble forme un système complexe glutathion réductase, thioredoxine réductase, glutathion transférase...

1.2. Les antioxydants exogènes : non enzymatiques

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et les leur biodisponibilité, sont utilisés largement dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Les légumes et les fruits sont des sources riches en antioxydants tels que la vitamine A, la vitamine C, les caroténoïdes, les composés phénoliques et les flavonoïdes qui préviennent les dommages de radicaux libres et réduisent les risques de maladies chroniques.

- La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble, elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire [84]. Certains fruits et légumes, en particulier crus, sont particulièrement riche en vitamine C : kiwi, fraise, framboise, orange, citron, pamplemousse, brocoli...
- La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols. Ces derniers regroupent quatre substances : l'alphatocophérol (plus actif), le bêta-tocophérol, le gamma-tocophérol et le delta-tocophérol. La vitamine E contribue à neutraliser les radicaux libres qui peuvent s'accumuler dans les membranes lipidiques et les tissus gras de l'organisme et par conséquent elle joue un rôle primordial dans la protection de la membrane cellulaire. Les huiles végétales, les noix, les graines sont de bonnes sources de vitamine E [85].
- Les caroténoïdes sont des pigments (jaune à rouge) issus des plantes et microorganismes, sont de longues molécules très hydrophobes et possèdent un système de liaisons doubles conjuguées. Les caroténoïdes regroupent deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont constitués uniquement de carbone et d'hydrogène, tandis que ; les xanthophylles contiennent en plus des atomes d'oxygènes.

- Les composés phénoliques : et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à terminer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électron et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique [86].
- La quercétine : molécule naturelle présente dans de nombreux légumes et particulièrement abondante dans les oignons, le thé et la peau des pommes.

Ils existent d'autres sources de composés antioxydants aussi intéressantes, dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments [87,88].

2. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroxytoluène (TBHQ) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs dans le but de prévenir la rancidité parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels.

Le gallate de propyle et le butylhydroxyanisole sont des antioxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant la peroxydation des acides gras insaturés [49].

Malgré leur forte activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, responsable de mutagénicité et peut même présenter un danger sur la santé humaine.

VII. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [77]. L'antioxydant, auquel il manque un électron a l'avantage de ne pas se transformer en radical libre. Il devient inactif. La réaction en chaîne est stoppée. La synthèse des radicaux libres dans l'organisme cesse et les lésions sont ainsi très limitées.

VIII. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la capacité antioxydante. La majorité de ces méthodes sont basées sur la mesure de la consommation des radicaux libres préalablement formés comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$: Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature parmi lesquelles nous citons :

1. Test DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl)

Le capteur de proton 1,1-diphenyl-2-picrylhydrozyle (DPPH) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé [89]. Le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneur de proton), le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (**figure 6**). Le produit réduit présente une coloration vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre à 517nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la capacité d'antioxydant.

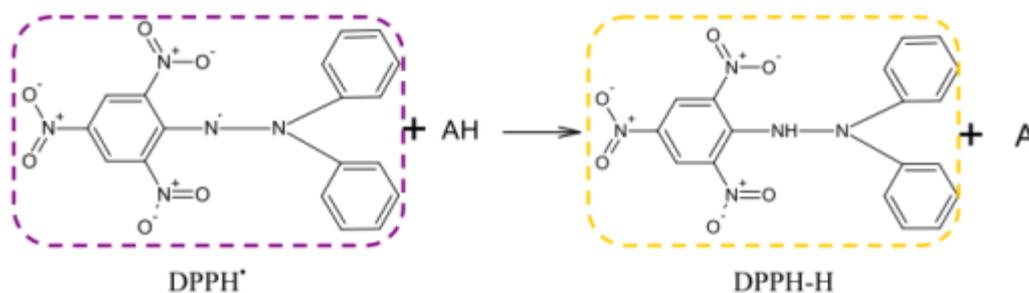


Figure 6 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH· entre l'espèce radicalaire DPPH· et un antioxydant (AH) (Molyneux ; 2004)

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. La concentration du composé phénolique nécessaire pour atteindre une disparition de 50% du DPPH à l'équilibre est connue comme l' IC_{50} . La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité.

2. Méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de pro-oxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode de FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

La méthode FRAP développée par Benzie et Strain 1996 [90] correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique $[(Fe(III)-TPTZ)]$ de couleur jaune en complexe ferreux $[(Fe(II)-(TPTZ)_2)]$ de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant (AH) (**figure 7**), à un pH de 3.6 pour maintenir la solubilité du fer.

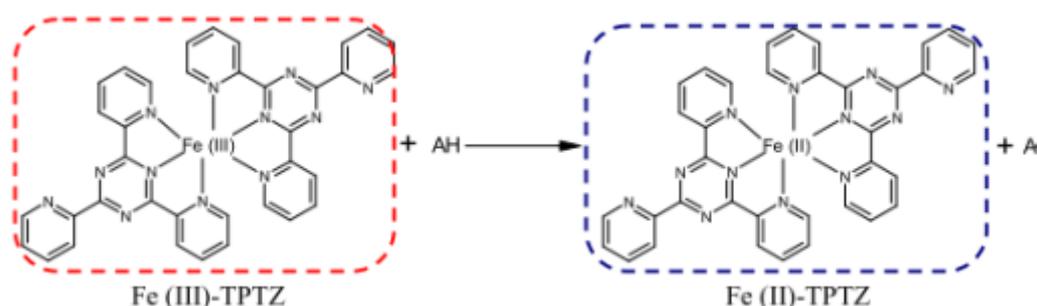


Figure 7: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2014)

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm., une gamme étalon est d'abord réalisée avec une solution aqueuse de sulfate de fer heptahydraté ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) entre 100 et 1000 μM pour s'assurer de la linéarité de la méthode et calculer les résultats. A partir des valeurs d'absorbance lues à 593nm et mesurées à $t=0$ puis à $t=4$ min après le mélange, les résultats peuvent être exprimés en valeur FRAP suivant la formule :

$$FRAP = \left\{ \frac{[A(\text{échantillon})_{t=4 \text{ min}} - A(\text{échantillon})_{t=0 \text{ min}}]}{[A(\text{standard})_{t=4 \text{ min}} - A(\text{standard})_{t=0 \text{ min}}]} \right\} * [\text{standard}].$$

- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon à $t=0$ ou $t=4$ min

- A_{standard} correspond à l'absorbance de la solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à $t=0$ ou $t=4\text{min}$
- [standard] correspond à la concentration en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon est considéré comme étant un bon réducteur.

3. Méthode de blanchissement du β -carotène

Le test de blanchissement du β -carotène permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, qui consiste à suivre la cinétique de décoloration du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique en présence d'un antioxydant. Le β -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. Plus l'efficacité d'un antioxydant est grande, plus la décoloration de la couleur du β -carotène sera lente et vice versa [91].

4. Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Cette méthode consiste à mesurer la protection exercée par une substance ou molécule donnée contre l'oxydation de la fluorescéine par les dérivés radicalaires de la dégradation thermolytique du radical AAPH. Contrairement au test du DPPH, qui mesure une capacité de réduction, il s'agit donc de la mesure d'un pouvoir antiradicalaire. Les résultats sont exprimés par rapport à la protection exercée par un antioxydant de référence, le trolox est exprimé par gramme de produit testé. Lorsque la fluorescéine est soumise à l'action oxydante d'un radical libre, l'AAPH, on constate que sa réponse en fluorescence diminue au cours du temps (environ 30mn). En présence d'une activité antiradicalaire (composé, produit naturel...) la fluoresceine est protégée du stress et la durée de sa fluorescence est prolongée. C'est cette augmentation qui permet de quantifier le pouvoir antiradicalaire par le biais d'un étalonnage par le trolox.

5. Méthode d'ABTS

Le test ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acide)] Decolorization assay ou Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^+ de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS^+ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer ABTS^+ . La décroissance de l'absorbance causé par l'antioxydant

reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent trolox par g de produit ou par ml s'il s'agit d'un liquide.

6. Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols. Le pouvoir réducteur est généralement associé à la présence de réducteurs qui exercent une action antioxydante par rupture de la chaîne de radicaux libres en libérant un atome d'hydrogène [92].

Dans cet essai, la présence de réducteurs (antioxydants) dans les extraits induit la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanide à une forme ferreuse, ce qui conduit à un changement de couleur de la solution d'essai, du jaune à différentes nuances de vert et de bleu en fonction du pouvoir réducteur de chaque extrait testé. Par conséquent, la concentration de Fe^{2+} peut être vérifiée en mesurant la formation de perles bleues à 700nm. L'augmentation de l'absorbance à 700nm indique une augmentation du pouvoir réducteur. Une observation similaire entre les constituants polyphénoliques en termes de dose dépendante et d'activité du pouvoir réducteur ont été rapportés pour plusieurs extraits de plantes y compris le thé [93].

Chapitre III : Infections Nosocomiales

I. Historique

Les infections dites nosocomiales (du grec : noso=maladie et komein= prendre soin de). En 19^{ème} siècle, ces infections étaient essentiellement les mêmes que celles observées alors dans la communauté (choléra, typhoïde, tuberculose, variole...) tout au plus la promiscuité de beaucoup d'établissements rendait-elle encore plus probable l'acquisition d'une telle affection.

A la fin du 19^{ème} siècle, des progrès majeurs vont être réalisés qui permettront de limiter le développement d'infections hospitalières.

Les travaux de Louis Pasteur et Robert Koch vont ouvrir l'ère de la microbiologie moderne et permettent de bien comprendre la nature et les modes de transmission des maladies infectieuses et par conséquent le développement des techniques d'isolement visant à interférer avec les divers modes de transmission des agents infectieux.

La découverte de la pénicilline résistante aux pénicillinases va permettre de mieux contrôler les infections à staphylocoques dorés.

Ces infections sont difficiles à contrôler car ces agents appartiennent le plus souvent à la flore normale du patient et leur résistance ne fait que s'élargir parallèlement au développement des nouveaux antibiotiques.

II. Définition des infections nosocomiales en réanimation pédiatrique

Les infections nosocomiales (IN) sont par définition des infections contractées dans un établissement de soins, alors qu'elles n'étaient ni présentes, ni en incubation lors de l'admission à l'hôpital [94], la plupart des infections nosocomiales bactériennes se manifestent après un séjour de 48 heures, et selon la période d'incubation du germe responsable, le délai peut être plus long.

Les nouveau-nés hospitalisés et en particulier les prématurés ont un état de santé précaire et une altération des moyens de défense les rendant vulnérables aux infections nosocomiales. L'incidence de ces derniers dans les unités de soins intensifs néonatales est

élevée. Elle est estimée à 11.4% aux Etats Unis et 7.2% en France [95]. Au Maroc, les données concernant l'infection nosocomiale chez les nouveau-nés sont limitées, le taux d'incidence de l'IN est estimé à 21.9% en réanimation mixte pédiatrique et néonatale. La présence des IN en réanimation pédiatrique est un réel problème de santé publique, elle est responsable d'importante mortalité et morbidité [66].

III. Différentes infections nosocomiales pédiatriques

L'étiologie et la fréquence des IN sont très variables et cela dépend de la région étudiée. Quelques catégories d'infections :

- Infections urinaires : l'infection urinaire nosocomiale en situation néonatale est retenue malgré l'absence de sondage et le diagnostic d'infection urinaire symptomatique ou non est retenu devant un examen cyto bactériologique des urines positif.
- Infections pneumatiques : chez les sujets sains, les voies aériennes inférieures sont régulièrement soumises à une contamination microbienne à laquelle s'opposent différents mécanismes des défenses : mouvements mucociliaires, sécrétions locales d'immunoglobulines et activité macrophagique alvéolaire. Le mécanisme d'acquisition principal est la micro-inhalation de sécrétion contenant des microorganismes pathogènes colonisant les voies aériennes supérieures et digestives. Cette colonisation est favorisée par la présence de la sonde d'intubation endotrachéale qui court-circuite la barrière naturelle entre oropharynx et trachée, altère la clairance mucociliaire et inhibe le réflexe de toux. L'intubation peut aussi léser l'épithélium de la muqueuse trachéale et en faciliter la colonisation [96].
- Infections liées aux cathéters vasculaires : on distingue deux voies d'acquisition des microorganismes :
 - 1) la colonisation par voie extra-luminale du cathéter est le mécanisme le plus fréquemment évoqué dans les premiers jours suivant la pose. Les bactéries de la flore cutanée du patient, ou du personnel migrent via la surface externe du cathéter inséré le long du trajet sous-cutané.
 - 2) la colonisation intra-luminale a pour origine l'introduction de microorganismes plutôt dans la lumière du cathéter à partir du connecteur lors de la manipulation des

raccords sur la ligne veineuse (injection) ou par une préparation injectable contaminée.

IV. Espèces bactériennes étudiées

1. *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Les *E.coli* sont des hôtes normaux du tube digestif, particulièrement au niveau de la partie distale de l'iléon et du colon de l'homme et de la plupart des animaux (mammifères et oiseaux) [97]. *E. coli* colonise le tractus gastro-intestinal de l'Homme dès sa naissance et persiste dans le colon pratiquement toute la vie. Ce microorganisme représente près de 80% de la microflore commensale anaérobie facultative de ce segment du tube digestif et assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse. Bien que la majorité des souches d'*E.coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont uropathogènes et possèdent des adhésives protéiques qui leur permettent de se multiplier sur les cellules épithéliales de l'arbre urinaire et d'autre sont toxigènes et peuvent provoquer alors une gastroentérite infectieuse [98].

2. *Klebsiella Pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie appartenant au genre *Klebsiella*. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif immobile et souvent capsulé poussant sur milieu ordinaire en atmosphère aéro-anaérobie. *K. pneumoniae* est saprophyte des végétaux, eaux de surface, eaux usées et sols d'où leur dissémination dans l'environnement hospitalier via des bouquets de fleurs souvent ramenés par les visiteurs des patients. Elle est à l'origine d'infections communautaires, et aussi reconnue comme responsable d'infections nosocomiales (infections urinaires, intra-abdominales, infection de site opératoire, pneumonies) [99].

3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa connue aussi sous le nom de bacille pyocyanique est une bactérie à Gram négatif, bactérie de l'environnement mais peut être commensal du tube digestif. Pour les sujets en bonne santé, *P. aeruginosa* est peu présent, avec seulement 2 à 10% de porteurs tandis que chez les sujets hospitalisés ce taux peut atteindre 50% voire 60% sur les plaies des

brûlures ou des escarres. Depuis l'émergence de cette espèce en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Le plus souvent les investigations menées au décours de ces épidémies identifiaient l'environnement hydrique des services comme réservoir principal de contamination des patients. Saprophyte des environnements humides, *P. aeruginosa* peut en effet survivre et se multiplier sur des supports inertes humides (lavabo, robinet, savon, les humidificateurs des appareils de ventilation). *P. aeruginosa* a une grande capacité à coloniser les surfaces sous forme de biofilm. C'est par ailleurs un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes : hommes, animaux, plantes [100].

4. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont en générale des bactéries de type cocci à Gram positive. *S. aureus* est une espèce la plus importante des staphylocoques qui a pour habitat les fosses nasales et les mains des individus sains.

Les infections à Staphylocoque se présentent souvent sous la forme d'infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses pouvant se compliquer par diffusion à distance du foyer infectieux initial.

Plusieurs facteurs expliquent la fréquence et la gravité des infections à *S.aureus*, le caractère ubiquitaire de la bactérie, la multi résistance de certaines souches aux antibiotiques. Il s'agit des facteurs de virulence. Les staphylocoques ont en effet des capacités de sécrétion de facteurs d'adhésion, d'enzymes de résistance ou encore de toxines [101].

5. *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis est une bactérie en forme de bâtonnée à Gram négatif, est connue pour sa production d'uréase. *P.mirabilis* peut être trouvé dans une grande variété d'environnements, y compris le sol, les sources d'eau, et les eaux usées, mais il s'agit principalement d'un commensal du tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal. Bien que la bactérie puisse causer diverses infections humaines, notamment celles des plaies, des yeux, du tractus gastro-intestinal et des voies urinaires, elle est surtout connue pour les infections des voies urinaires cathétisées [102–104].

V. Résistance bactérienne

Pour échapper à l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont développé de très nombreux mécanismes biochimiques de résistance, associés à une grande ingéniosité génétique pour les acquérir et les diffuser.

D'autre part, des résistances peuvent survenir sur certains germes par mutation ou acquisition de nouveau matériel génétique transporté par des éléments mobiles comme les plasmides et les transposons.

Les quatre mécanismes principaux d'acquisition des résistances sont : l'inactivation de l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique, réduction de la perméabilité du germe à la molécule antimicrobienne, et enfin les pompes à efflux d'antibiotiques (**figure 8**). Ces quatre mécanismes doivent agir de manière synergique pour produire une souche résistante, car un mécanisme seul ne serait pas suffisant [105].

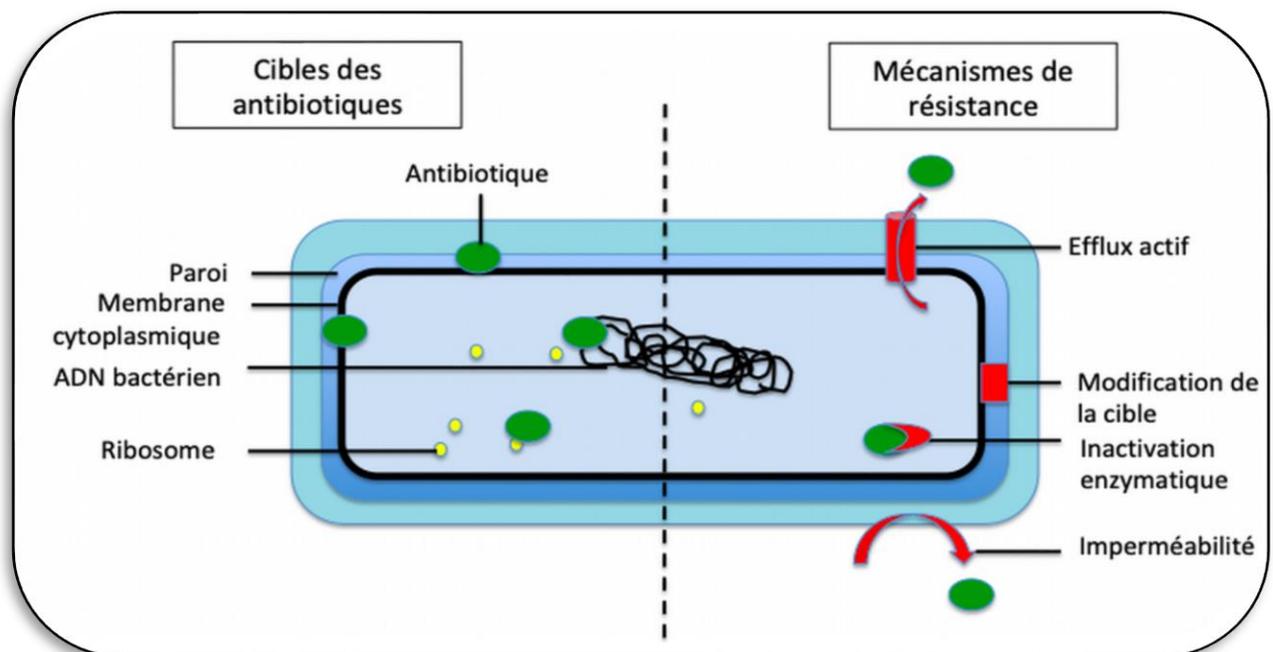


Figure 8 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

1. Inactivation de l'antibiotique

Les bêta-Lactamase, exemple d'inactivation d'antibiotique sont des enzymes qui hydrolysent l'anneau bêta-lactame contenu dans certains antibiotiques comme les pénicillines.

Découverte pour la première fois sur le staphylocoque aureus, les bêta-lactamases sont naturellement sécrétées par les organismes Gram-négatifs.

2. Modification de la cible de l'antibiotique

La modification de la perméabilité membranaire bactérienne à l'antibiotique pourrait agir d'une manière synergique avec les mécanismes cités ci-dessous dans l'acquisition de la résistance bactérienne. Ce mécanisme est observé dans les résistances de certaines bactéries Gram négatif (*P. aeruginosa...*) aux antibiotiques [106, 107].

3. Pompe à efflux d'antibiotiques

Les pompes à efflux servent à déplacer les molécules d'antibiotiques lors de l'organisme bactérien avant qu'ils ne commencent à agir. Ce mécanisme peut être observé dans la résistance du *Pseudomonas aeruginosa* aux, céphalosporines, , tétracyclines, pénicillines, chloramphénicol et fluoroquinolones [108].

Chapitre IV : Anatomie du rein et effet diurétique

I. Anatomie et physiologie du rein

1. Rein

Les reins sont localisés dans la partie arrière de l'abdomen de part et d'autre de la colonne vertébrale. Chaque rein a la forme d'haricot, mesure environ 12 cm de longueur, 7cm de largeur et environ 3 cm d'épaisseur [109,110]. Chaque rein est surmonté d'une glande surrénale et relié à l'artère aorte et à la veine cave inférieure par l'artère et la veine rénale.

Le rein est formé de deux zones (**figure 9**) :

- ✓ La médullaire profonde centrale : formée par des pyramides de Malpighi dont l'extrémité interne dénommée papille. Chacune faisant saillie dans la cavité d'un petit calice.
- ✓ Le cortex : coiffe la base des pyramides de Malpighi. Constitué principalement de vaisseaux, de glomérules, et de tubes contournés.

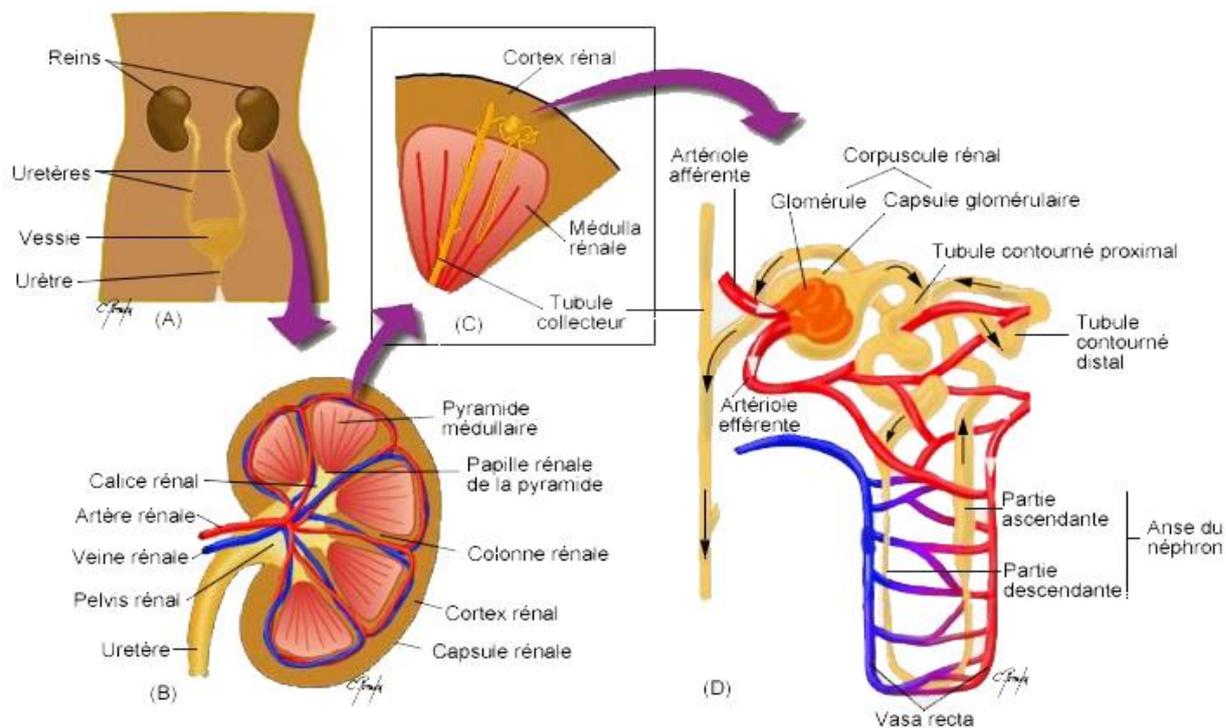


Figure 9 : Anatomie du parenchyme rénal

2. Néphron

Chaque rein est constitué environ de 1200000 néphrons, le néphron est l'unité fonctionnelle du rein, sa majeure partie se trouve dans le cortex rénal. Chaque néphron comporte :

- ✓ **Un corpuscule rénal** : formation sphérique comprenant : le glomérule, capsule de Bowman, chambre de filtration, pôles vasculaire et urinaire.
- ✓ **Les tubules rénaux** permettent d'une part de transporter l'urine du glomérule vers le tube collecteur et d'autre part la réabsorption et la sécrétion de certaines molécules.
- ✓ **Le glomérule** C'est un réseau de capillaires de forme sphérique enveloppé par la capsule de Bowman qui est formée par deux feuillets : un feuillet viscéral (int) au contact du glomérule, et l'autre pariétal (ext) au contact du tissu conjonctif du rein. Ces deux feuillets limitent la chambre de filtration cette dernière entoure le glomérule, et contient l'urine primitive qui s'écoule par le pôle urinaire vers le tube contourné proximal (TCP).
- ✓ **Le tube contourné proximal** : se localise à la sortie de la capsule de Bowman et reçoit l'urine primitive évacuée au pôle urinaire du corpuscule les cellules du tube contourné proximal (TCP) sont des cellules épithéliales cubiques. Caractérisées par deux pôles : **pôle apical** nombreuses microvillosités formant une bordure en brosse contenant des pompes ioniques et des transporteurs membranaires. Et le **pôle basal** invagination de la membrane plasmique contenant de nombreuses mitochondries dont l'activité ATP synthase est nécessaire au fonctionnement des pompes ioniques et des transporteurs.
- ✓ **L'anse de Henlé** : segment en forme de U. Il est formé de deux branches (descendante et ascendante). L'épithélium de l'anse grêle de Henlé est pavimenteux, et contient peu d'organites.
- ✓ **Le tube contourné distal (TCD)** : ce tube comporte deux portions : une droite c'est la continuité de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, et l'autre portion contournée qui se termine dans un canal collecteur.

II. Différentes fonctions du rein

Le rein est un organe vital vue ses multiples fonctions indispensables pour l'organisme.

1. Filtration glomérulaire

Le glomérule a pour fonction de filtrer le sang des capillaires aboutissant à la formation de l'urine primitive. Cette filtration se fait pour les molécules de petit poids moléculaire (inférieur à 70 KDa), l'eau, les électrolytes et les peptides de petite taille [104, 105].

2. Réabsorption

La réabsorption se fait dans le milieu intratubulaire. Le tube contourné proximal réabsorbe l'essentiel du filtrat glomérulaire par sa bordure en brosse qui est considérée comme un amplificateur de surface d'échange : 99% de l'eau et du sodium, 99% des acides aminés, 100% du glucose sont réabsorbés par les capillaires entourant le tube contourné proximal (TCP). Les cellules du tube contourné distale sont impliquées dans la réabsorption du Na régulée par l'aldostérone (hormone stéroïde fabriquée par la surrénale) [111].

3. Sécrétion tubulaire

La sécrétion tubulaire participe à la détoxification de l'organisme en sécrétant dans les urines des médicaments et de la créatinine (produit de dégradation de la créatine du muscle strié) qui n'est pas totalement filtrée au niveau du glomérule [112].

III. Autres fonctions du rein

- ✓ **Homéostasie** : le rein a un rôle primordial dans l'homéostasie et dans le maintien de l'équilibre et électrolytes, et acido-basique de l'organisme.
- ✓ **Erythropoïétine (EPO)** : l'érythropoïétine riche en acide sialique, synthétisé à 90% par le rein, 10% par le foie. Elle agit sur la différenciation, la prolifération et la maturation des précurseurs des hématies. Les reins régulent l'hématocrite et le volume plasmatique [113].
- ✓ **Rénine** : sécrétion exclusive par le rein (cellules de l'appareil juxta-glomérulaire). Elle réagit avec l'angiotensinogène, formé par le foie, pour produire l'angiotensine I.
- ✓ **La vitamine D** : le rein intervient dans le processus d'hydroxylation de la forme inactive de la vitamine D donnant ainsi le métabolite biologiquement actif. La vitamine D active permet l'absorption digestive du calcium [114].

IV. Diurétiques

1. Définition

Un diurétique est une substance qui provoque une augmentation de la production et l'excrétion d'urine par les reins. Ils aident les reins à éliminer l'excès d'eau et du sodium sous forme d'urine favorisant une diurèse en évitant toute rétention d'eau.

Les diurétiques représentent une des classes de médicaments les plus prescrites dans les cas d'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque, des œdèmes.

2. Classification des diurétiques

2.1. Diurétiques de l'anse

Les diurétiques de l'anse exercent leur action par inhibition du sodium et du chlore au niveau de la totalité de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Il existe une brusque augmentation de sodium arrivant au niveau du segment distal du néphron. Donc à niveau et dans le tube collecteur, une partie du sodium est réabsorbée sous l'influence de l'aldostérone [115]. On peut citer quelques médicaments connus sur le marché comme diurétiques de l'anse le Furosémide (Lasilix), Bumétanide (burinex), Péritanide (Eurelix), ces derniers ont des effets hypokaliémiants.

2.2. Diurétiques thiazidiques et apparentés

Les thiazidiques inhibent directement la réabsorption de chlorure de sodium au niveau du segment de dilution. Ils inhibent indirectement la réabsorption de calcium. Ces diurétiques ont un effet faible, ils permettent une excrétion de 5% à 10% du sodium filtré [109, 110].

2.3. Diurétiques distaux

Ces diurétiques distaux agissent au niveau du canal collecteur. Ces derniers inhibent l'absorption des ions sodium (et chlore) au niveau terminal du tube contourné distale et du tube collecteur. Ils diminuent la sécrétion de potassium et de protons et sont donc hyperkaliémiants [118].

V. Quelques plantes à effet diurétique

Depuis l'antiquité l'Homme a tendance d'utiliser les plantes médicinales et aromatiques à des fins thérapeutiques. L'organisation mondiale de la santé (OMS) indique que les traitements utilisant des plantes médicinales sont extrêmement lucratifs au niveau international et que plus de 100 pays ont mis en place une réglementation pour les produits phytothérapeutiques [1]. Les plantes médicinales et aromatiques renferment une panoplie de molécules bioactives. Plusieurs études ont montré les vertus pharmacologiques des extraits de plantes (PAM) [119–122].

Une étude faite par Chakraborty et *al* [123] pour évaluer le potentiel diurétique de l'extrait du thé vert seul et combiné avec le hydrochlorothiazide. Les résultats prouvent que le thé vert à faible ou forte doses présentait un potentiel diurétique important. Ce potentiel est meilleur comparé au médicament seul. Par ailleurs, l'extrait de la tige de *S. brachyanthera* pouvait augmenter le débit urinaire chez les rats wistar par rapport à ceux du groupe traité par le furosémide, ce qui prouve l'effet diurétique de la plante [124].

Une étude faite pour évaluer l'effet diurétique de l'extrait méthanolique de *Piper glabratum* du Brésil. Les résultats suggèrent que l'extrait présente des propriétés diurétiques importantes lorsqu'il est administré à des rats avec une dose de 30 mg / Kg, mais cet extrait a montré une toxicité hépatique importante et mortelle s'il est administré à forte doses [125].

Le traitement en une seule dose par l'extrait aqueux des feuilles de *F. glumosa* camerounaise a considérablement augmenté le volume urinaire pendant 24 heures après l'administration, il y a aussi augmentation des électrolytes Na⁺, K⁺ et Cl⁻ ce qui a provoqué une alcalinisation de l'urine ce qui a mis en évidence un effet inhibiteur de l'anhydrase carbonique et de la salurétique. Ces résultats confirment l'utilisation traditionnelle dans le traitement de l'hypertension et soulignent l'importance de la conservation des connaissances locales ainsi que la conservation de la biodiversité camerounaise [126].

Chapitre V : Monographie des plantes étudiées

I. *Laurus nobilis*

Consacré à Apollon et Esculape « dieux de la santé et de la médecine » chez les grecs, en couronnant les empereurs et les héros chez les romains, le laurier noble jouit d'une place importante tant dans le domaine mythologique, culinaire et médicinale depuis l'antiquité.

1. Classification

Règne : Plantes

Sous règne : Plantes vasculaire

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Laurales

Famille : Lauracées

Genre : *Laurus*

Espèce : *Laurus nobilis* L.



Figure 10 : les feuilles du *Laurus nobilis* L

2. Description botanique

Le laurier est un arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10 m de hauteur à croissance lente, et au tronc droit ramifié dès la base avec un sommet conique, et s'arrondissant au fil du temps. L'écorce est noire à gris foncé et lisse. Ces branches remontent en oblique avec des jeunes pousses fines, glabre et brun rougeâtre dont les bourgeons sont étroits verts rougeâtre

et longs de 0.2 à 0.4 cm [127]. Le feuillage est persistant avec des feuilles aromatiques simples, alternes et coriaces dont le pétiole mesure de 2 à 5 cm, longues de 5 à 12 cm et large de 2 à 6 cm. Elles sont lancéolées, légèrement ondulées et entaillées au bord, de couleur vert foncé, brillantes sur la face supérieure et verte clair au-dessous avec des nervures latérales pennées et rougeâtres.

Les fleurs sont dioïques de 0.4 à 0.8 cm unisexués avec une couleur jaune verdâtre, à périanthe simple soudé à la base, groupé en 4 à 6 ombrelles. Les fleurs mâles possèdent 8 à 12 étamines rudimentaires et les fleurs femelles sont dotées d'un ovaire hypogyne à un compartiment avec un stigmate en trois parties.

Le fruit est une baie ovoïde, soutenue par le tube périanthaire peu dilaté. De 2 cm de longueur à 1cm de largeur, le fruit est noir vernissé renfermant une seule graine libre. Le mésocarpe charnu renferme de l'huile et des cellules à huile essentielle. Les cotylédons épais sont également riches en lipides [128].



Figure 11: Aspect morphologique de *Laurus nobilis* (Beloued, 2005).

3. Répartition géographique

Le laurier est la seule espèce représentant la famille Lauracées dans la région méditerranéenne d'où elle est originaire. Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale et pour la production commerciale dans beaucoup de pays tel que

l'Algérie, la Turquie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux [35].

4. Composition chimique

Les feuilles de *Laurus nobilis* renferment plusieurs substances actives dont les huiles essentielles. Cette dernière représente 1 à 3% du poids sec, le 1-8cinéol (eucalyptol est le composé majoritaire avec 30 à 80%, ainsi que l'existence de plusieurs composés terpéniques : linalol (9 à 16%), sabinène, eugénol, pinène et terpinène [22,129,130]. Autre, on trouve dans les feuilles également des alcaloïdes, aporphiniques comme la cryptodorine ou l'actinodaphinine, des flavonoïdes polaires, dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et catéchine et ses sesquiterpènes lactone [35].

5. Utilisation des feuilles du *Laurus nobilis*

Les feuilles du laurier sont utilisées comme assaisonnement dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice culinaire (en potage, soupe, sauce...) et aromatisant dans l'industrie alimentaire. Traditionnellement le laurier est utilisé par voie orale dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif comme le ballonnement épigastrique, la digestion lente.

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'antihémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans les morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac. En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants.

6. Quelques propriétés pharmacologiques du *Laurus nobilis*

- *Laurus nobilis* est une plante qui est connue par son effet antioxydant qui est prouvé par plusieurs études [129, 131], d'où son utilisation en industrie alimentaire pas seulement en tant qu'arôme mais aussi pour préserver les aliments contre la détérioration et l'oxydation [132].
- L'huile essentielle extraite des feuilles du laurier sont très riches en métabolites secondaires, ce qui leur confère un pouvoir antibactérien très puissant [130,133–136].
- Une étude est faite par Speroni et al [137] pour évaluer l'effet gastroprotecteur des extraits des feuilles du *Laurus nobilis*, ils ont constaté qu'une protection efficace est

assurée par les extraits bruts chloroformiques et méthanoliques après administration orale, cette protection est confirmée par des coupes histologiques.

- L'extrait aqueux des feuilles de laurier est doué d'une forte activité cicatrisante très efficace des plaies chez le rat [138].
- Une étude est faite pour évaluer l'effet des feuilles du *Laurus nobilis* sur le diabète et le bilan lipidique [139]. Les auteurs ont constaté que les feuilles du laurier ont réduit la glycémie avec des diminutions significatives allant de 21 à 26% après 30 jours de traitement, de même ils ont constaté une diminution importante du cholestérol, LDL et HDL.
- Les feuilles du laurier ont une valeur nutritionnelle très élevée liée à la forte teneur en protéines, sucres libre, acide organiques, AGPI et tocophérols [140].

II. *Syzygium aromaticum*

1. Historique

Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales. Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique locale [141].

Autrefois on soignait les maux de dents en mâchant un ou deux de girofle. Aujourd'hui les techniques se sont améliorées : par le mélange d'oxyde de zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilisé en tant que matériau de restauration temporaire permettant une anesthésie de la pulpe dentaire. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires.

2. Origine et description botanique

Le giroflier (**figure12**) est originaire d'Indonésie, cultivé à Madagascar, Caraïbes et Amérique Sud. C'est un grand arbre d'une hauteur moyenne de 10 à 12 m, à port pyramidal et au tronc gris clair ridé. Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. L'inflorescence comprend de petites cymes (4-5 cm) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de trois à cinq petites fleurs parfumées, aux calices tubulaires

blanc cassé, puis rouge (quatre sépales rouges charnus et persistants) et à la corolle blanc rosé (quatre dialypétales blanc) [80].



Figure 12 : Feuilles et fleurs du giroflier et quelques boutons floraux

3. Taxonomie

Tableau 1 : taxonomie du *Syzygium aromaticum*

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta (Phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>S.aromaticum</i>

Nom commun : Giroflier. Nom anglais : Clove buds. Nom arabe : Kourounfoul القرنفل

4. Composition chimique de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum*

Les clous de girofles sont très riches en huile essentielle (8 à 20ml/100g de matière sèche), cette dernière constitue un mélange de composés différents, dont les constituants primaires sont : eugénol (49 – 90 %), β -caryophyllène (4 – 21 %) et l'acétate d'eugényle (0.5 – 25 %). Ils existent d'autres composants d'infimes quantités [46, 142–144]. Le pourcentage de ces constituants varie selon l'origine, la méthode d'extraction et le climat.

5. Propriétés biologiques et pharmacologiques du giroflier

- **Activité antioxydante :** plusieurs études ont confirmé le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle du *S. aromaticum* à réduire les radicaux libres et par conséquent la prévention de certaines maladies chroniques, et aussi la préservation des aliments dans le domaine alimentaire [145–147].
- **Activité antibactérienne :** l'huile essentielle du clou de girofle exerce des effets inhibiteurs sur la croissance d'une large gamme de souches bactériennes ; Gram-positives et aussi bien sur Gram-négatives [46,148,149]. Cette activité serait attribuée à son composé majoritaire ; l'eugénol.
- **Activité antifongique :** l'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les fongiques pathogènes opportunistes comme *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* [150].
- **Activité antivirale :** l'huile essentielle de *S. aromaticum* a un effet inhibiteur sur : Herpès simplex virus, elle exerce aussi des effets sur les virus à plusieurs niveaux ; sur la fusion des cellules virale, anti-HCV protéase dans le traitement de l'hépatite virale, et par inhibition de la synthèse de l'ADN virale [150].
- **Activité anti-inflammatoire :** cette huile provoque une réduction de l'inflammation induite par injection de carragénine au niveau de la patte du rat, inhibition des prostaglandines, leucotriènes, du chimiotactisme des leucocytes ainsi une inhibition de la synthèse des radicaux libres par les leucocytes [43,151].
- **Activité anticancéreuse :** une étude a été réalisée par Kumar et al 2014 [42] pour évaluer in vitro l'activité cytotoxique des clous de girofles vis-à-vis des lignées cellulaires de cancer du sein humain MCF-7. Ils ont constaté que l'huile essentielle des clous de girofle est un produit naturel avec une excellente cytotoxicité contre des sources prometteuses pour le développement d'agents anticancéreux.

PARTIE II :

MATERIELS ET

METHODES

I. Matériels

1. Matériels biologiques

1.1. Critères de choix des plantes

Pour la valorisation de la médecine traditionnelle et vu l'importance de la biodiversité des plantes. On a étudié deux espèces végétales : *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* appartenant à la famille des Lauraceae et Myrtaceae respectivement. Le choix de nos deux plantes s'est basé sur une étude bibliographique et selon la connaissance de la population de leurs usages en médecine traditionnelle. Ainsi, les critères de sélection des plantes aromatiques et médicinales objet de notre étude sont les suivants :

- Abondance de *Laurus nobilis* dans la région de Larach
- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies infectieuses.
- La non toxicité des plantes, vu qu'elles sont utilisées dans les préparations culinaires
- Leurs richesses en substances aromatiques (huiles essentielles) et polyphénols.

1.2. Matériel végétal

Laurus nobilis : les feuilles de l'espèce *laurus nobilis* ont été récoltées en Avril-Mai 2016 de Larache située dans la région de Tanger-Tétouan-Al Hocéma au Nord du Maroc. L'identification botanique de l'espèce *Laurus nobilis* a été réalisée par le Professeur Amina Bari ; botaniste au département de biologie, Faculté des sciences Dhar Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fés, Maroc.

Le matériel végétal recueilli est séché dans du papier journal à température ambiante et à l'ombre pendant quinze jours, afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules. Une quantité de ces feuilles sèches sont broyées à l'aide d'un broyeur. La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité jusqu'à son utilisation.

Syzygium aromaticum : les boutons floraux de l'espèce du *Syzygium aromaticum* ont été achetés du supermarché de la ville du Dakhla située au Sud du Maroc. Ces boutons sont identifiés au département de biologie, Faculté des sciences Dhar Mahraz, et sont conservés à l'abri de l'humidité et de lumière jusqu'à leur utilisation.

1.3. Matériel animal

Les animaux utilisés dans ces expérimentations sont des rats mâles, adultes de souche *Wistar Albinos*, pesant entre 180 et 220g (au début de l'expérimentation), issus par élevage au niveau de l'animalerie du département de la biologie à la faculté des sciences Dhar El Mahraz, Fés. Les rats sont hébergés (logés) dans des cages qui regroupent six rats par cage. Les rats sont maintenus à une température ambiante et une photopériode de 12h/12h, ils recevaient du cicalim comme alimentation avec accès libre à l'eau. Toutes les expériences ont été menées conformément aux principes internationaux reconnus pour le soin et hygiène d'utilisation des animaux de laboratoire.

1.4. Souches bactériennes

Les tests antibactériens ont été effectués sur des souches bactériennes répertoriées de laboratoire : *Escherichia coli*, *Klebsielle pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* (**tableau 2**). Les souches utilisées dans notre étude sont des isolats cliniques, isolées des nouveau-nés hospitalisés en réanimation du service pédiatrique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hassan II, Fés. Ces souches ont été choisies pour leur pouvoir pathogène et leur résistance à divers antibiotiques utilisés par les médecins pour le traitement des infections nosocomiales pédiatrique.

Tableau 2: Les isolats cliniques utilisés dans les tests antimicrobiens

Souches bactériennes	Gram
<i>Escherichia coli</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif

1.5. Milieu de culture

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, le milieu LB a été utilisé comme milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes, pour obtenir des colonies jeunes des bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Pour l'activité antibactérienne le bouillon et la gélose Muller Hinton ont été utilisés. En effet il s'agit d'un milieu non sélectif et qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques.

De plus, tout le nécessaire d'épreuve (pipettes, micropipettes, boîte de pétrie, etc) pour les tests bactériologiques ont été utilisés pour la réalisation des activités microbiologiques.

1.6. Antibiotiques

Les disques d'antibiotiques utilisés comme références pour les essais de diffusion sont : Imipenème (IPM), Cefotaxime (CTX), Kanamycine (K), Pristinamycine (PT).

- ✓ Imipenème : est une bêta-lactamine de la classe des carbapénems également connu sous le nom de N-formimidoylé thiénamycine. Il s'agit d'un dérivé semi synthétique de la thiénamycine, la molécule mère produite par *Streptomyces cattleya*, une bactérie filamenteuse.
L'imipenème exerce une action bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif par sa liaison aux protéines fixatrices de la pénicilline (PFP).
- ✓ Kanamycine : est un antibiotique de la classe des aminosides dont l'utilisation est limitée notamment à certaines formes de tuberculose. Il inhibe la translocation et la synthèse de protéines en se liant à la sous unité ribosomale 70S, et il agit sur un large spectre de bactéries Gram+, Gram- et mycoplasme.
- ✓ Cefotaxime : est un antibiotique de la famille des bêtalactamines, du groupe des céphalosporines de 3ème génération. Il inhibe la production de la paroi cellulaire et il est un inhibiteur sélectif de la synthèse de peptidoglycanes.

- ✓ Pristinamycine : est un antibiotique appartenant à la famille des streptogramines (synergistines), c'est un mélange de deux peptides utilisés comme antibiotique.

II. Méthodes

1. Méthodes d'extraction

1.1. Hydrodistillation

Les huiles essentielles du *Laurus nobilis* et du *Syzygium aromaticum* ont été extraites par hydrodistillation. C'est une technique qui consiste à mettre la plante dans l'eau et à faire bouillir le mélange. Dans un ballon en verre d'un litre ; 500 ml d'eau distillée sont versés puis laissée bouillir sur un chauffe ballon, 100g de chaque échantillon végétal est directement versé après l'ébullition d'eau ; sous l'action de la chaleur, les cellules des feuilles éclatent et libèrent des composés organiques odorantes et volatiles. Quelques billes de verre ont été rajoutées dans le ballon dans le but d'homogénéiser la température du système. La vapeur d'eau entraîne avec elle l'huile, passe dans le réfrigérant où l'ensemble se condense. À la sortie du réfrigérant, le liquide de condensation est récupéré dans un flacon en verre figure 13. L'huile essentielle du laurier est légère a été récoltée au-dessus du distillat, contrairement à celle du clou de girofle est récoltée au-dessous du distillat vu qu'est lourde. L'opération de distillation dure environ 3heures. L'échantillon d'huile essentielle est pesé pour déterminer le rendement puis stockée à 4°C à l'abri de la lumière, pour être analysé par FID et CG-SM.



Figure 13 : Montage expérimental d'hydrodistillation

1.2. Macération

L'extraction de chaque 10 g de poudre du matériel végétal a été réalisée par macération par 50 ml des solvants suivants : éthanol, acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée sous agitation pendant 48 h à température ambiante et à l'abri de la lumière ensuite l'extrait est récupéré par filtration sur papier Wattman. Chaque extrait a été transféré dans un ballon préalablement pesé et concentré au rota-vapeur à 70°C. Les résidus ainsi obtenus ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservé à - 4° C jusqu'à leur utilisation.

1.3. Extraction par soxhlet

L'extraction par soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. On place 5 g de notre échantillon végétal dont on souhaite extraire un de ses substances constitutives dans la cartouche de cellulose, puis dans le réservoir de soxhlet. On remplit le ballon avec un volume de 100 ml du solvant (éthanol, méthanol, acétate d'éthyle ou l'eau distillée) et surmonter l'extracteur d'un réfrigérant. A l'aide d'une chauffe ballon, on porte le solvant à ébullition. Celui-ci passe par la tubulure et est condensé par le réfrigérant. Il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire. Le solvant et la substance à extraire sont entraînés dans le ballon, le réservoir se remplit et se vidange automatiquement. Et pour une meilleure extraction on réalise plusieurs cycles tel que décrit précédemment (**figure 14**).



Figure 14 : montage expérimental de l'appareil soxhlet

2. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

2.1. Analyse chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

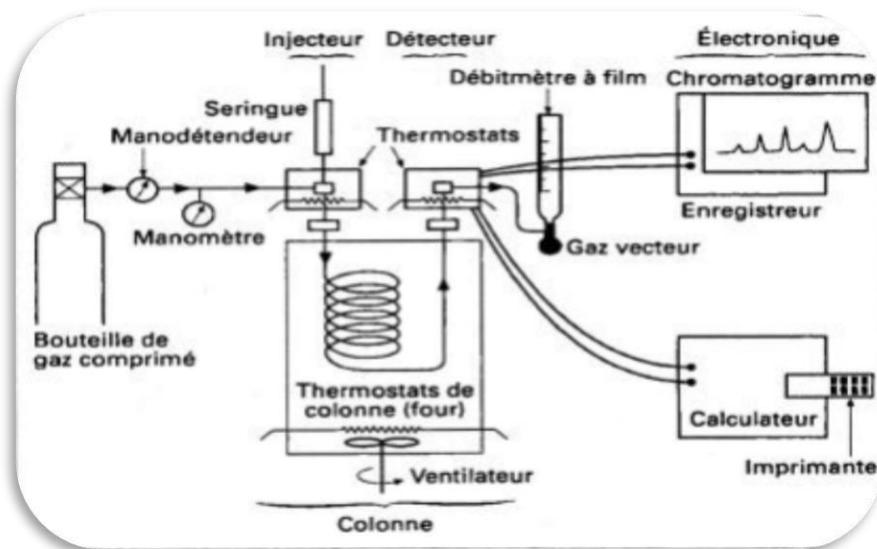
Les analyses chromatographiques des huiles essentielles sont effectuées à la cité d'innovation de Fés. L'huile a été diluée avec l'hexane (taux de dilution : 10/100 : v/v). 1microlitre de l'échantillon a été prélevé pour l'analyse par le biais d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC (ULTRA / N 20062969, Thermo Fisher). La chromatographie en phase gazeuse est équipée d'une colonne HP-5MS non polaire capillaire en silice fondue (60m x 0,32mm, épaisseur du film 0,25mm). Les conditions opératoires sont : la température du four de programme commence à partir de 50 ° C (2 min) à 280 ° C à 5 ° C / min et la température finale maintenue pendant 10 min ; 21 :20 "mode split » ; l'azote N₂ est le gaz vecteur, (le débit de 1 ml / min ; température de l'injecteur et le détecteur (FID) a été fixée à 250 °C et 280 °C, respectivement.

2.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est la méthode de référence pour la séparation et l'identification des constituants volatils d'une HE Lehotay et *al* 2002. Il repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase

stationnaire (**figure 15**). L'échantillon liquide (dans notre cas les huiles essentielles) est transformé sous forme gazeuse au niveau de l'injecteur par chauffage (nous aurons à choisir une température d'injection).

Il est alors pris en charge par un vecteur gazeux inerte (dans notre cas, l'hélium). Ce dernier entraîne l'échantillon gazeux et le fait pénétrer dans une colonne de type capillaire en silice fondue enfermée dans un four à température programmable. Après avoir traversé la colonne chromatographique chaque constituant du mélange analysé sort à un temps (temps de rétention) qui diffère de celui des autres constituants. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par une succession continue d'équilibres entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire.



*Figure 15 : Principe de la chromatographie en phase gazeuse
(Tranchant, 2004)*

2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

La combinaison de la spectrométrie de masse et de la chromatographie en phase gazeuse offre de multiples possibilités analytiques. La spectrométrie de masse a connu un essor important ces dernières années avec la mise au point d'appareils de technologies variées dont le choix est adapté aux applications et aux techniques de séparation utilisées (**figure 16**).

Le principe consiste à provoquer par une méthode appropriée l'ionisation d'une molécule et sa dissociation éventuelle en fragments ionisés puis à déterminer la nature et l'abondance de l'ensemble des ions formés. Dans le cas de notre travail, Les huiles essentielles ont été analysées par un CPG-SM de modèle Perkin Elmer Clarus MS 500 équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ayant une phase stationnaire apolaire de type HP-5MS (60 m x 0.32 mm, 0,25 μm épaisseur de film). Un volume de 1 μl du mélange HE-Hexane 10% a été injecté dans la colonne. L'hélium et le gaz vecteur véhiculent à un débit de 1 ml/min. La Programmation en température du four : 40°C durant 2 minutes, puis 2°C/min jusqu'à 250°C et 10 minutes à 250°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 260°C. On a appliqué un split de 10 : 100. Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

L'identification des composés a été réalisée en comparant leurs spectres de masse à ceux de la base de données (NIST-MS), de leur temps de rétention et de quelques données bibliographiques [152].

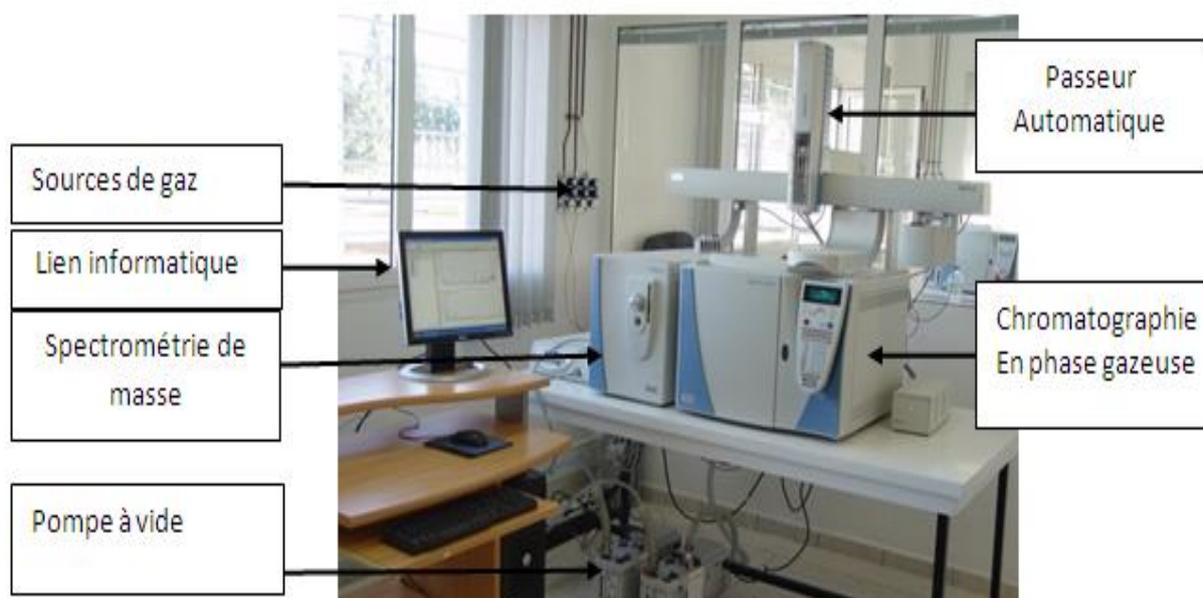


Figure 16 : Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (photo prise à la Cité d'innovation Fès)

3. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

3.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les bactéries à tester ont été ensemencées sur des boîtes de pétrie contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches bactériennes utilisées puis incubés à 37°C pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après ce temps d'incubation, une à deux colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant 2ml d'eau physiologique 0.9% stérile puis agiter au vortex. On obtient ainsi une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland dont la densité optique de cette dernière est de 0.08 à 0.1 à 625 nm, soit environ 10^8 UFC/ml [153].

3.2. Antibiogramme en milieu solide

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise. Le but de la réalisation d'un antibiogramme prédit la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans un but essentiellement thérapeutique. Il sert également à :

- ✓ La surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.
- ✓ L'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide par la méthode de disque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012). Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotique [154,155].

3.3. Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques consiste à utiliser des disques de papier wattman n°3, de 6 mm de diamètre imprégné de différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton Agar (MHA) uniformément ensemencée avec une suspension des bactéries à étudier. Chaque antibiotique

ou substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante [156]. La mesure des zones d'inhibition pour la lecture est effectuée à l'extérieur de la boîte fermée à l'aide d'une règle graduée. Elle est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures différentes de diamètre.

3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Elle a pour but de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminé par la technique de micro-dilution en milieu liquide dans des plaques de 96 puits [157,158]. Des séries de dilutions des huiles essentielles successives en cascade 1/2 dans DMSO (10%) allant de 500 à 0.97 µg/ml. A chaque puit sont ajoutés 50µl de suspensions bactériennes ont été préparées et diluer dans de l'eau physiologique pour avoir une concentration finale de 10⁶ UFC/ml. Le contrôle positif est préparé de 100µl du MHB et 50µl d'inoculum. Quant au négatif il est préparé de 50µl de l'huile essentielle en solution et 100µl du MHB sans l'inoculum. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. 20µl de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) qui est un indicateur de la croissance bactérienne, il est réduit en formazane insoluble à l'intérieur de la cellule, cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge. Après 2h d'incubation, la CMI correspond à la concentration la plus faible qui ne produit pas de couleur rouge. Donc la CMI est valeur indicatrice du pouvoir bactériostatique d'un antibactérien.

3.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB a été déterminée par étalement du 100µl du contenu de chaque puits de concentration supérieure ou égale à la CMI sur milieu solide. A partir de la CMI, la plus petite concentration, qui ne laisse survivre qu'au plus 0.01% des bactéries [157]. La CMB est une valeur indicatrice du pouvoir bactéricide d'un antibactérien.

4. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées a été réalisée par trois méthodes : le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), le piégeage du radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et la réduction du phosphomolybdate [ou activité antioxydante totale (AAT)]. Le principe de ces tests repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

4.1. Test de la réduction du fer (FRAP)

La capacité d'une substance antioxydante à réduire le fer a été déterminé par la méthode décrite par *Bougandoura et al* [159]. Cette méthode est basée sur l'habilité des extraits à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanide de potassium en ion ferreux (Fe^{2+}). En effet, 100 μl de l'extrait (HE) à différentes concentrations ont été mélangés avec 500 μl d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 500 μl d'une solution de ferricyanure de potassium à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min, ensuite, 100 μl d'acide trichloroacétique (10%), 500 μl d'eau distillée et 100 μl FeCl_3 (0.1%) ont été additionnés.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : BHT dans les mêmes conditions que les échantillons. Les valeurs de l' IC_{50} ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

4.2. Test de piégeage du radical libre DPPH

La capacité d'une substance antioxydante à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl a été estimée selon la méthode décrite par Boulanouar et *al* [160] avec modification. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 0.005 g de DPPH dans 200 ml de l'éthanol absolu. Ensuite, 0.1 ml de l'échantillon à différentes concentrations ont été mélangés avec 1.5ml du réactif DPPH. Après agitation par le vortex. Les tubes sont placés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm et les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant standard. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

% d'activité antiradicalaire = [(Abs contrôle-Abs échantillon) /Abs contrôle] *100.

Les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées graphiquement par régression linéaire.

4.3. Capacité antioxydante totale (CAT)

Le test de phosphomolybdate (PPM) a été réalisé selon la méthode décrite par Amezouar *et al* [161] avec quelques modifications. Cette technique est basée sur la réduction des molybdates en molybdène en présence d'un antioxydant avec la formation d'un complexe vert qui absorbe à 695 nm.

Le réactif de phosphomolybdate a été préparé à partir d'un mélange d'acide sulfurique (25 ml dans 225 ml d'eau distillée), phosphate de sodium (3.28 g dans 250 ml H₂O) et du molybdate d'ammonium (3.7 g dans 250 ml H₂O). Ensuite 100 µl de l'extrait et du standard ont été mélangés avec 1ml du réactif de phosphomolybdate. Après 1h30 d'incubation au bain-marie à 96°C. L'absorbance est mesurée à 695 nm.

La capacité antioxydante est calculée à partir d'une gamme établie avec l'acide ascorbique et est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière brute.

5. Détermination de la teneur en composés phénoliques

5.1. Estimation quantitative des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des différents extraits et huiles essentielles des plantes étudiées a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu [162] qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant ainsi à la formation des oxydes bleus de tungstène et de molybdène que l'on détermine par colorimétrie et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Brièvement, 0.5 ml de l'échantillon ont été mélangés avec 2.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0.2 N) et 2 ml de carbonate de sodium (3.75 g dans 50 ml d'eau distillée). Après incubation pendant 2 h à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la courbe d'étalonnage linéaire $y=11.554x$, établie avec le standard étalon l'acide caféique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide caféique par gramme ou microgramme de matière brute.

5.2. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par Matic et al [163] avec modification. 1ml de chaque échantillon avec des dilutions convenables a été ajouté à 0.3 ml d' $AlCl_3$ (2% dans l'éthanol) et 0.3 ml de $NaNO_2$ (1%). Après 1h d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 510 nm.

La quantification des flavonoïdes totaux est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=1.9368x-0.0125$) réalisé par un standard étalon le rutin à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de rutin par gramme ou microgramme de la matière brute.

5.3. Estimation quantitative des flavones et flavonols

Le contenu en flavones et flavonols a été quantifié selon la méthode décrite Miguel et al [61] avec modification. Pour 0.5 ml de chaque échantillon avec les dilutions convenables a été ajouté 0.5 ml d'une solution d' $AlCl_3$ (2%). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue à 430 nm après une heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

La concentration des flavones et flavonols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme ou microgramme de matière brute.

6. Evaluation de l'effet protecteur du stress oxydatif par H_2O_2 chez les rats Wistar

6.1. Préparation de l'extrait des plantes étudiées

L'extraction des substances bioactives des deux plantes étudiées (*Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum*) est réalisée par une décoction dans de l'eau distillée. L'extrait aqueux obtenu est ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre, et centrifugé à 4000 trs pendant 10 min est

le filtrat est évaporé en utilisant un évaporateur. Au cours de l'expérience l'eau distillée a été ajoutée pour l'obtention de la concentration de l'extrait des deux plantes qui a été donné aux animaux quotidiennement.

6.2. Induction du stress oxydatif

Pour évaluer l'effet protecteur des deux plantes étudiées [*Laurus nobilis* (LN) et *Syzygium aromaticum* (SA)], on a induit le stress oxydatif par H₂O₂ (1%) par gavage simultanément avec le traitement par les extraits pendant 15 jours. Les rats sont répartis en six groupes comme suit :

- **Groupe 01 (normaux)** : les rats de ce groupe sont traités par gavage de l'eau distillée (10 ml/ Kg/ PC) en utilisant une sonde spécifique quotidiennement.
- **Groupe 02 (contrôle)** : les rats de ce groupe sont traités par gavage de (10 ml/ Kg/ PC) de l'eau distillée et de (10 ml/ Kg/ PC) de H₂O₂ (1%).
- **Groupe 03** : ce groupe reçoit (10 ml/ Kg/ PC) de l'extrait de LN et (10ml/ Kg/ PC) de H₂O₂ (1%).
- **Groupe 04** : ce groupe est traité uniquement par (10 ml/ Kg/ PC) de l'extrait aqueux de LN.
- **Groupe 05** : les rats de ce groupe sont traités par (10ml/ Kg/ PC) de H₂O₂ (1%) et (10ml/ Kg/ PC) de l'extrait aqueux de SA.
- **Groupe 06** : ce groupe reçoit (10ml/ Kg/ PC) de l'extrait de SA seul.

6.3. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins ont été effectués par sacrifice des rats endormis avec diétyl éther. Les échantillants sanguins ont été ensuite centrifugés à 4000 tours/minute pendant 15minute puis les sérums obtenus ont été mis à congélation à -20°C jusqu'au jour des dosages. On a analysé les paramètres suivants ; la créatinine, urée plasmatique, albumine et protéine. On a mesuré aussi l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST) et la lactate déshydrogénase (LDH) pour évaluer la fonction hépatique.

6.4. Etude histologique

L'étude a été menée au sein du laboratoire d'anapathologie au centre hospitalier universitaire Hassane II Fès. Les reins et les foies ont été prélevés, soumis à une observation à

l'œil nu pour repérer les lésions macroscopiques, puis fixés au formaldéhyde (10%). Par ailleurs, l'examen histologique par la méthode d'inclusion à la paraffine, nous a permis d'observer les différentes altérations morphologiques et structurales qui accompagnent l'administration des extraits aqueux du *Laurus nobilis* et du *Syzygium aromaticum* ainsi que du H₂O₂. L'étude microscopique a été réalisée sur des lames préparées par des techniques histologiques classiques dont la procédure peut se résumer dans les étapes suivantes :

- **Fixation** : pour chaque lot, les organes prélevés sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10%.
- **Déshydratation** : elle permet de substituer l'eau intracellulaire par l'alcool. Elle s'effectue dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 80%, 85%, 90%, 95% et 100%) de 40 minutes chacun. Les tissus sont ensuite éclaircis et dégraissés dans des bains de toluène.
- **Inclusion** : les pièces des organes sont placées dans des piluliers contenant la paraffine fondue. L'imprégnation dure une nuit à l'étuve à 60°C. Ensuite, à l'aide des barres de Leukart, les pièces sont conservées dans des blocs de paraffine.
- **Coupes** : les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome de type rotatif à épaisseur de 5µm. Le ruban de coupes obtenu est étalé sur des lames humidifiées à l'éthanol, puis dans un bain marie à 40°C contenant l'eau gélatinée. Les lames sont ensuite placées à l'étuve à 60°C pendant 30 minutes pour assurer le déparaffinage.
- **Coloration** : la coloration se base sur la méthode Hématoxylin-éosin. Elle comporte les étapes opératoires suivantes :
 - Déparaffinage par le toluène.
 - Déshydratation à l'aide d'une série de bains d'alcool (100%, 95%, 70%) de 5minutes chacun.
 - Rinçage à l'eau courante jusqu'à l'incoloration.
 - Coloration à l'hématoxyline durant 8 minutes.
 - Lavage à l'eau pendant 5 minutes.
 - Coloration à l'éosine pendant 5 minutes.
 - Lavage à l'eau pendant 3minutes
 - Déshydratation dans 3 bains d'alcool absolu, puis éclaircissement par le toluène.

- **Montage** : les lames sont ensuite montées entre lames et lamelles à l'aide d'une solution Eukit et sont observées sous microscope optique avec différents grossissements.

7. Evaluation de l'effet diurétique des deux plantes étudiées

7.1. Traitement des rats

Groupe 1 : les rats ont reçu de l'eau distillée à raison de 10 ml/ kg du poids corporel (PC).

Groupe 2 : les rats ont reçu par gavage l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* à raison de 50mg/ Kg du PC.

Groupe 3 : les rats ont reçu par gavage l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* à raison de 50 mg/ kg du PC.

Groupe 4 : les rats ont reçu par gavage le furosémide (lasilix), médicament de référence à une dose de 15 mg/ kg PC.

7.2. Conception expérimental

La diurèse des rats est suivie pendant neuf jours, l'urine de 24 heures est collectée quotidiennement et un échantillon est prélevé et stocké pour analyse. A la fin de l'expérience, les rats ont été sacrifiés sous anesthésie totale et trois échantillants de sang ont été prélevés sur chaque rat et les reins ont été prélevés et fixés dans une solution de formol à 10%.

7.3. Analyses biochimiques

L'urine obtenue de chaque rat a été analysée pour déterminer la teneur en sodium, chlorure et créatinine, tandis que le sérum de chaque rat a été analysée pour déterminer la teneur en sodium, potassium, chlorure, créatinine, urée et albumine. Et on a calculé les paramètres suivants :

$$\text{Taux de filtration glomérulaire} = \frac{U \text{ creatinine} \times V}{P \text{ creatinine}} ;$$

$$\text{Activité salurétique} = \text{Na}^+ + \text{Cl}^-$$

$$\text{Activité natriurétique} = \frac{\text{Na}^+}{\text{K}^+} ;$$

$$\text{Estimation de l'activité d'inhibition de l'anhydrase carbonique} = \left[\frac{\text{Cl}^-}{\text{Na}^+ + \text{K}^+} \right]$$

clairance osmolaire = osmolarité urinaire $\times V$ / osmolarité plasmatique;

Osmolarité plasmatique = $2 \times \text{Na}^+$; Osmolarité urinaire = $2 \times (\text{Na}^+ + \text{K}^+)$

Clairance d'eau libre

$$= \text{écoulement d'urine} \times \left(1 - \frac{\text{osmolarité urinaire}}{\text{plasma osmolarity}}\right)$$

Réabsorption d'eau libre (TCH₂O) = -CH₂O .

8. Expression des résultats et analyse statistique

Pour l'analyse statistique on a utilisé le logiciel Graphpad prism 5 software, les données étant représentées sous forme de moyennes \pm SD. La comparaison entre les groupes est déterminée par l'analyse one-way de la variance (ANOVA) suivie des tests de comparaison multiples de Tukey, $p < 0.05$ étant considéré comme significatif tout au long de l'analyse.

PARTIE III :

RESULTATS ET

DISCUSSION

Chapitre I : Analyse phytochimique et activité antibactérienne des huiles essentielles du *Laurus nobilis* L. et *Syzygium aromaticum* L.

I. Introduction

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques. Les médecins ont adopté des traitements par des antibiotiques ou l'antibiothérapie comme traitement médicaux. Suite à ces traitements, de nombreuses bactéries ont développé une certaine résistance à la plupart des antibiotiques [164–166]. C'est le phénomène de la résistance bactérienne qui est devenu un immense problème de santé publique à l'échelle mondiale [167,168].

La recherche des molécules contre les infections est devenue une des priorités pour combattre ce problème de santé publique envahissant. Certaines plantes ont été utilisées, depuis plusieurs siècles, par la médecine traditionnelle pour lutter contre les infections [169,170]. Les plantes contiennent un très grand nombre de métabolites secondaires pouvant avoir des modes d'action pharmacologiques variés voire synergique contre des agents pathogènes, d'où la nécessité de l'étude de ces molécules naturelles bioactives que contiennent les plantes qui ont un potentiel médicinal et thérapeutique [40, 118, 154]. Les HE sont utilisés en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire. Elles constituent une source potentielle de molécules bioactives [26,172,173].

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés, d'une part à la détermination de la composition chimique des huiles essentielles du *Laurus nobilis* L. et du *Syzygium aromaticum* L. par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CG/SM). Et d'autre part l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces deux HE contre des bactéries issues des infections nosocomiales pédiatriques par la méthode de diffusion sur disque.

II. Résultats et discussion

1. Composition chimique de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* L.

Les extractions par hydrodistillations des feuilles sèches du *Laurus nobilis* ont fourni des huiles essentielles ayant une coloration jaune clair avec de forte et persistante odeur. Le

rendement en HE est de 1.5%. Ce rendement est élevé comparé à ceux du laurier d'Algérie et du la Tunisie qui sont de l'ordre de 0.46% et 0.58% respectivement [132]. L'analyse chromatographique par (CG/SM) de l'huile essentielle du laurier a permis d'identifier vingt-huit composés qui représentent environ 99.98% du total de cette huile essentielle (**tableau 3**).

L'huile essentielle du laurier renferme six composés majoritaires qui sont le 1,8-cinéole (26.76%), 1- α -pinène (8.63%), linalool (7.78%), 2-carène (7.81%), α -terpineol (6.94%) et eugenyl methyl ether (6.63%) représentant ainsi 63.92% du total de l'huile essentielle. D'autres composés ont été également identifiés, mais à des taux bas tels que : α -thujen (0.87%), α -terpinolène (0.91%), α -terpinène (2.09%) et camphène (1.11%). Ces résultats sont conformes à ceux trouvés antérieurement chez le laurier collecté en Tunisie, Turquie et Algérie [132,174]. Une étude est faite sur la composition chimique du *Laurus azorica* collecté de trois régions de l'île Macaronésienne montre que le composé majeur est l' α -pinène avec une valeur allant jusqu'à 36.4% suivi de 1,8-cinéole [130].

Tableau 3 : composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de Laurus nobilis L.

Compounds	Indice de Retention (RI)	Air (%)
α -Thujen	921	0.87
1- α -pinene	930	8.63
2- α -pinene	932	1.27
Camphene	945	1.11
α -terpinene	1014	1.27
1,8-cineole	1029	26.76
γ -terpinene	1045	2.09
α - terpinolene	1063	0.9
Linalool	1080	7.78
4-terpienol	1125	1.16
Terpinen-1-ol	1126	2.99
α -terpineol	1189	6.94
Endobornylacetate	1292	1.32
1-bornylacetate	1293	1.18
Phenol	1312	0.43
2-Carene	1358	7.18
Eugenol	1367	3.98
Belemene	1511	1.2
Eugenylmethylether	1415	6.63
B-caryophyllene	1426	1.13
Sabinene	975	1.05
3-Carene	1010	1.42
Iso-eugenol	1455	1.98
Isobornyl acetate	1291	0.59
χ -Cadinene	1526	0.61
Isopsphulenol	1644	1.01
α -Spathulenol	1625	5.7
α -Cadinol	1660	3.18
Total		99.98

2. Composition chimique de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* L.

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été extraite à partir de ses bourgeons floraux secs par hydrodistillation. Cette huile est incolore et est caractérisée par une odeur forte et persistante. Le rendement qui est de 12% est concordant avec celui trouvé dans d'autres travaux [46,175].

La composition chimique de l'huile essentielle du giroflier a été déterminée par analyse chromatographique (CG/SM). Quatre composés représentant plus de 99.28 % de l'huile essentielle totale ont été identifiés (**tableau 4**).

Tableau 4 : composition chimique de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* L.

Compounds	Indice de Retention (RI)	Air (%)
Eugenol	1353	87.03
β-Caryophyllene	1428	< 1
Eugenyl Acetate	1538	11.25
Caryophylleneoxide	1689	< 1

Eugénol est le composé majoritaire de l'huile essentielle avec une valeur de (87.03 %), suivi de l'acétate d'eugenyl (11.25 %). On note également la présence de deux composés considérés comme minoritaires qui sont : β -caryophyllène et caryophylleneoxide représentant moins de 2 % du total de l'huile essentielle.

Plusieurs études faites sur la composition chimique de l'huile essentielle du clou de girofle ont montré que l'eugénol est le composé majoritaire avec environ 90-95 % du totale de l'huile essentielle [176]. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études rapportées [143,177,178]. D'autres études confirment la présence d'autres composés mineurs tels que : β -pinene, limonene, farnesol, benzaldehyde, 2-heptanone et éthyl hexanoate [175].

Les principaux constituants des huiles essentielles du girofle varient selon plusieurs facteurs à savoir le broyage, la maturité, les conditions géographiques, le climat, la saison de récolte, la période de distillation et la méthode d'extraction utilisée.

3. Activité antibactérienne comparative des huiles essentielles de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum*

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux plantes aromatiques : *Laurus nobilis* L. et *Syzygium aromaticum* L., a été évaluée sur cinq souches bactériennes responsables des infections nosocomiales pédiatriques par la méthode de diffusion sur disque. Cette activité est effectuée par comparaison avec l'antibiogramme standard utilisé comme témoins positifs. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition sont représentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Diamètres d'inhibitions des antibiotiques et des huiles essentielles de laurier et du clou de girofle

Les bactéries	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)					
	Les antibiotiques standards				Les huiles essentielles	
	IMP	K	PT	CTX	Laurier	Clou de girofle
<i>E. coli</i>	37	15	18	20	26.6±0.4	20±0.4
<i>S. aureus</i>	39	17	23	24	25.6±0.4	18±0.8
<i>P. aeruginosa</i>	12	0	0	4	13.3±0.4	13.75±0.4
<i>K.pneumonia</i>	24	17	0	12	18±0.8	16±0.8
<i>P.mirabilis</i>	22	18	0	14	20±0.8	16.33±0.5

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± SEM

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles de laurier et du girofle sur l'ensemble des souches bactériennes testées a permis d'avoir des diamètres des zones d'inhibition allant de 13 à 26 mm et de 13.75 à 20 mm respectivement pour le laurier et le clou de girofle (**tableau 5**).

L'huile essentielle de laurier a montré une activité antibactérienne significative contre toutes les souches bactériennes testées à divers degrés avec des diamètres d'inhibitions significatifs. Les résultats illustrés dans le **tableau 5** montrent qu'à l'exception de l'IMP considéré comme un antibiotique puissant les diamètres générés par l'HE du laurier sont légèrement supérieurs à ceux produits par les antibiotiques de référence (K, PT, CTX).

Cependant la souche *P. aeruginosa* présente une résistance remarquable vis-à-vis de l'huile essentielle et de l'IMP (**tableau 5**). Par ailleurs l'huile essentielle du laurier de l'Argentine est très active sur des souches bactériennes de *Paenibacillus larvae* isolées à partir des rayons des ruches [179]. Une étude faite par Snuossi et al [131] a montré la capacité de l'HE du laurier Tunisien à inhiber des bactéries du genre *Staphylococcus* isolées de poissons et crustacés fréquemment consommés par les Tunisiens. En effet l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du laurier est peut-être attribuée aux composants majoritaires 1,8-cinéole, α -pinène et linalol ou plutôt à un effet synergique avec les composants mineurs.

L'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a démontré une activité antibactérienne significative sur toutes les souches testées avec des diamètres d'inhibitions remarquables. Les résultats ont révélé que l'HE du girofle pourrait inhiber la croissance des bactéries : *S. aureus* (18 mm), *P. mirabilis* (16.3 mm), *P. aeruginosa* (13.75 mm), *K. pneumonia* (16 mm) et *E. coli* (20 mm) en les comparant avec des antibiotiques standards (**tableau 5**). Des études antérieures ont prouvé l'action active de l'HE du girofle contre une large gamme de bactéries Gram+ et Gram- [136, 138, 160]. Cette activité antibactérienne de l'HE de *Syzygium aromaticum* pourrait être probablement due à la présence de l'eugénol qui est le composé majoritaire de cette HE, par ailleurs il est possible aussi que la synergie entre les composés mineurs et l'eugénol contribue à la réalisation de ce pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne.

Le **tableau 6** résume les valeurs de CMI et CMB des deux huiles essentielles étudiées ; ceci montre que celles-ci représentent une activité bactériostatique et bactéricide significative contre toutes les souches testées. Les résultats les plus prometteurs étaient obtenus à partir de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* qui avaient des CMI faibles avec des valeurs de 3.75 $\mu\text{g/ml}$ et de 11.25 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

En général, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est due principalement à leur composition chimique et à la nature de ses composés majoritaires que minoritaires.

Tableau 6: CMI et CMB des huiles essentielles de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum*

Les souches	HE de <i>Laurus nobilis</i>		HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	22.5	45	3.75	15
<i>P. aeruginosa</i>	22.5	90	15	90
<i>K. pneumonia</i>	22.5	90	3.75	45
<i>P. mirabilis</i>	11.25	22.5	3.75	15
<i>E. coli</i>	22.5	22.5	3.75	3.75

III. Conclusion

Les analyses chromatographiques (CG/SM) des huiles essentielles montre que les huiles essentielles de *Laurus nobilis* sont riches en 1,8-cinéole, 1- α -pinene, linalool, α -terpineol que celles de *Syzygium aromaticum* sont riches en eugenol et eugenyl acétate.

Concernant l'activité antibactérienne, les deux huiles essentielles présentent un pouvoir inhibiteur très remarquable contre des bactéries résistantes responsables des infections nosocomiales néonatales avec des faibles valeurs de CMI et CMB.

Chapitre II : Activité antioxydante et quantification des composés phénoliques des huiles essentielles et de différents extraits du *Laurus nobilis L.* et *Syzygium aromaticum L.*

I. Introduction

Les produits agroalimentaires, riches en fraction lipidiques, sont susceptibles de subir des dégradations et des transformations chimiques (oxydation et rancissement des graisses et des vitamines, hydrolyse et polymérisation non contrôlée, modification de textures et perte de propriétés organoleptiques ou nutritionnelles) sous l'influence de différents paramètres, entre autres l'oxygène. Ces phénomènes sont réduits ou empêchés par l'addition d'antioxydants synthétiques. Cependant, en raison de leur toxicité élevée [180], de nombreux chercheurs se sont intéressés à la recherche de composés naturels ayant des propriétés antioxydantes pour remplacer les antioxydants chimiques jugés souvent cancérigènes [181, 182].

Les polyphénols représentent une large gamme de composés naturels, dont l'importance croît, notamment vue leurs effets bénéfiques sur la santé [183]. En effet, leur rôle d'antioxydants naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement des pathologies liées au stress oxydatif tels que le cancer, les maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives [184].

Les huiles essentielles et les extraits des plantes constituent une source potentielle de molécules bioactives [185,186]. Actuellement, dans le but de protéger la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs, plusieurs travaux ont été réalisés afin de remplacer les produits chimiques par des composés naturels après leurs isolation.[187].

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la quantification des polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols et l'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant différentes méthodes.

II. Résultats

1. Activité antioxydante des huiles essentielles

1.1. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante totale

La teneur en polyphénols totaux des deux huiles essentielles a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe de régression de l'étalon obtenue d'une solution d'acide gallique, et elle est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par microgramme de l'huile essentielle. Les résultats sont représentés dans le **tableau 7**. L'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a donné une forte teneur en composés phénolique avec la valeur (0.161 ± 0.004 mg Eq AG / μ g HE) par contre l'huile essentielle du laurier présente une valeur faible de (0.019 ± 0.0014 mg Eq AG / μ g HE).

La quantité en flavonoïdes totaux, a été déterminée à partir de la courbe de régression obtenue d'une solution de rutin par microgramme de l'HE. Les résultats montrent que l'huile essentielle de clou de girofle est plus riche en flavonoïdes totaux que l'huile essentielle du laurier avec des valeurs 0.14 ± 0.002 et 0.036 ± 0.004 mg Eq rutin / μ g HE respectivement. L'activité antioxydante totale des huiles essentielles a été déterminée graphiquement par régression linéaire du courbe étalon de l'acide ascorbique ($y = 1.517x - 0.056$; $R^2 = 0.995$) (**Figure 39 en annexe**). Celle-ci est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par microgramme d'HE (**tableau 7**). Nos résultats montrent que la capacité antioxydante totale de l'huile essentielle du clou de girofle est deux fois plus élevée que celle de l'HE du laurier avec des valeurs 1.53 ± 0.04 mg Eq A.As / μ g et 0.53 ± 0.02 mg Eq A.As / μ g respectivement.

Tableau 7 : teneur en polyphenols, flavonoides et activivité antioxydante totale des huiles essentielles du *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum*

Les plantes	Polyphénols	Flavonoïdes	CAT
	mg Eq AG / μ g HE	mg Eq Rutin / μ g HE	mg Eq A.As / μ g HE
<i>Laurus nobilis</i>	0.019 ± 0.0014	0.036 ± 0.004	0.53 ± 0.02
<i>Syzygium aromaticum</i>	0.161 ± 0.004	0.14 ± 0.002	1.53 ± 0.04

1.2. Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH

L'activité antioxydante des huiles essentielles vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à la longueur d'onde de 515 nm en suivant la

réduction de ce radical qui s'accompagne par sa décoloration après l'addition de l'antioxydant. Les résultats montrent que l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles est très importante et dose-dépendante. L'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a montré une très forte activité anti-radicalaire, elle a éliminé presque la totalité des radicaux libres 86.95 % à une concentration de l'ordre de 0.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (**figure 17**). Alors que l'huile essentielle du *Laurus nobilis* n'a pu réduire que 69.65 % des radicaux libres à une concentration d'ordre de 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (**Figure 18**).

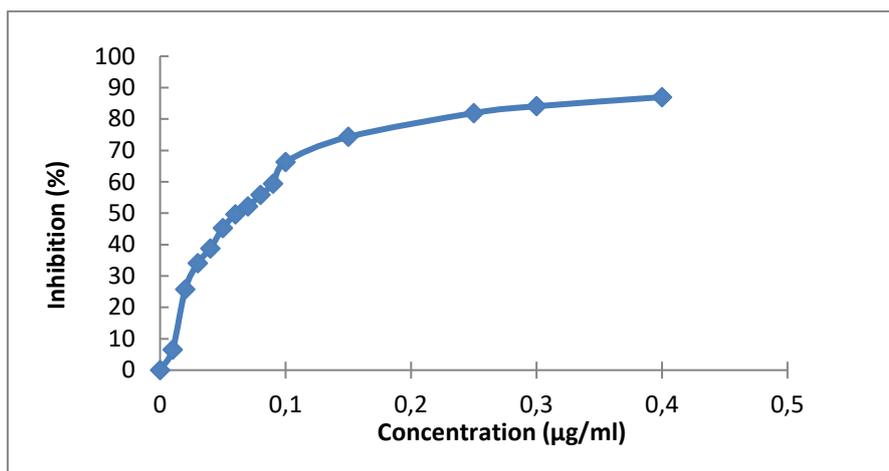


Figure 17 : activité anti-radicalaire de l'huile essentielle du Syzygium aromaticum

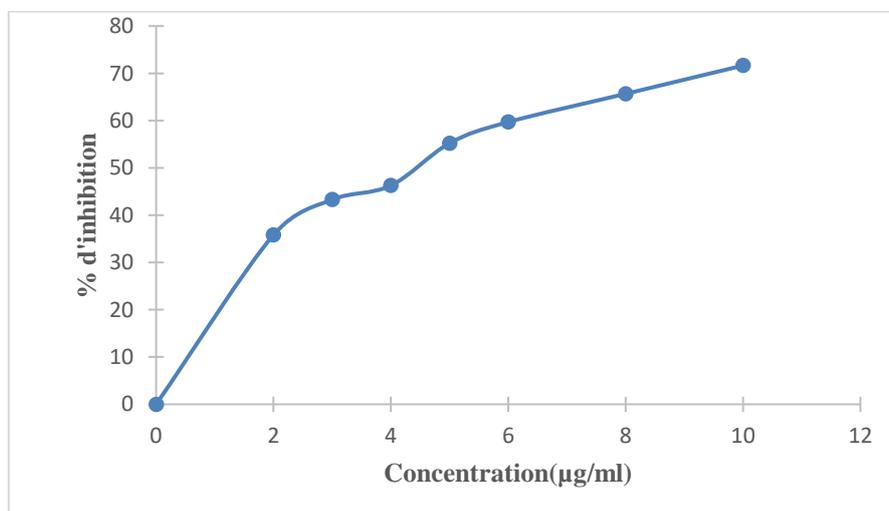


Figure 18 : activité antiradicalaire de l'huile essentielle du Laurus nobilis

Tableau 8 : IC₅₀ du DPPH des huiles essentielles *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* comparée au BHT

	IC ₅₀ (µg / ml)
HE <i>Syzygium aromaticum</i>	0.062 ± 0.0004
HE <i>Laurus nobilis</i>	4.44 ± 0.05
BHT	100

En comparant les IC₅₀ des deux huiles essentielles testées par rapport à celle du standard BHT, nous avons remarqué une activité antioxydante très élevée de nos deux huiles essentielles : du *Syzygium aromaticum* avec une IC₅₀ de l'ordre de 0.062 ± 0.0004 µg / ml et de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* dont l'IC₅₀ est de l'ordre de 4.44 ± 0.05 µg / ml par rapport au standard BHT. En revanche l'activité antiradicalaire de *Syzygium aromaticum* demeure supérieure à celle du *Laurus nobilis* (**tableau 8**).

1.3. Activité antioxydante mesurée par le test de FRAP

L'activité antioxydante des deux huiles essentielles a été évaluée par la méthode de FRAP (**figure 19 et figure 20**). Ces résultats sont comparés entre eux et avec un antioxydant synthétique le BHT. L'huile essentielle de *S. aromaticum* (SA) a montré une activité réductrice extrêmement intéressante avec IC₅₀ = 0.05 ± 0.001 µg / ml par rapport à l'huile essentielle du *Laurus nobilis* (LN) avec une IC₅₀ de l'ordre de 2.87 ± 0.07 µg / ml. Et l'activité de deux reste plus imposante que celle du BHT (**taleau9**).

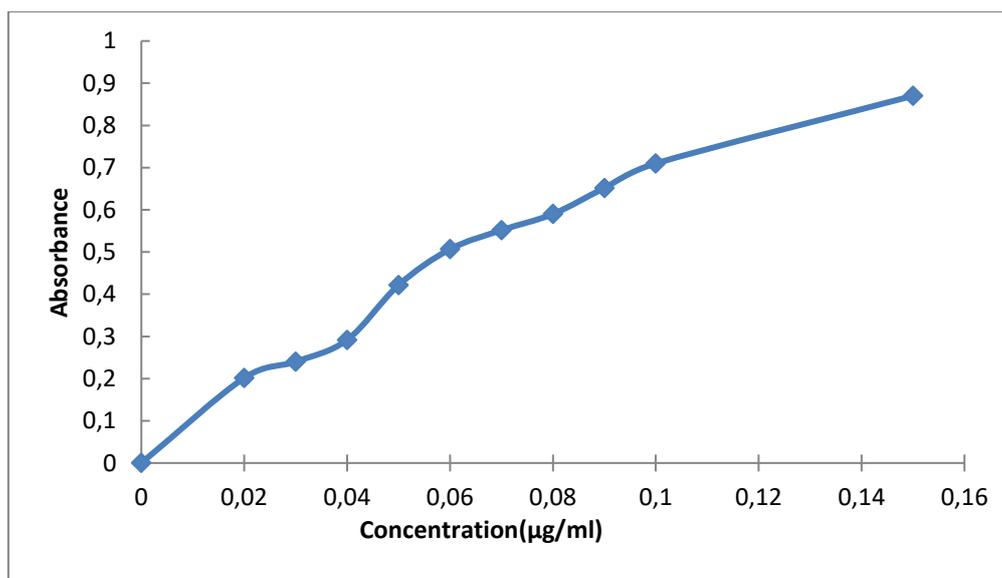


Figure 19 : activité antioxydante de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* par méthode de FRAP

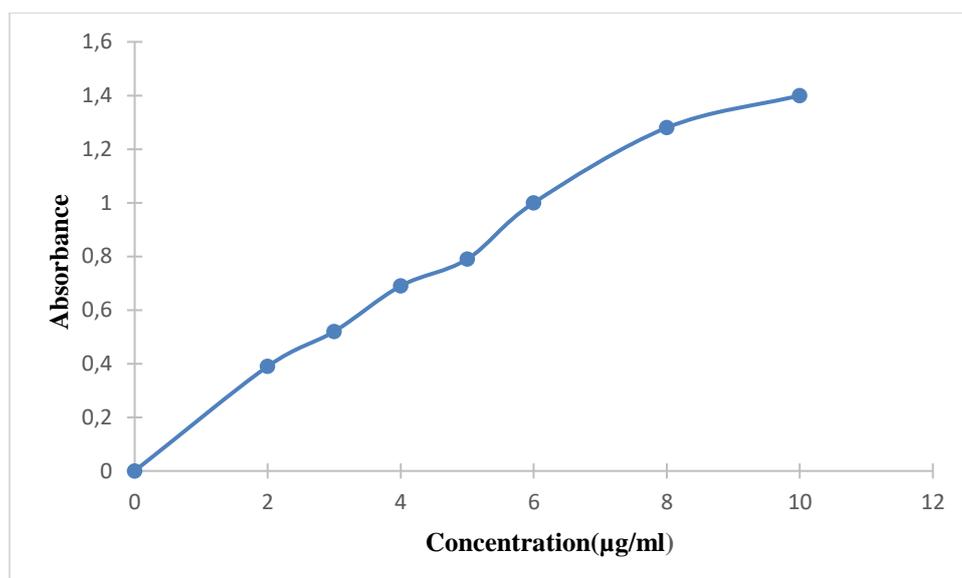


Figure 20 : activité antioxydante de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* par méthode de FRAP

Tableau 9 : IC₅₀ du pouvoir réducteur des huiles essentielles

	IC ₅₀ (µg/ml)
HE <i>Syzygium aromaticum</i>	0.05 ± 0.001
HE <i>Laurus nobilis</i>	2.87 ± 0.01
BHT	120

2. Dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits du *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* par la méthode de macération

2.1. Rendement des extraits de *Laurus nobilis* et de *Syzygium aromaticum*

Tableau 10 : rendement des extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis*

Les extraits	Rendement (%)	
	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
Ethanolique	6	12
Méthanolique	11	16
Acétate d'éthyle	3	12
Aqueux	4	8

Les résultats du rendement des différents extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* sont présentés dans le **tableau 10**. En générale ceux-ci montrent que les

extraits éthanolique, méthanolique, acétate d'éthyle et aqueux du *Syzygium aromaticum* ont un meilleur rendement avec des valeurs 12 %, 16 %, 12 % et 8 % respectivement par rapport aux différents extraits de *Laurus nobilis*.

2.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavones et flavonols des extraits

2.2.1. Teneur en polyphénols

La teneur en phénols totaux des différents extraits du *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe de régression de l'étalon obtenue d'une solution d'acide gallique et exprimée en milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait brute (**figure 38 en Annexe**).

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique, méthanolique et d'acétate d'éthyle de *Syzygium aromaticum* contiennent une forte teneur en polyphénols avec des valeurs 687.5 ± 44.19 , 507.45 ± 21.1 et 466.34 ± 0.45 mg Eq AG / g MS respectivement, alors que, la faible quantité en polyphénols est observée dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Laurus nobilis* avec une valeur de 21 ± 0.72 mg Eq AG / g MS (figure 21). Les feuilles de laurier contiennent significativement la teneur la plus faible en polyphénols quel que soit le type de solvant utilisé.

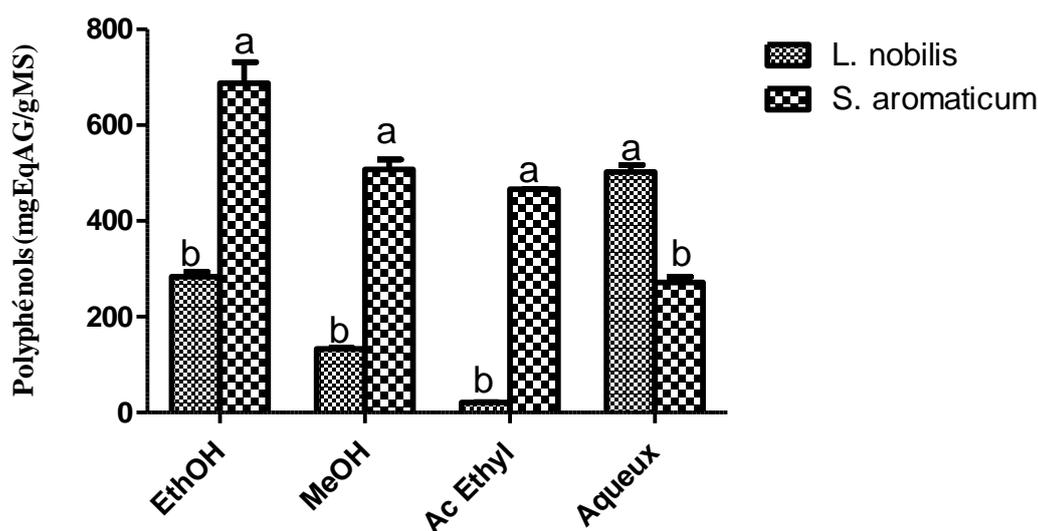


Figure 21 : teneur en polyphénols dans les différents extraits des bourgeons de *Syzygium aromaticum* L. et des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les résultats sont exprimés en mg Eq AG /g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

2.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Pour la teneur en flavonoïdes totaux des extraits des deux plantes étudiées, nous avons utilisées une quantification spectrométrique avec du chlorure d'aluminium, la quantité en flavonoïdes a été déterminée à partir de la courbe de régression obtenue d'une solution du rutin, les valeurs sont exprimées en milligramme équivalent rutin par gramme de matière sèche (**figure 41 en Annexe**).

Les résultats présentés dans la **figure 22** montrent que l'extrait éthanolique et méthanolique de *Syzygium aromaticum* referment une forte teneur en flavonoïdes totaux avec des valeurs de 213.89 ± 7.85 et 173.33 ± 2.35 mg Eq Rutin /g MS respectivement, alors que, pour *Laurus nobilis* la teneur la plus élevée est attribuée à l'extrait éthanolique avec une valeur de 147.78 ± 7.49 mg Eq Rutin/g MS.

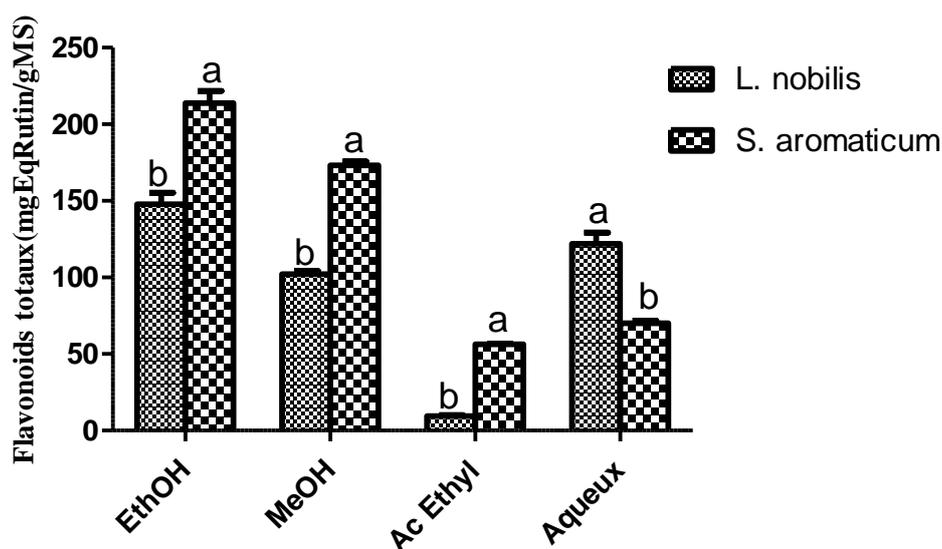


Figure 22 : teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de *Syzygium aromaticum* L et des feuilles de *Laurus nobilis* L.

Les résultats sont exprimés en mg Eq Rutin /g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

2.2.3. Teneur en flavones et flavonols

La teneur en flavones et flavonols des différents extraits du *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* est obtenue à partir de l'équation de régression $y = 1.9368 x - 0.0125$ (**Figure 40**

en annexe), cette teneur est exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de matière sèche.

Les résultats illustrés dans la (figure 23) montrent que l'extrait éthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* contient la teneur significativement plus élevée en flavone et flavonol avec la valeur de 280.56 ± 15.71 mgEq Quercétine/gMS. Quel que soit la nature du solvant, ce sont les extraits de *Syzygium aromaticum* qui renferment les teneurs significativement les plus faibles en flavone et flavonol (figure 23).

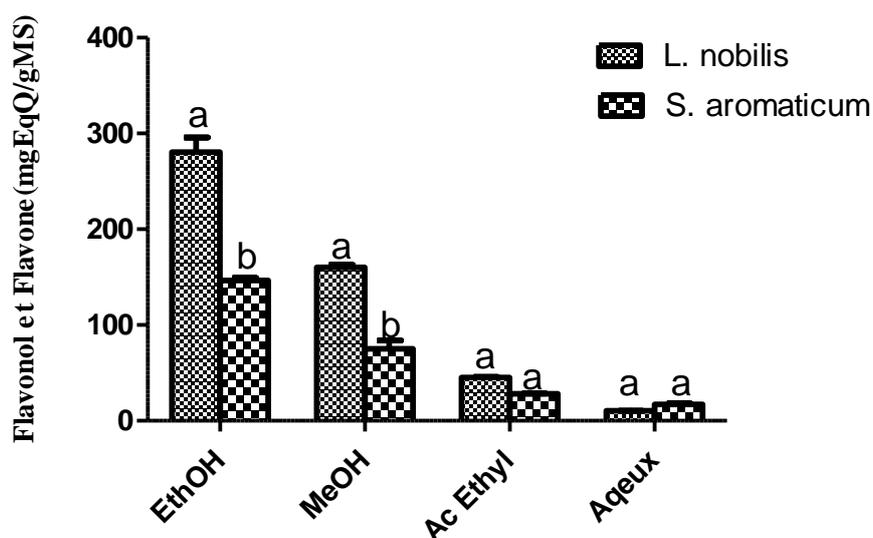


Figure 23 : teneur en flavone et flavonol dans différents extraits de *Syzygium aromaticum* et des feuilles de *Laurus nobilis*

Les résultats sont exprimés en mg Eq Rutin /g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

2.3. Activité antioxydante totale

L'activité antioxydante totale des extraits du *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* a été déterminée graphiquement par la régression linéaire de la courbe d'étalon de l'acide ascorbique $y = 1.517x - 0.0564$ (Figure 39 en annexe), elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche. Les résultats de l'activité antioxydante totale des différents extraits présentés dans la figure 24, révèlent que l'extrait d'acétate d'éthyle du *Syzygium aromaticum* renferme une teneur significativement plus élevée en activité antioxydante totale avec la teneur 839.89 ± 1.85 mg Eq Ac As/g MS. Les teneurs les plus faibles sont observées dans les extraits acétate d'éthyle, méthanolique et éthanolique des

feuilles de *Laurus nobilis*, à l'exception de l'extrait aqueux qui renferme une forte teneur de 545.83 ± 5.89 mg Eq Ac As / g MS.

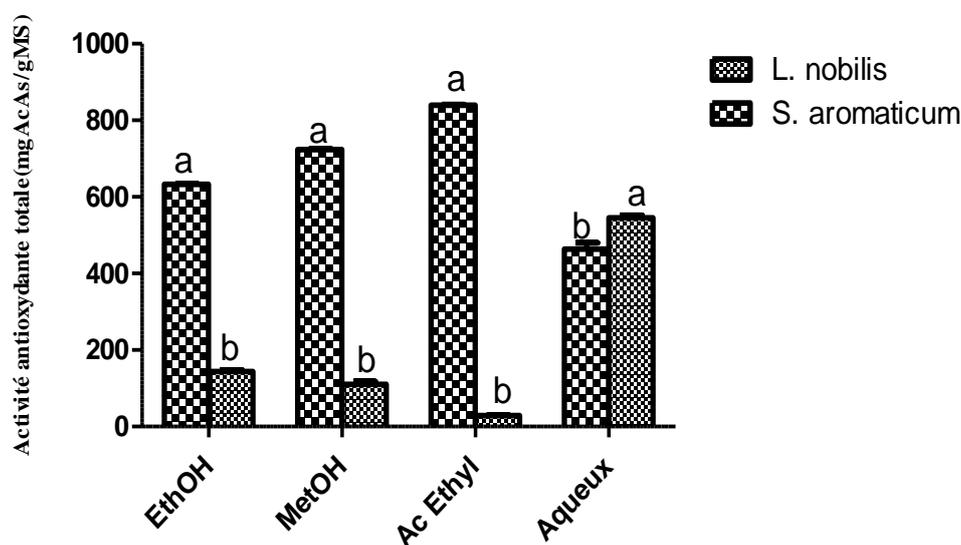


Figure 24 : teneur en activité antioxydante totale dans les différents extraits de *Syzygium aromaticum* et des feuilles de *Laurus nobilis*

Les résultats sont exprimés en mg Eq Rutin / g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

2.4. Activité antioxydante mesurée par le test DPPH

Le test DPPH est utilisé fréquemment *in vitro* pour déterminer l'activité antioxydante des extraits. L'activité de piégeage des radicaux DPPH par les différents extraits a été évaluée en utilisant un spectrophotomètre suivant la réduction de ce radical qui se manifeste par sa décoloration après l'addition de l'antioxydant.

Dans le but de comparer l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par la méthode de macération. On a calculé IC_{50} qui exprime la concentration de l'extrait capable de piéger 50 % de radical DPPH.

Tableau 11 : les valeurs des IC_{50} pour les différents extraits exprimés en moyenne \pm SD ($n = 3$)

Plantes	IC_{50} (mg / ml)			
	Ethanol	Methanol	Acetate d'éthyle	Aqueux
<i>S. aromaticum</i>	0.12 ± 0.001^a	0.17 ± 0.08^a	0.12 ± 0.07^b	0.06 ± 0.05^a
<i>L. nobilis</i>	0.48 ± 0.01^b	0.31 ± 0.009^b	0.10 ± 0.006^a	0.06 ± 0.003^a

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0.001$).

Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits sont présentées dans le **tableau 11**. Généralement les valeurs des IC₅₀ des différents extraits testés par le test de piégeage DPPH varient de 0.06 à 0.48 mg/ml. Ces résultats indiquent significativement que les extraits éthanolique, méthanolique et acétate d'éthyle du *Syzygium aromaticum* avaient une activité de piégeage des radicaux libres plus forte que ceux des feuilles de *Laurus nobilis*. Les extraits aqueux des deux plantes ont une forte activité antiradicalaire supérieur à celle du BHT (IC₅₀=0.10mg/ml) utilisé comme un antioxydant de référence.

Les deux plantes ont un pouvoir antioxydant important qui est lié probablement à leur composition chimique, en particulier à leur teneur en composés phénoliques et flavonoïdes.

2.5. Activité antioxydante mesurée par le test de FRAP

L'activité antioxydante des extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par la méthode de macération a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP qui s'accompagne d'un changement de couleur instantané du jaune au vert. Les résultats du test de réduction du fer (FRAP) des différents extraits sont présentés sur le **tableau 12**.

Tableau 12 : les valeurs des IC₅₀ pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3)

Plantes	IC ₅₀ (mg/ml)			
	Ethanol	Methanol	Acétate d'éthyle	Aqueux
<i>S. aromaticum</i>	0.16 ± 0.00008 ^a	0.17 ± 0.002 ^a	0.17 ± 0.001 ^a	0.17 ± 0.001 ^a
<i>L. nobilis</i>	0.2 ± 0.006 ^b	0.21 ± 0.012 ^b	0.28 ± 0.019 ^b	0.16 ± 0.004 ^a

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction (p<0.001).

L'analyse des résultats montre que les extraits éthanolique, méthanolique et acétate d'éthyle de *Syzygium aromaticum* ont un pouvoir réducteur fort significativement avec des valeurs d'IC₅₀ de ; 0.16, 0.17 et 0.17 mg/ml respectivement qui sont presque proches de celle de l'antioxydant de référence le BHT (IC₅₀=0.12 mg/ml). Quant aux extraits des feuilles de laurier leur pouvoir réducteur est faible par rapport à celui du BHT.

3. Dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits du *Syzygium aromaticum* L et *Laurus nobilis* L par méthode de soxhlet

3.1. Rendement des extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum*

Le rendement, des extraits de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* par la méthode d'extraction soxhlet illustrés dans le **tableau 13** montre que les extrait méthanoliques des

deux plantes présentent un meilleur rendement avec des valeurs : 28% pour laurier et de 23% pour le clou de girofle, tandis que celui des extraits aqueux reste le plus faible.

Tableau 13 : rendements des extraits de *Laurus nobilis* et de *Syzygium aromaticum*

Les extraits	Rendement (%)	
	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
Ethanolique	12	11
Méthanolique	28	23
Acétate d'éthyle	4	11
Aqueux	4	3

3.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et flavones et flavonols des extraits

3.2.1. Teneur en polyphénols

La teneur en phénols totaux des différents extraits du *Syzygium aromaticum* par la méthode de soxhlet a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe de régression de l'étalon obtenue d'une solution d'acide gallique et exprimée en milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait brute (**figure 38 en annexe**).

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique du *Syzygium aromaticum* renferme une teneur significativement plus élevée en polyphénols avec une valeur de 651.51 ± 4.28 mg Eq AG/ g MS. Alors que les plus faibles sont observées dans les différents extraits de *laurus nobilis* (**figure 25**).

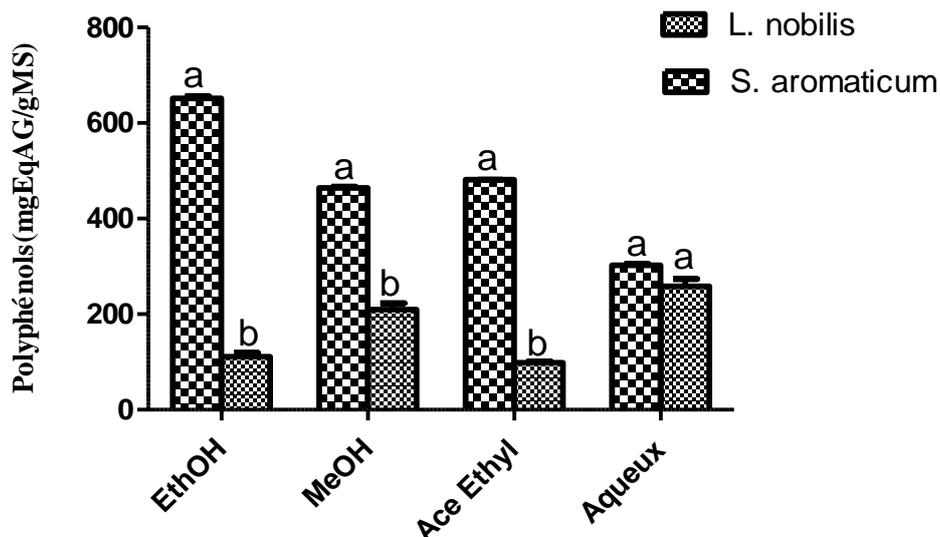


Figure 25 : teneur en polyphénols dans les différents extraits de *Syzygium aromaticum* et des feuilles de *Laurus nobilis* par méthode de soxhlet.

Les résultats sont exprimés en mg Eq AG /g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

3.2.2 Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des deux plantes obtenues par la méthode de soxhlet a été déterminée à partir de la courbe de régression d'une solution du rutin, les valeurs sont exprimées en milligramme équivalent rutin par gramme de matière sèche (**figure 41 en annexe**).

Les résultats présentés dans la **figure 26** révèlent que, l'extrait éthanolique du clou de girofle renferme significativement une forte teneur en flavonoïdes totaux avec une valeur de 224.32 ± 11.03 mg Eq Rutin /g MS cinq fois plus élevée que celle de l'extrait éthanolique du laurier.

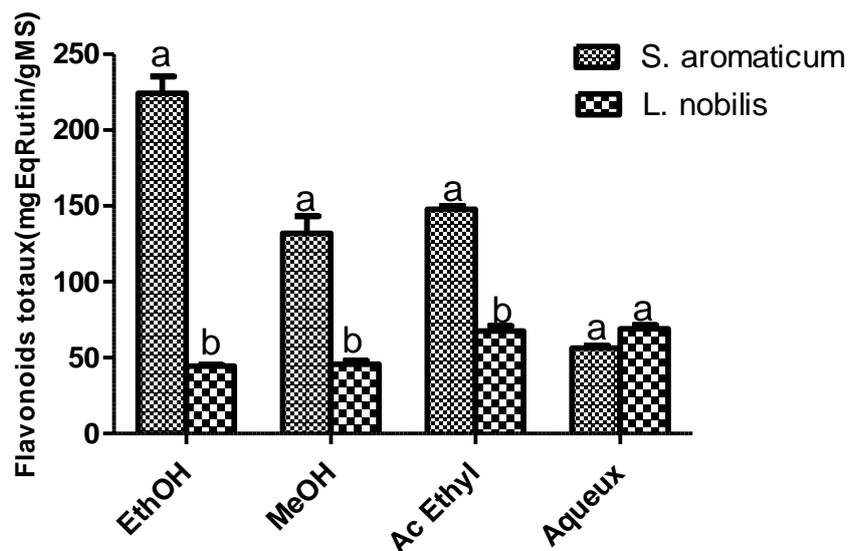


Figure 26 : teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de *Syzygium aromaticum* et des feuilles de *Laurus nobilis* par méthode de soxhlet

Les résultats sont exprimés en mg Eq Rutin /g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

3.2.3 Teneur en flavone et flavonol

La teneur en flavone et flavonols des différents extraits du *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par la méthode de soxhlet exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de matière sèche est obtenue à partir de l'équation de régression $y = 1.9368x - 0.0125$ (figure 40 en annexe).

Les résultats présentés dans la figure 27 prouvent que l'extrait d'acétate d'éthyle de laurier présente significativement la valeur la plus élevée en flavone et flavonol avec une moyenne de 201.66 ± 14.37 mg Eq Quercétine / g MS. Alors que la plus faible teneur est observée dans les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle du *Syzygium aromaticum* avec des valeurs 2.01 ± 0.007 et 39.29 ± 0.3 mg Eq Quercétine /g MS respectivement.

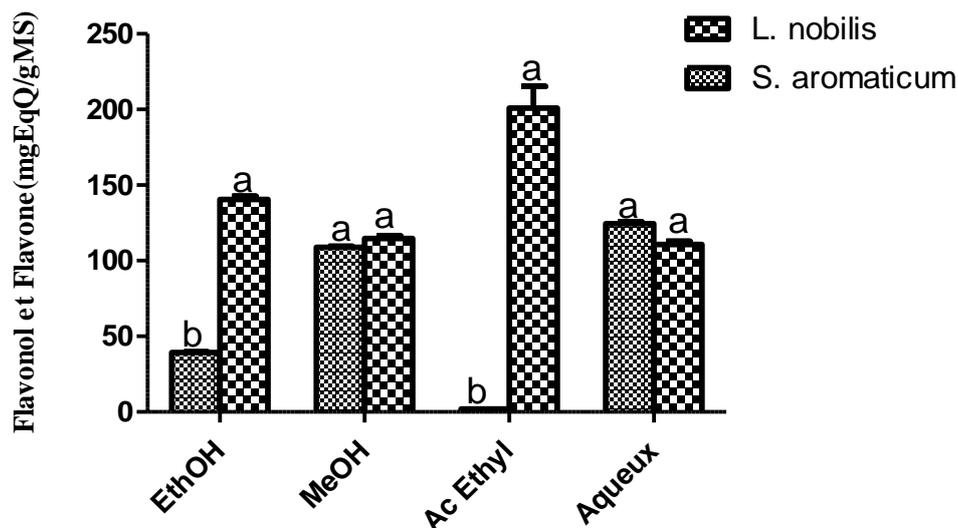


Figure 27 : teneur en flavone et flavonol dans différents extraits de *Syzygium aromaticum* et des feuilles de *Laurus nobilis* par méthode de soxhlet

Les résultats sont exprimés en mg Eq Quercétine / g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

3.3. Activité antioxydante totale

L'activité antioxydante totale, des extraits de *Laurus nobilis* et de *Syzygium aromaticum*, étudiée par la méthode de soxhlet et exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche, a été déterminée graphiquement par régression linéaire du courbe étalon de l'acide ascorbique $y = 1.517x - 0.0564$ (**figure 39 en annexe**).

Les résultats de l'étude, de l'activité antioxydante totale de différents extraits, par la méthode de soxhlet, illustrés dans la **figure 28**, révèlent que les extraits éthanolique et méthanolique du *Syzygium aromaticum* contiennent des teneurs significativement élevées avec des valeurs de 800.31 ± 2.21 et 785.25 ± 3.51 mg Eq Ac As /g MS. Néanmoins les plus faibles valeurs sont observées dans l'extrait acétate d'éthyles des deux plantes.

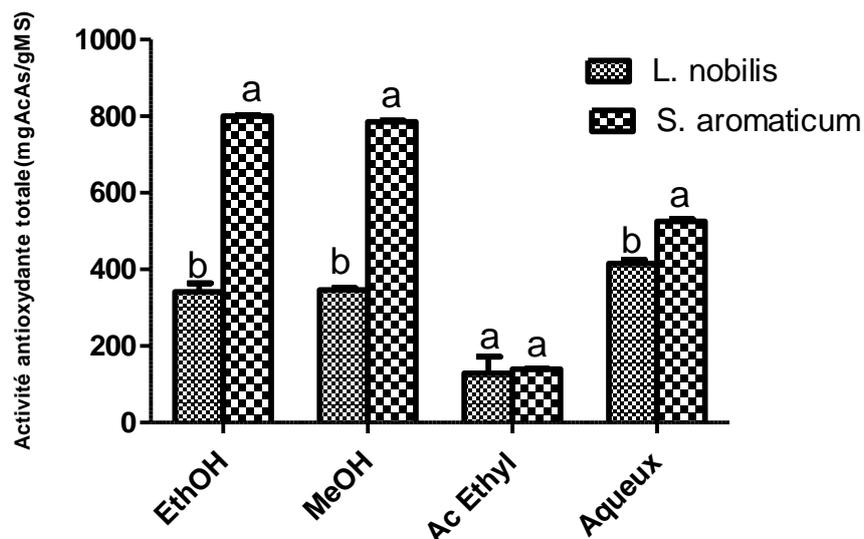


Figure 28 : activité antioxydante totale des extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par méthode de soxhlet

Les résultats sont exprimés en mg Eq Ac As / g MS. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0.001$).

3.4. Activité antioxydante mesurée par le test DPPH

Le test DPPH est très utilisé *in vitro* pour déterminer l'activité antioxydante des extraits. L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH par les différents extraits a été évaluée en utilisant un spectrophotomètre suivant la réduction de ce radical qui se manifeste par sa décoloration après l'addition de l'antioxydant.

Dans le but de comparer l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* par méthode de soxhlet. On a calculé IC_{50} exprimant ainsi la concentration de l'extrait capable de piéger 50 % de radical DPPH.

Tableau 14 : Les valeurs des IC_{50} des différents extraits de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* par méthode de soxhlet. IC_{50} BHT = 0.10mg/ml

Plantes	IC_{50} (mg/ml)			
	Ethanol	Méthanol	Acétate d'éthyle	Aqueux
<i>S. aromaticum</i>	0.07 ± 0.029^a	0.076 ± 0.053^a	0.11 ± 0.112^a	0.82 ± 0.05^b
<i>L. nobilis</i>	0.28 ± 0.016^b	0.5 ± 0.16^b	0.14 ± 0.0009^a	0.13 ± 0.0018^a

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0.001$).

D'après les résultats présentés dans le **tableau 14**, les différents extraits sont dotés d'un fort pouvoir antioxydant qui diffère d'un extrait à l'autre. A l'exception de l'extrait

aqueux de *Syzygium aromaticum*, tous les autres ont une capacité de piégeage des radicaux libres forte significativement et supérieure même à celle du BHT ($IC_{50}=0.10\text{mg/ml}$). Alors qu'elle est modérée dans les extraits éthanolique et méthanolique du laurier.

3.5. Activité antioxydante par le test de FRAP

L'activité antioxydante des extraits de *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP qui se manifeste par un changement de coloration du jaune au vert. Les résultats de ce test sont présentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : les valeurs de IC_{50} pour les différents extraits par le test de FRAP par la méthode de soxhlet. IC_{50} BHT = 0.12mg / ml

Plantes	IC_{50} (mg / ml)			
	Ethanol	Méthanol	Acétate d'éthyle	Aqueux
<i>S. aromaticum</i>	0.06 ± 0.0005^a	0.15 ± 0.0002^a	0.20 ± 0.09^a	0.22 ± 0.08^a
<i>L. nobilis</i>	0.46 ± 0.03^b	0.26 ± 0.03^b	0.29 ± 0.02^a	0.23 ± 0.00015^a

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0.001$).

L'analyse des résultats montrent qu'avec la valeur de 0.06 mg / ml, l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* présente une teneur significativement faible en IC_{50} , ce qui lui confère un pouvoir réducteur plus fort que le BHT. Le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique du *Laurus nobilis* demeure significativement faible en comparaison avec les autres extraits des deux plantes.

III. Discussion

1. Teneur en phénols et activité antioxydante des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis*

Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux présents dans les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* sont obtenues par hydrodistillation a été réalisée en pratiquant d'abord la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu et ensuite la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

Les résultats du dosage des polyphénols des huiles essentielles montrent que, l'huile essentielle du clou de girofle renferme une forte teneur en composés phénoliques dont la valeur est de 0.161 ± 0.004 mg Eq AG / μg HE, alors que l'huile essentielle du laurier

présente une teneur plus faible 0.019 ± 0.0014 mg Eq AG/ μg HE. De nombreuses études ont confirmé la richesse de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* en phénols [167, 168], de pareils résultats ont été constatés après la culture de la plante en Turquie [142].

Les résultats montrent que la richesse de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* en flavonoïdes est plus importante que celle du laurier avec des valeurs 0.14 ± 0.002 et 0.036 ± 0.004 mg Eq rutin / μg HE respectivement. A noter que nos résultats sont en accord avec d'autres études [190].

L'activité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'acide ascorbique équivalent par microgramme d'huile essentielle. Les résultats montrent que la capacité antioxydante totale de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est deux fois plus élevée que celle du laurier avec des valeurs (1.53 ± 0.04 et 0.53 ± 0.02 mg Eq Ac As/ μg HE respectivement). Ces résultats sont en concordance avec l'étude réalisée par Bakour et al [190].

L'activité antioxydante des huiles essentielles vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à la longueur d'onde de 515 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par sa décoloration après l'addition de l'antioxydant. Les résultats montrent que l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles est très importante et à dose-dépendante. L'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a montré une forte activité anti-radicalaire, en éliminant presque la totalité des radicaux libres (86.95%) à une concentration de l'ordre de $0.4 \mu\text{g/ml}$. Alors que l'huile essentielle du *Laurus nobilis* n'en a réduit que 69.65% à une concentration d'ordre de $10 \mu\text{g/ml}$. Pour comparer l'activité anti-radicalaire des deux huiles essentielles on a calculé la concentration inhibitrice à 50% ou IC_{50} qui est inversement lié à la capacité antioxydante de l'huile essentielle, elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre à 50%. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante est grande [191]. En comparant les IC_{50} des deux huiles essentielles testées par rapport à celle du standard BHT, nous avons remarqué une activité antioxydante très élevée de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* avec une IC_{50} de l'ordre de $0.062\pm 0.0004 \mu\text{g/ml}$ mais extrêmement supérieure à celle de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* dont l' IC_{50} est de l'ordre de $4.44\pm 0.05 \mu\text{g/ml}$. Il est à noter que l'activité antiradicalaire des huiles essentielles est supérieure à celle du standard BHT (**tableau 8**). Des études ont été réalisées par Jirovetz et al, Gulçin et al [143, 146] pour déterminer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. Ces travaux ont montré que l' IC_{50} de cette huile essentielle est inférieur à celle du standard. En effet

l'activité antiradicalaire de l'HE du clou de girofle est attribuée à sa teneur élevée en composé phénolique : l'eugénol [151]. Une étude réalisée sur l'HE du *Laurus nobilis* du Nord-Est Algérien a montré que son activité antiradicalaire nettement est inférieure à celle de notre étude [192].

L'activité antioxydante des deux huiles essentielles a été évaluée en pratiquant la méthode de FRAP. Une comparaison entre les deux huiles essentielles puis entre celles-ci et l'antioxydant BHT a montré que l'huile essentielle de *S. aromaticum* (SA) est dotée d'une activité réductrice extrêmement intéressante avec $IC_{50} = 0.05 \pm 0.001 \mu\text{g} / \text{ml}$ par rapport à l'huile essentielle du *Laurus nobilis* (LN) avec une IC_{50} de l'ordre de $2.87 \pm 0.07 \mu\text{g} / \text{ml}$ (**taleau9**). Les résultats d'autres études faites pour évaluer le pouvoir réducteur de l'huile essentielle du *S. aromaticum* sont en commun accord avec les nôtres [133, 134].

Les résultats obtenus du test effectué par la méthode de FRAP confirment le potentiel réducteur des huiles essentielles étudiées grâce à leur bonne affinité avec les ions Fe^{3+} qui leur procure une activité antioxydante plus forte que celle du BHT ($120\mu\text{g} / \text{ml}$).

2. Rendement, dosage des composés phénoliques et activité antioxydante des extraits par macération et soxhlet

Les résultats du rendement des différents extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* par les deux méthodes d'extraction à savoir, macération et soxhlet montrent que les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés par la méthode de soxhlet pour *Laurus nobilis*. Quant aux extraits méthanoliques de deux plantes, la méthode de soxhlet a révélé des rendements plus importants que ceux des autres extraits avec 28% pour *Laurus nobilis* et 23% pour *Syzygium aromaticum*.

La variabilité du rendement est due à plusieurs paramètres dont le pH, le solvant, la méthode d'extraction, la température ainsi que la période de la récolte [193].

La quantité en polyphénols des différents extraits de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* est estimée en mg Eq AG / g MS. Les résultats montrent que l'extraits éthanolique et méthanolique de *Syzygium aromaticum* contiennent une forte teneur en polyphénols avec des valeurs de 687.5 ± 44 et $507.45 \pm 21.10 \text{ mg Eq AG} / \text{g MS}$ respectivement par macération, et de 651.51 ± 4.28 et $481.41 \pm 0.42 \text{ mg Eq AG} / \text{g MS}$ par soxhlet. Alors que l'extraits aqueux de *Laurus nobilis* en referme une teneur plus élevée.

De nombreuses études ont été réalisées pour doser des polyphénols des extraits des feuilles de laurier. Leurs résultats confirment la présence des composés phénoliques qui sont identifiés par HPLC (acide caféique, férulique et vanillique). La caractérisation de ces composés phénoliques peut être définie par les conditions environnementales [164, 173]. Sans oublier le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques des plantes.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* est déterminée par l'usage du rutin. Les résultats sont exprimés en mg Eq rutin / g MS. Par macération ou soxhlet, l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* détient une forte teneur en flavonoïde totaux avec les valeurs de 123.89 ± 7.85 et 224.32 ± 11.03 mg Eq rutin/g MS respectivement. Les résultats des études faites sur les extraits des feuilles du laurier sont en concordance avec les nôtres avec presque la même teneur pour l'extrait méthanolique 149.2 mg Eq rutin / MS [174-175, 195].

L'activité antioxydante des extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* a été évaluée par le test de DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP).

Le test DPPH est utilisé fréquemment *in vitro* pour déterminer l'activité antioxydante des extraits, évaluée par le biais d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui se manifeste par sa décoloration après l'addition de l'antioxydant. On a calculé les IC_{50} exprimant la concentration de l'extrait capable de piéger 50% de radical DPPH. En général, les valeurs de IC_{50} de tous les extraits mesurés par le test de piégeage du radical DPPH varient de 0.06 à 0.48 mg/ml. Cependant, par rapport à l'antioxydant de référence BHT ($IC_{50} = 0.10 \pm 0.0001$ mg/ml), l'activité antioxydante de tous les extraits demeure la plus puissante. En effet, un agent antioxydant est actif contre les radicaux libres si l' IC_{50} est inférieur à 5 mg/ml et c'est le cas de tous nos extraits [175, 176]. L'extrait aqueux par macération et l'extrait méthanolique par soxhlet de laurier révèlent une excellente capacité à neutraliser les radicaux libres DPPH avec $IC_{50} = 0.5$ mg/ml, ces résultats sont en concordance avec ceux des études faites par Begum et al [198] sur les feuilles du laurier originaire d'Italie. Par contre celle de *Syzygium aromaticum* est légèrement supérieur aux autres extraits. Ces résultats sont conformes aux données antérieures rapportées par Dua et al [199] avec la valeur d' $IC_{50} = 93.75$ μ g / ml. Ces différences observées peuvent être attribuées aux différents méthodes et solvants d'extraction utilisés [200]. Une étude réalisée par Dua et al sur les extraits des bourgeons floraux du *Syzygium aromaticum* a montré que 56% de radicaux libres de DPPH ont été piégés par un extrait équivalent à 100μ g de girofle, cette activité

antioxydante élevée peut être corrélée à la teneur considérable en ascorbate, tocophérol et en phénols [199].

L'activité antioxydante de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* a été évaluée en utilisant le test de FRAP qui s'accompagne d'un changement de couleur instantanément du jaune au vert. En général, les extraits du *Syzygium aromaticum* révèlent un pouvoir réducteur du fer très puissant avec les valeurs de $IC_{50}=0.06$ à 0.2 mg/ml. Alors que c'est l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* par macération et soxhlet qui présente un pouvoir réducteur élevé par rapport aux autres extraits. Les mêmes résultats ont été observés lors des feuilles de laurier de l'Argentine [179].

Globalement, les deux plantes ont un pouvoir antioxydant important, lié probablement à leur composition chimique, et particulièrement à leur teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes [119,137].

Chapitre III : effet de l'extrait aqueux du Laurus nobilis L. et du Syzygium aromaticum L. sur le volume urinaire et la fonction rénale en comparaison avec le furosemide

I. Introduction

Les plantes médicinales ont actuellement une importance considérable en raison de leurs attributs particuliers. Dans le processus de découverte de médicaments, les plantes médicinales sont une source importante de molécules bioactives. Environ 39,1% de tous les médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) proviennent de produits naturels [201]. *Laurus nobilis* et *Syzygium aromaticum* sont deux plantes connues par la richesse de leurs composés phytochimiques positifs pour la santé et surtout sans effets secondaires.

Ce chapitre a pour but d'explorer l'effet de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* sur la diurèse et la fonction rénale. Les urines récoltées de chaque groupe de rat ont été analysés pour déterminer la teneur en sodium, potassium, chlorure et créatinine, tandis que leur sérum servi à déterminer la teneur en sodium, potassium, chlorure, créatinine, urée et l'albumine. Des paramètres rénaux tels que l'osmolarité plasmatique, clairance osmolaire, l'activité salurétique, clairance de l'eau libre ont été calculés. Des coupes histologiques ont été faites sur les reins de tous les groupes pour se rassurer de l'absence de toute altération du tissu rénale.

II. Résultats et discussion

Comme le montre le **tableau 16**, le volume urinaire des rats traités au furosémide, *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* a augmenté d'une manière significative dès le premier jour et a continué à augmenter quotidiennement pendant les 9 jours. À la fin du traitement, la diurèse des rats traités avec *Syzygium aromaticum* était semblable à celle du groupe de rats traités par le furosémide or elle est plus significative ($P < 0,05$) que celle du groupe traité avec *Laurus nobilis*. En outre, l'excrétion urinaire de sodium et de chlorure suite au traitement par les extraits des deux plantes a été augmentée de manière significative, alors que celle du potassium n'a connu qu'un léger effet (**tableau 17**). Fait intéressant, les résultats ont indiqué que les extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* ne provoquaient

aucune augmentation significative des électrolytes sériques, alors qu'avec le furosemide on note une hypokaliémie (**tableau 18**). Le mécanisme d'action de l'effet diurétique observé à la suite du traitement aux deux plantes est comparé à celui du furosemide, diurétique de l'anse qui augmente le débit urinaire via l'inhibition du co-transport de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, au niveau de la partie ascendante de l'anse de la boucle. Il provoque aussi l'excrétion urinaire de sodium, de potassium et de chlorure [202].

Tableau 16 : Effet du *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et furosemide sur le volume urinaire (ml / 24 h) chez les rats normaux durant neuf jours.

	Eau distillée	Furosemide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Jour 1	5.59 ± 0.37	7.75 ± 1.20*** ^a	7.45 ± 1.15* ^a	7.50 ± 0.50* ^a
Jour 2	5.42 ± 0.37	8.00 ± 1.03*** ^a	7.95 ± 1.06*** ^a	7.75 ± 0.55*** ^a
Jour 3	6.08 ± 0.38	10.41 ± 0.44*** ^a	7.50 ± 0.25*** ^a *** ^b	7.5 ± 0.5*** ^a *** ^b
Jour 4	6.08 ± 0.39	11.00 ± 0.81*** ^a	8.25 ± 1.18*** ^a *** ^b	8.33±1.24* ^a *** ^b
Jour 5	6.07 ± 0.60	14.35 ± 1.67*** ^a	9.16 ± 1.06*** ^a *** ^b	8.50±0.91* ^a *** ^b
Jour 6	6.37 ± 0.76	14.18 ± 1.31*** ^a	9.5 ± 1.5*** ^a *** ^b	8.58±0.83* ^a *** ^b
Jour 7	6.31 ± 0.48	14.95 ± 0.68*** ^a	10.5 ± 1.5*** ^a *** ^b	10±1 *** ^a *** ^b
Jour 8	6.37 ± 0.76	14.66 ± 0.94*** ^a	13.25 ± 1.28*** ^a *** ^c	10.33±0.94*** ^a *** ^b
Jour 9	6.38 ± 0.48	14.95 ± 0.68*** ^a	14.16 ± 1.21*** ^a * ^c	11.16±1.21*** ^a *** ^b

a: comparaison avec le groupe qui a reçu l'eau distillée; b: comparaison avec le groupe qui a reçu du furosemide; c: comparaison entre le groupe qui a reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe qui a reçu *Laurus nobilis*. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Tableau 17 : Effet du *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et furosemide sur le niveau d'électrolytes urinaire chez les rats wistars normaux après neuf jours de traitement

Electrolytes urinaire		Eau distillée	Furosemide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Sodium urinaire (meq / L)	Jour 0	151.88 ± 1.3	151.18±0.75	152.12 ± 0.21	150.19 ± 1.22
	jour 9	152.66 ± 2.05	207 ± 2.51 ***a	189.16 ± 1.34 ***a***b***c	180 ± 1.15 ***a***b
Potassium urinaire (meq / L)	Jour 0	71 ± 0.44	70 ± 1.22	71 ± 0.34	71 ± 0.33
	jour 9	71.66 ± 1.24	84.33 ± 6.67 **a	80.66 ± 5.82 *a	81.33 ± 3.14 *a
Chlore urinaire (meq / L)	Jour 0	99 ± 0.10	98 ± 0.80	99.10 ± 0.40	98.15 ± 0.95
	jour 9	98.83 ± 0.68	206.5 ± 3.25 ***a	212.08 ± 10.64 ***a	272.2 ± 1.29 ***a***b***c

a: comparaison avec le groupe qui a reçu l'eau distillée; b: comparaison avec le groupe qui a reçu du furosemide; c: comparaison entre le groupe qui a reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe qui a reçu *Laurus nobilis*. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Tableau 18 : Effet de *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et furosémide sur les taux d'électrolytes sériques chez les rats normaux après neuf jours de traitement

Electrolytes sériques		Eau distillée	Furosemide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Sodium sérique (meq/L)	Jour 0	144.20±0.11	143.00±1.02	143.10±0.14	143.80±0.75
	jour 9	143.50±1.89	144.83±0.68	143.66±0.94	144.5±0.76
Potassium sérique (meq/L)	Jour 0	5.10±0.11	5.20±0.40	5.09±0.12	5.12±0.41
	jour 9	5.07±0.45	5.16±0.16	5.23±0.09	5.14±0.44
Chlorure sérique (meq/L)	Jour 0	90.45±1.22	91.00±1.45	90.45±1.20	91.00±0.26
	jour 9	91.55±1.23	92.83±2.67	89.83±4.81	88.60±4.29

a: comparaison avec le groupe qui a reçu l'eau distillée; b: comparaison avec le groupe qui a reçu du furosémide; c: comparaison entre le groupe qui a reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe qui a reçu *Laurus nobilis*. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

En outre, à part la clairance de la créatinine, les résultats résumés dans le **tableau 19** ne montrent aucune augmentation significative des taux d'urée, d'albumine, de créatinine dans le sang et de créatinine dans les urines, par le furosémide et par les extraits de plantes. Ces données pourraient être explorées pour de potentielle augmentation de la clairance de la créatinine en cas d'insuffisance rénale [203].

Tableau 19 : Effect du *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et furosemide sur les taux d'urée sanguine, Creatinine, Albumin, et filtration glomérulaire chez les rats normaux après neuf jours de traitement.

	Eau distillée	Furosemide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Urée sanguine (mg/dL)	27.35±1.70	25.5±2.30	24.55±2.75	24.05±5.58
Albumin (g/L)	39.05±0.07	38.5±0.7	36.25±0.77	36.85±1.2
creatinine sanguine(mg/d L)	0.42±0.01	0.40±0.01	0.39±0.01	0.38±0.01
Creatinine urinaire (mg/dL)	46±1.41	45.75±0.35	44.98±1.39	45.82±0.24
Taux de filtration glomérulaire (mL/min)	0.48±0.01	1.18±0.05 ****a	1.15±0.04 ****a *c	0.93±0.03 ****a **b

a: comparaison avec le groupe qui a reçu de l'eau distillée ; b: comparaison avec le groupe reçu furosemide; c: comparaison entre le groupe reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe reçu *Laurus nobilis*. (**p < 0.01; ***p < 0.001).

Les effets de *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et du furosémide sur l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique, la clairance osmolaire, la clairance d'eau libre et la réabsorption d'eau libre chez les rats après neuf jours de traitement sont résumés dans le **tableau 20**. Bien qu'aucun changement significatif n'ait été enregistré dans l'osmolarité plasmatique, Les résultats ont montré une augmentation significative au niveau de l'osmolarité de l'urine, de la clairance osmolaire, de la clairance d'eau libre et de la réabsorption d'eau libre.

Tableau 20 : Effet de *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et du furosémide sur l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique, la clairance osmolaire, la clairance et la réabsorption de l'eau libre chez les rats normaux après neuf jours de traitement

	Eau distillée	Furosémide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Uosm (mOsm/kgH ₂ O)	448.66 ± 4.13	582.66±14.45 ***a	539.66±11.41 ***a***b*c	522.66±6.77 ***a***b
Posm (mOsm/kgH ₂ O)	287.00±4.14	289.66±1.50	287.33±2.06	289.00±1.67
Cosm (mL/min)	7.27 ± 0.63	20.87±0.91 ***a	18.46 ± 1.66 ***a *b ***c	14.03 ± 1.75 ***a ***b
CH ₂ O (mL/min)	-2.62 ± 0.27	-10.49 ± 0.51 ***a	-8.62 ± 0.80 ***a***b***c	-6.27 ± 0.83 ***a ***b
TCH ₂ O (mL/min)	2.62 ± 0.27	10.49 ± 0.51 ***a	8.62±0.80 ***a***b***c	6.27 ± 0.83 ***a ***b

a: comparaison avec le groupe qui a reçu de l'eau distillée ; b: comparaison avec le groupe reçu furosémide; c :comparaison entre le groupe reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe reçu *Laurus nobilis*, (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Comme le montre le **tableau 21**, les activités natriurétique et salurétique dans le groupe traité au furosémide ont connu une augmentation significative, tandis que les extraits de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* n'ont eu d'effet que sur l'activité salurétique. En ce qui concerne l'inhibition de l'anhydrase carbonique, selon Vogel, elle peut être comprise à des proportions entre 0,8 et 1 et nous pouvons supposer que nous puissions aboutir à une inhibition de l'anhydrase carbonique légère à forte avec des ratios décroissantes [204]. Alors que l'extrait de *Syzygium aromaticum* et l'extrait de *Laurus nobilis* n'ont montré aucun effet ni sur l'inhibition de l'anhydrase carbonique ni sur le rapport Na⁺ / K⁺. Ces caractéristiques suggèrent que les extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* pourraient avoir un mécanisme d'action similaire à celui des diurétiques thiazidiques, qui augmentent l'excrétion urinaire de sodium et de chlorure en bloquant le co-transport Na⁺ / Cl⁻ du tube distale [202].

Les diurétiques thiazidiques ainsi que les diurétiques de l'anse sont connus par l'hypokaliémie [205], aucun changement significatif dans les taux de potassium sérique n'a été observé lors de l'administration par voie orale des extraits de *Syzygium aromaticum* ou de *Laurus nobilis*. L'explication possible à ce phénomène serait due à la richesse en potassium de ces plantes [186, 187].

Tableau 21 : Effet du *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* et furosémide sur inhibition de l'anhydrase carbonique, et sur les activités salurétique et natriurétique chez les rats normaux après neuf jours du traitement.

	Eau distillée	Furosemide	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Laurus nobilis</i>
Salurétique (Na ⁺ + Cl ⁻)	251.50±2.07	413.50±3.98 ***a	401.25±12.74 ***a*b	452.06±2.06 ***a***b***c
Natriurétique (Na ⁺ /K ⁺)	2.13±0.06	2.47±0.22 **a	2.35±0.20	2.21±0.09
IAC [Cl ⁻ /(Na ⁺ + K ⁺)]	0.44±0.04	0.70±0.01 ***a	0.78±0.04 ***a***b	1.04±0.1 ***a***b***c

a: comparaison avec le groupe qui a reçu de l'eau distillée ; b: comparaison avec le groupe reçu furosémide; c: comparaison entre le groupe reçu *Syzygium aromaticum* et le groupe reçu *Laurus nobilis*. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Notre étude nous a menés à découvrir que les extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* n'ont engendré aucun changement pathologique au niveau du tissu rénal (**figure 29**).

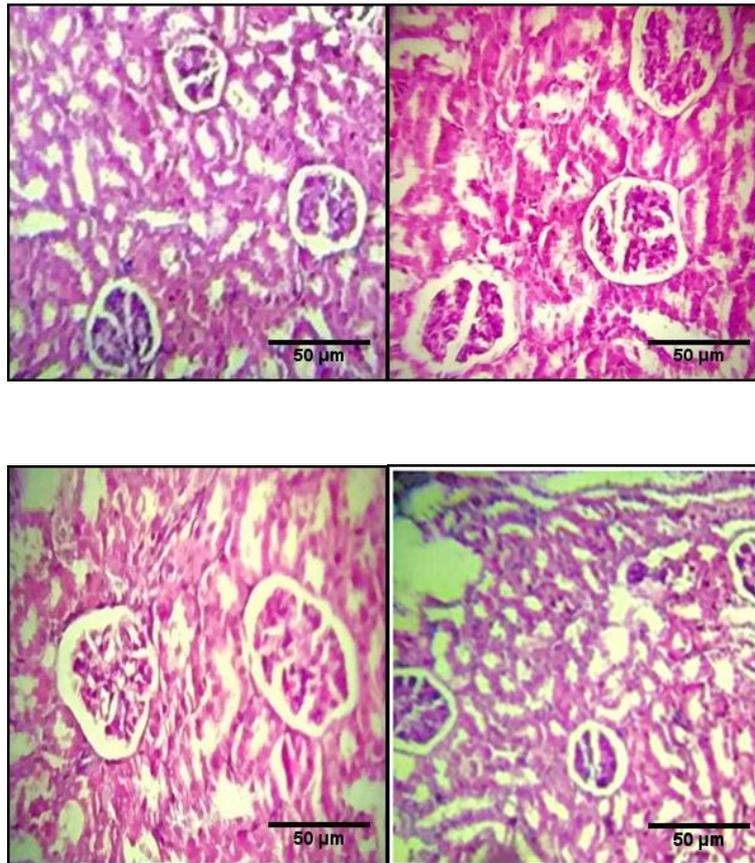


Figure 29 : Examen histologique du tissu rénal ; (a) : groupe eau distillée : tissu normal $\times 100$; (b) : groupe *Syzygium aromaticum* : tissu normal $\times 100$; groupe *Laurus nobilis*: tissu normal $\times 100$; (d): groupe furosemide: tissu normal $\times 100$.

L'analyse phytochimique de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* a montré la richesse de ces plantes en composés flavonoïdes tels que la quercétine, le kaempférol, la rutine, la catéchine, la lutéoline et l'apigénine [174, 188, 189]. Plusieurs études ont jusqu'à présent prouvé qu'il existe une relation entre les flavonoïdes et les effets diurétiques. Par exemple, en plus d'une étude qui a révélé que la lutéoline avait un effet diurétique et natriurétique [210], Junior et *al* ont montré que l'isoquercitrine en est aussi responsable avec un faible taux de potassium [211], et Mariano et *al* ont constaté les effets diurétiques et salurétiques d'épicatéchine [210]. Il semble donc possible que l'effet diurétique de l'extrait de *Syzygium aromaticum* et de l'extrait de *Laurus nobilis* soit attribué à leur teneur en flavonoïdes.

Les caractéristiques diurétiques de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* peuvent être explorées pour étudier d'autres propriétés pharmacologiques telles que l'effet hypotenseur [126].

III. Conclusion

La découverte la plus intéressante de l'étude actuelle est que l'administration orale quotidienne d'extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* ou de *Laurus nobilis* augmente la diurèse chez les rats normaux, sur une période de neuf jours, sans altération significative ni des électrolytes sanguins ni des tissus rénaux. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour clarifier le mécanisme d'action et le principe actif responsable de l'effet diurétique.

Chapitre IV : Exploration de l'effet protecteur des extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* contre l'hépatonéphrotoxicité provoquée par le peroxyde d'hydrogène chez les rats wistar

I. Introduction

Les radicaux libres sont naturellement présents dans l'organisme vivant, et comprennent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) [212]. Ils sont produits au cours du métabolisme de l'énergie au niveau de la cellule par la réduction de l'oxygène avec un électron formant ainsi l'anion superoxyde (O_2^-) et avec 2 ou 3 électrons il forme l' H_2O_2 , sous l'action d'enzymes telles que les oxydases, en plus du radical hydroxyle (OH). Il existe plusieurs facteurs tels que : la pollution de l'air et de l'eau, les médicaments, les toxines, les métaux lourds, les pesticides et la fumée de cigarette qui accroissent la production des espèces réactives de l'oxygène [213].

Quand les ERO sont présentes en concentration physiologique convenable, elles jouent un rôle important dans le maintien et le fonctionnement de l'organisme, mais par contre lorsque leurs production dépassé la capacité des cellules à les piéger, elles provoquent ainsi un état d'oxydation appelé stress oxydatif [214].

Les antioxydants d'origine exogènes tels que les vitamines E et C, les composés phénoliques, les flavonoïdes, flavonols, les flavones et les caroténoïdes aident les antioxydants endogènes à protéger le corps contre les diverses maladies résultantes du stress oxydatif [215].

Dans ce contexte, la présente étude a pour objectif d'étudier et évaluer l'effet protecteur des extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et du *Laurus nobilis* contre la toxicité nocive induite par H_2O_2 en comparant les résultats obtenus à ceux du témoin n'ayant reçus que de l'eau distillée puis à ceux obtenus du contrôle positif traité par le peroxyde d'hydrogène.

II. Résultats

1. Effet protecteur de l'extrait du *Syzygium aromaticum*.L contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène

1.1. Effet du peroxyde d'hydrogène et de l'extrait du *Syzygium aromaticum* sur les enzymes hépatiques chez le rat wistar

Le peroxyde d'hydrogène est un produit qui a des effets néfastes à une concentration élevée au-delà des normes physiologiques. Pour mettre en relief l'effet protecteur de l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum* sur la toxicité hépatique provoqué par H₂O₂, on a dosé les transaminases (AST et ALT) et la lactate déshydrogénase (LDH).

Les résultats illustrés dans la **figure 30** mettent en relief des augmentations significatives de l'ALT, AST et LDH chez le groupe traité par H₂O₂ par rapport aux autres groupes. De plus une association de H₂O₂ avec l'extrait aqueux de clou de girofle a rétabli modérément la stabilité de ces enzymes hépatique mieux que chez le groupe traité par l'eau distillée.

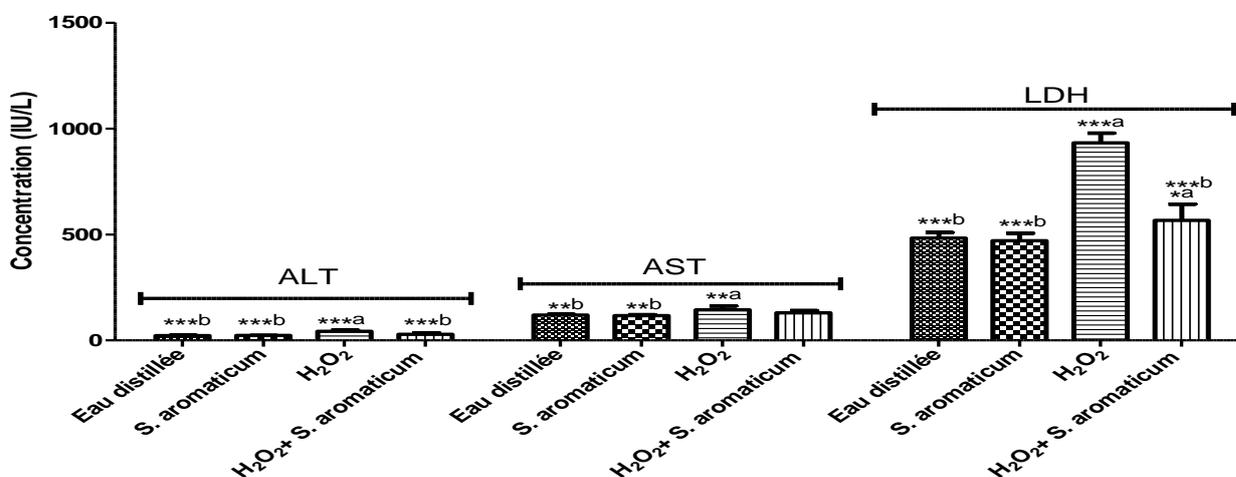


Figure 30 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur les enzymes hépatiques chez les rats wistar.

a : comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillée.

b : comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.

(*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

1.2. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum* sur le profile lipidique chez le rat wistar

Les résultats observés sur la **figure 31** montrent que H₂O₂ augmente le cholestérol total, le LDL, les triglycérides, le VLDL et diminue le HDL sans aucun changement significatif pour le groupe traité par l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* seul en le comparant au groupe témoin (traité par l'eau distillée). Par ailleurs on constate une légère diminution du cholestérol totale, triglycérides, VLDL et LDL chez le groupe traité par une combinaison de H₂O₂ et l'extrait aqueux en comparaison avec le groupe traité au H₂O₂ seul.

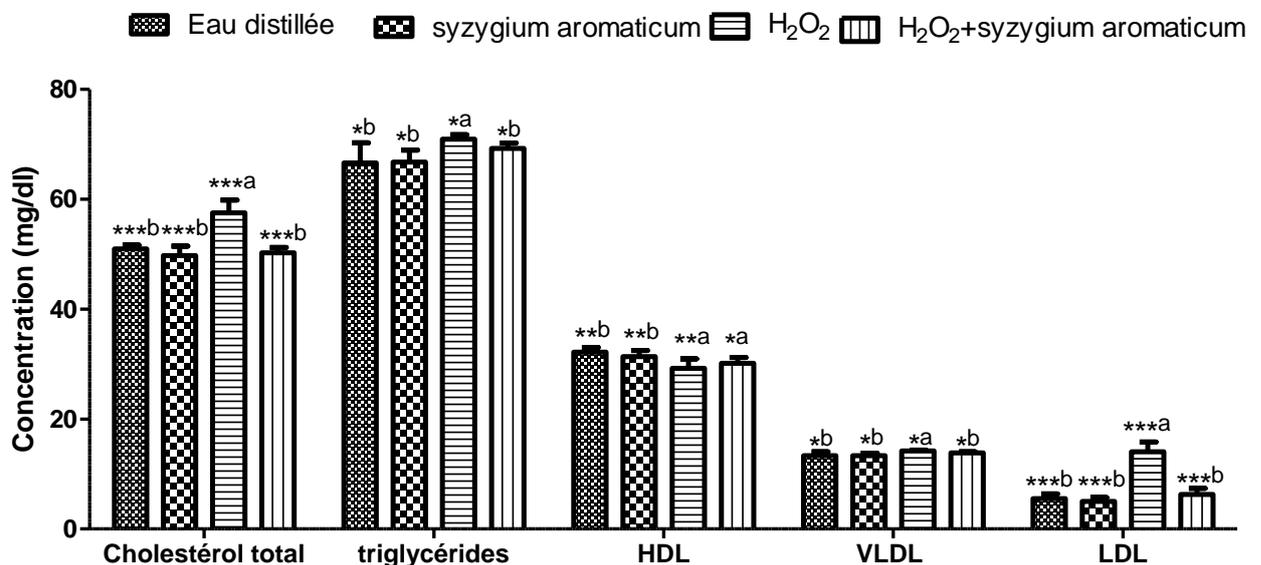


Figure 31 : Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur le profile lipidique chez le rat wistar

a : comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillé.
 b : comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.
 (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

1.3. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du *Syzygium aromaticum* sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine et albumine chez le rat wistar

Les résultats figurant dans le **tableau 22** confirment l'existence d'une remarquable perturbation des taux des paramètres biochimiques après le traitement par le peroxyde d'hydrogène (1%) à une dose de 300mg. Ce dernier provoque une augmentation de la créatinine et l'urée plasmatique et aussi une légère diminution des protéines et de l'albumine.

On remarque pour le groupe à qui on a administré le H₂O₂ + *Syzygium aromaticum* montre une certaine stabilité des paramètres par rapport au groupe témoin.

Tableau 22 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait par macération des clous de girofle sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine, et albumine chez les rats wistar.

	Eau distillé	<i>Syzygium aromaticum</i>	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + <i>Syzygium aromaticum</i>
Créatinine	0.390±0.029	0.400 ±0.033 ***b	0.900±0.104 ***a	0.490±0.029 *a***b
Urée	23.60±1.14	23.82±1.11 **b	28.75±3.77 **a	25.31±1.95
Protéine	43.00±2.16	43.12±3.83	42.20±1.79	43.67±1.29
Albumine	37.80±2.53	36.92±1.88	34.97±2.42	35.50±2.64

a : comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillée.

b : comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.

(*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

1.4. Effet du H₂O₂ et l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* sur le tissu hépatique et rénal

1.4.1. Foie

L'examen histopathologique du tissu hépatique a montré que le peroxyde d'hydrogène induisait une nécrose hépatique, inflammation des espaces porte et dilatation de la veine centrolobulaire. Cependant, lors de sa co-administration avec l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum*, il n'a causé que la dilatation de la veine centrolobulaire (**figure 32**).

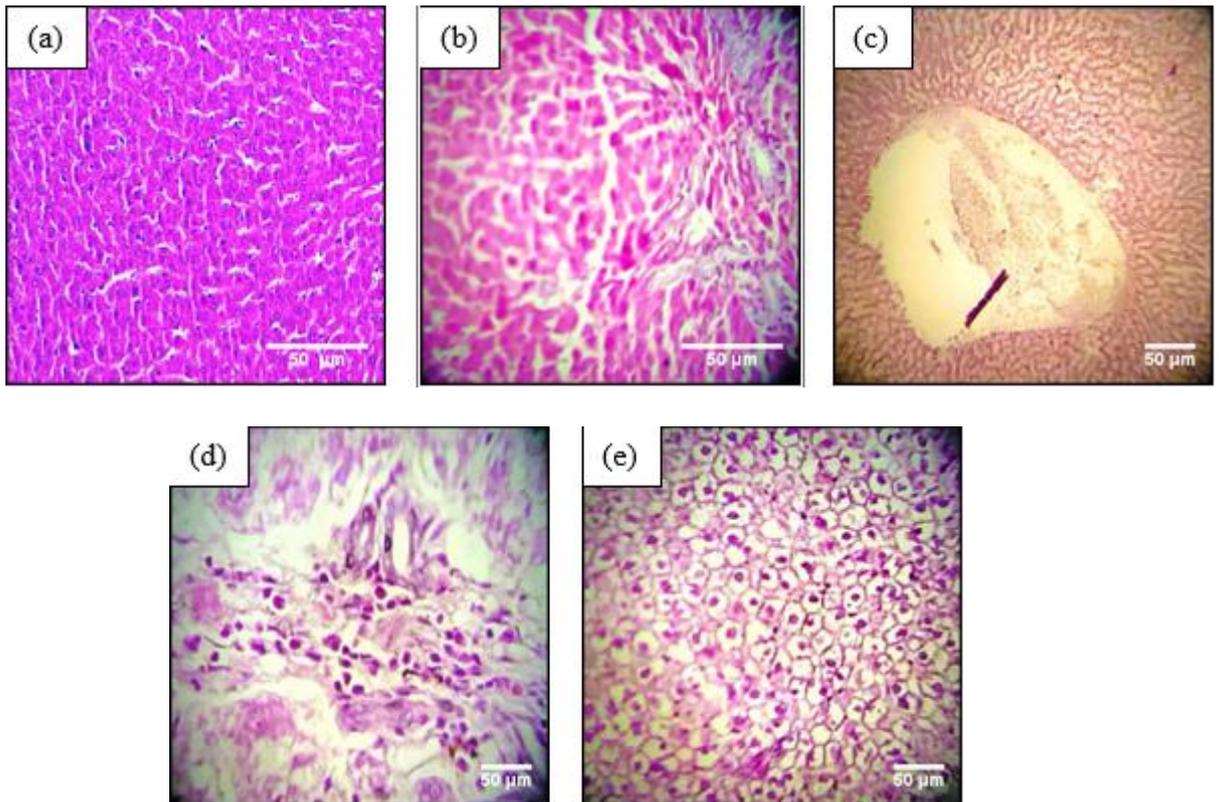


Figure 32 : analyse histologique du foie chez les rats Wistar stressés et les non- stressés

(a):Foie control : normal tissu $\times 100$; (b) : foie de *Syzygium aromaticum* : normal tissu $\times 100$; (c) : foie H_2O_2 : dilatation vasculaire $\times 200$;(d) : foie H_2O_2 : inflammation des espaces portes $\times 200$; (e) : foie H_2O_2 + *Syzygium aromaticum* : cellule par cytoplasme claire $\times 200$.

1.4.2. Rein

L'examen histopathologique du tissu rénal a montré que H_2O_2 induit une inflammation des cellules rénales, mais lorsqu'il a été administré avec l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*, il n'a pas provoqué de modification histopathologique (aspect normal) **(figure 33)**.

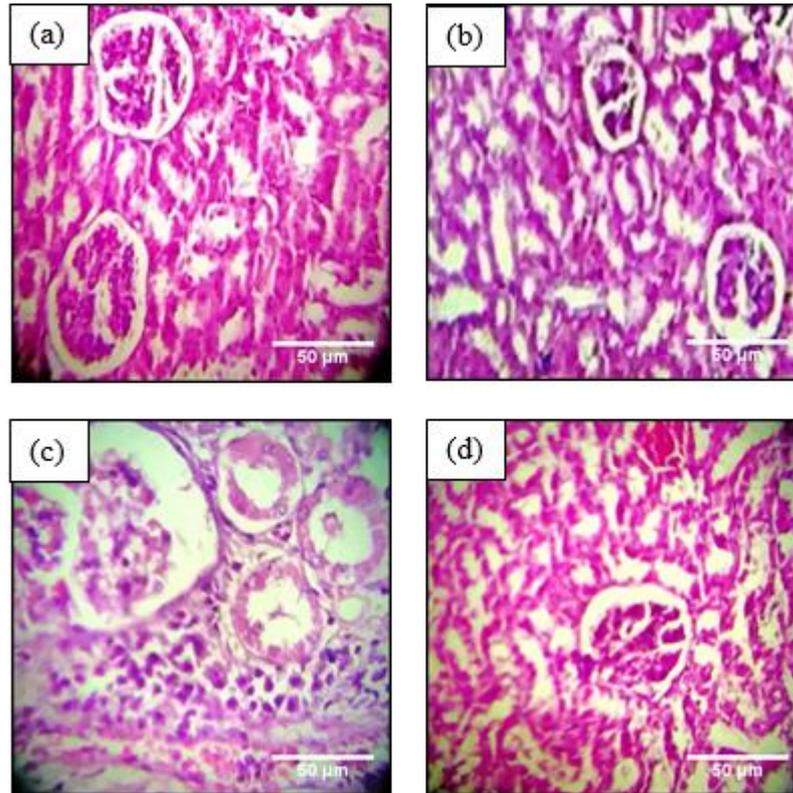


Figure 33 : analyse histologique des reins chez les rats Wistar stressés et les non- stressés

(a) : rein contrôle : tissu normal $\times 100$; (b) : Rein de *Syzygium aromaticum* : tissu normal $\times 100$; (c) : Rein H_2O_2 : présence de cellule inflammatoire $\times 100$; (d) : Rein H_2O_2 : tissu normal $\times 100$.

2. Effet protecteur de l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* L. contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène.

2.1. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du laurus nobilis sur les enzymes hépatiques chez les rats wistar.

Pour savoir l'effet protecteur de l'extrait aqueux du *Laurus nobilis* contre la toxicité induite par H_2O_2 , on a pratiqué un dosage des transaminases (AST, ALT) et la lactate déshydrogénase (LDH).

L'analyse des résultats présentés dans la **figure 34** montre une augmentation significative de l'ALT, AST et LDH chez le groupe traité par le peroxyde d'hydrogène en le comparant avec les autres groupes. Cependant l'association de H_2O_2 avec l'extrait aqueux du *laurus nobilis* a rétabli la stabilité de ces enzymes hépatiques.

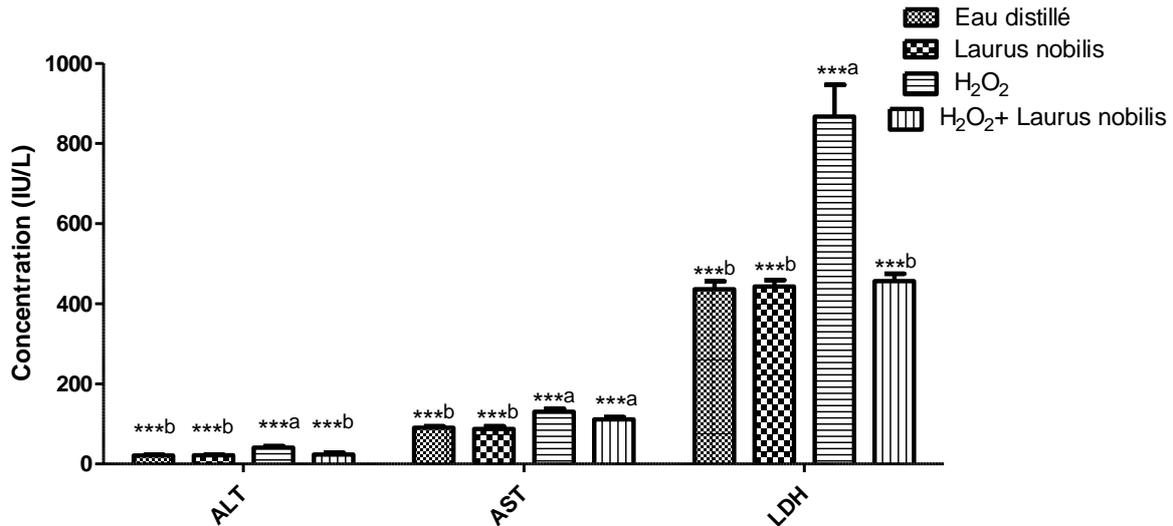


Figure 34 : Effet du peroxyde d'hydrogène l'extrait de laurus nobilis sur les enzymes hépatiques

a : comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillé.
 b : comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.
 (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

2.2. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait aqueux du Laurus nobilis sur le profil lipidique chez les rats wistar.

Les résultats illustrés dans la **figure 35** montrent que H₂O₂ augmente le cholestérol totale, triglycérides, LDL et VLDL et provoque une diminution de HDL. On note aussi qu'il n'a pas de changement significatif pour le groupe qui a été traité par l'extrait aqueux uniquement de *Laurus nobilis* en comparaison au groupe témoin (traité par l'eau distillée).

D'autre part on constate une diminution remarquable du cholestérol totale et du LDL, accompagnée d'une légère diminution des triglycérides, VLDL chez le groupe traité par une association de H₂O₂ et l'extrait en comparaison avec le groupe traité par H₂O₂ seul.

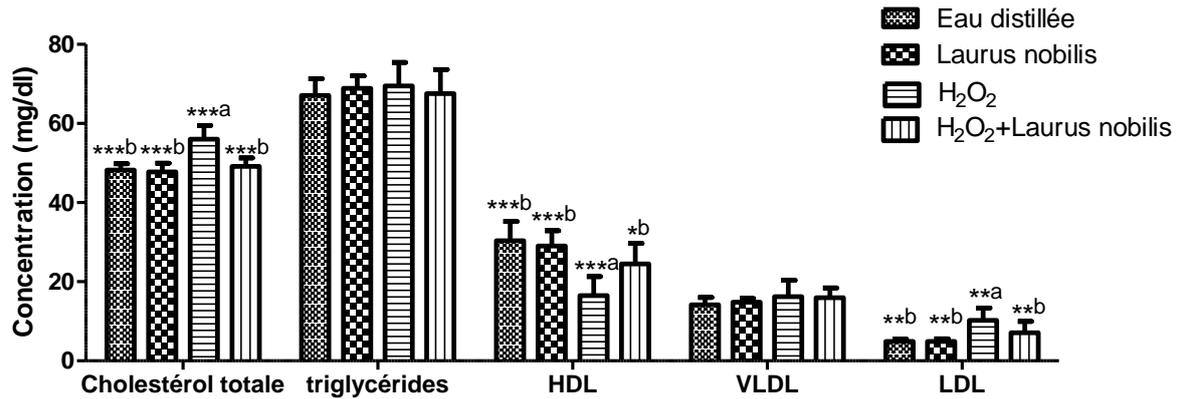


Figure 35 : effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait de laurus nobilis sur le profil lipidique chez les rats wistar.

a : comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillée.
 b : comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.
 (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

2.3. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du Laurus nobilis sur les taux sériques de la créatinine, urée, protéine et albumine chez les rats wistar

Les résultats figurant dans le **tableau 23** ont mis en évidence le dérèglement des paramètres biochimiques après le traitement par le H₂O₂, ce qui se manifeste par une élévation de la créatinine et l'urée plasmatique, avec une légère diminution de la protéine et de l'albumine.

Or, le groupe traité par une combinaison du H₂O₂ et l'extrait du laurier a pu garder une certaine stabilité des paramètres.

Tableau 23 : Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait de *Laurus nobilis* sur les taux sériques de la créatinine ; l'urée, la protéine, et l'albumine chez les rats wistar.

	Eau distillée	<i>Laurus nobilis</i>	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + <i>Laurus nobilis</i>
Créatinine	0.28±0.021	0.28 ±0.026 ***b	0.79±0.091 ***a	0.34±0.04 ***b
Urée	24.25±2.36	23.77±3.26	29.25±5.12	25.45±8.72
Protéine	57.50±2.38	56.62±2.86 ***b	39.95±0.82 ***a	50.17±2.18 ***a
Albumine	30.87±2.25	30.42±2.95 ***b	21.50±2.38 ***a	23.72±3.51 **a

a :comparaison entre tous les groupes et le groupe contrôle qui a reçu de l'eau distillée .

b :comparaison entre tous les groupes et le groupe qui a reçu le peroxyde d'hydrogène seul.

(**p < 0.01; ***p < 0.001).

2.4. Effet du peroxyde d'hydrogène et l'extrait du *Laurus nobilis* sur le tissu hépatique et rénal.

2.4.1. Foie

L'analyse de l'examen histologique du tissu hépatique a montré que le peroxyde d'hydrogène provoque une nécrose hépatocytaire avec dilatation vasculaire. Alors qu'il n'induit qu'une inflammation (présence de cellules inflammatoires) lors de la co-administration avec l'extrait aqueux du laurier (**figure 36**).

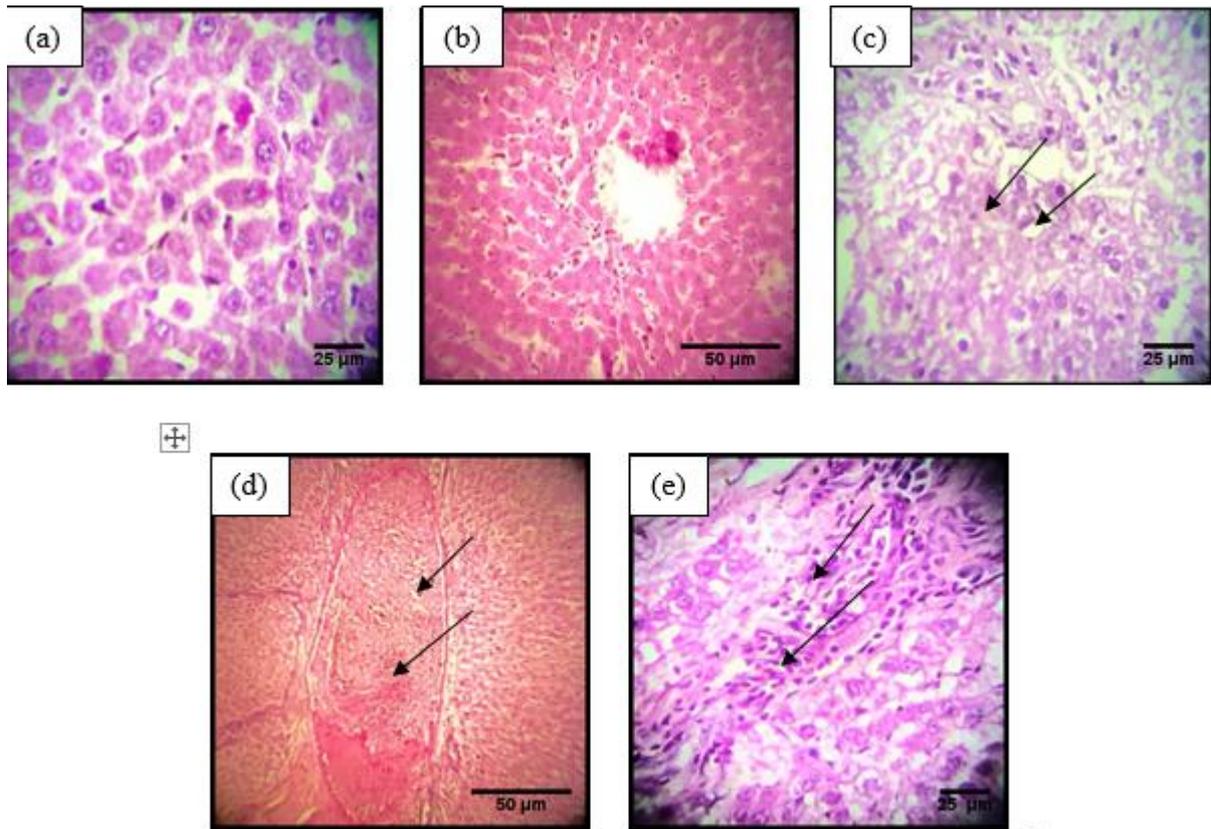


Figure 36 : coupes histologiques du foie des rats Wistar stressés et non stressés

(a) : foie contrôle : tissu normal $\times 200$; (b) : foie de *Laurus nobilis* : tissu normal $\times 100$; (c) : foie H_2O_2 : nécrose hépatocytaire $\times 200$; (d) : foie H_2O_2 : dilatation vasculaire $\times 100$; (e) : foie H_2O_2 + *Laurus nobilis* : présence de cellules inflammatoires $\times 200$.

2.4.2. Rein

L'observation des coupes histologiques rénale (**figure 37**) a permis de déduire que l'administration de H_2O_2 seul induit une inflammation des cellules rénales. Mais lorsque ce dernier a été administré avec l'extrait aqueux de laurier, il n'a pas provoqué de modification histopathologique dans le tissu rénal (aspect normal).

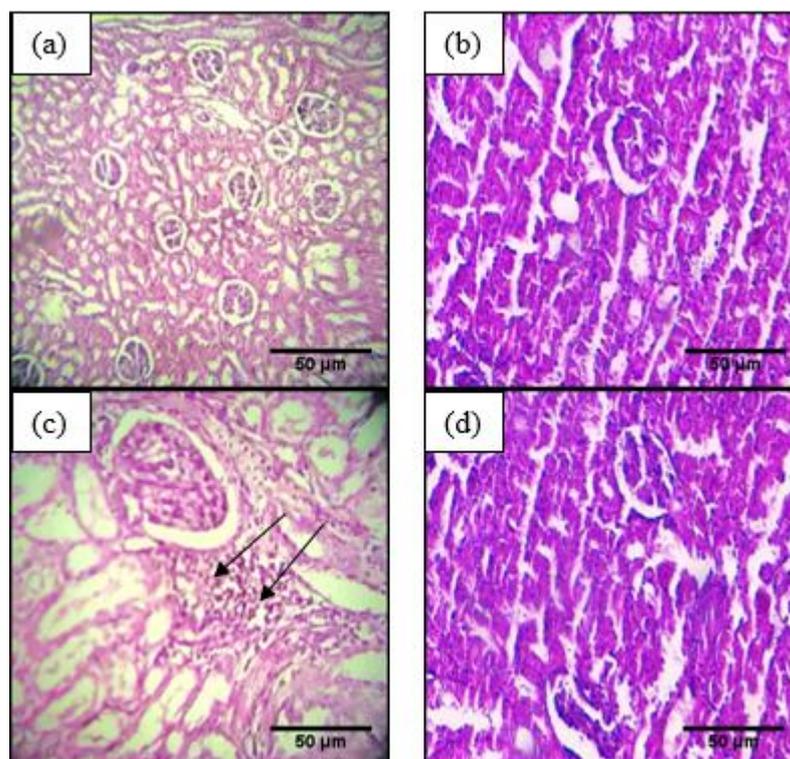


Figure 37 : coupes histologiques des reins des rats Wistar stressés et non stressés

- (a) Rein contrôle : tissu normal $\times 100$; (b) : Rein de *Laurus nobilis* : tissu normal $\times 100$; (c) : Rein H_2O_2 : présence de cellule inflammatoire $\times 100$; (d) : Rein H_2O_2 + *Laurus nobilis*: tissu normal $\times 100$.

III. Discussion

Ce travail évalue l'impact du peroxyde d'hydrogène sur la fonction rénale et hépatique chez les rats wistars et l'effet protecteur envisagé des extraits aqueux des deux plantes étudiées à savoir *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis*. En effet, les résultats de ce travail ont montré que les extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* avaient un effet protecteur sur les modifications biochimiques et un effet remédiateur des lésions histopathologiques induites par le peroxyde d'hydrogène au niveau du foie et du rein.

Le foie est un organe impliqué dans la biotransformation de médicaments et d'autres agents hépatotoxiques. Les taux plasmatiques des enzymes hépatiques ALT et AST sont considérés comme des indices fiables des lésions et des altérations de la fonction hépatique [196, 197]. Le lactate déshydrogénase (LDH) joue un rôle primordial dans le cycle glycolytique de la cellule dont le but est la conservation de l'énergie stockée. Cette enzyme est libérée à cause des dommages oxydatifs. Une étude *in vivo* a démontré que le H_2O_2 pris

dans l'eau de boisson (0.5%) entraînait une augmentation significative de AST, ALT [218]. Le traitement des rats par les extraits aqueux de *Syzygium aromaticum* et de *Laurus nobilis* seul ou en association au peroxyde d'hydrogène a remarquablement diminué l'intensité de la toxicité causée par une diminution de l'ALT, AST et LDH en comparaison avec les rats traités quotidiennement par le H₂O₂ seul. En effet le groupe traité par les extraits de plantes a montré une hépatoprotection. Plusieurs études ont montré la présence des diverses substances dans les plantes jouant un rôle hépatoprotectrice [199, 200]. Les résultats des études histologiques ont fourni des preuves pour les analyses biochimiques. La morphologie tissulaire du foie des groupes traités avec 300 mg/Kg PC des extraits du clou de girofle et du laurier ont montré des régions portales normales avec voies biliaires, veines et artères qui ont réussi à sauvegarder leur architecture hépatique.

L'hypercholestérolémie est étroitement liée au stress oxydatif. Lorsqu'il y'a trop de cholestérol qui circule dans le sang, il n'est pas utilisé en totalité par les cellules. En effet, notre étude prouve que le peroxyde d'hydrogène a augmenté les taux du cholestérol totale, des triglycérides, LDL et VLDL dans le plasma des rats. Une autre étude a montré que l'administration de H₂O₂ (0.1%) mélangé à l'eau de boisson aux rats pendant un traitement de 25 semaines a entraîné une augmentation des taux de malondialdéhyde, de l'activation de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase dans les organes [221]. Les résultats ont montré que le profile lipidique a connu des changements favorables après la supplémentation des extraits des deux plantes étudiées, le cholestérol total, les triglycérides, LDL et VLDL ont significativement diminué. L'augmentation du profile lipidique chez les rats stressés par H₂O₂ est due probablement à la perméabilité de la membrane cellulaire, et au dysfonctionnement hépatique [202, 203].

Le foie est le seul site de synthèse d'albumine en quantité incomparable par rapport aux autres organes. C'est un moyen utile pour l'indication de la fonction hépatique [204, 205]. Dans cette recherche, le peroxyde d'hydrogène a provoqué une diminution significative de l'albumine et des protéines totales plasmatiques chez les rats stressés et qui présentent une hépatotoxicité, ces résultats sont en accord avec ceux de Nita et Grzybowski [226]. La diminution remarquable de ces protéines est due à la réduction des cellules hépatiques suite à une nécrose [227]. Mais pour les groupes traités par les extraits aqueux des plantes on remarque un rétablissement des taux plasmatiques de protéines et d'albumine.

La créatinine et l'urée sont des biomarqueurs plasmatiques de la fonction rénale et sont aussi des produits métaboliques que les reins éliminent de la circulation pour éviter leur

accumulation. L'augmentation des taux plasmatiques de ces biomarqueurs est considérée comme un indicateur de la perturbation de la fonction rénale.

Dans la présente étude, nous avons constaté l'atteinte rénale induite par le peroxyde d'hydrogène, cette néphrotoxicité est traduite par des taux élevés de la créatinine et de l'urée. La co-administration des extraits de plante et le H₂O₂ a significativement diminué les taux des paramètres biochimiques analysés, et par conséquent ces extraits protègent efficacement contre la néphrotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène. Cette néphroprotection garantie grâce aux substances présentes dans les extraits aqueux des deux plantes et qui protègent le tissu rénal des dommages oxydatifs provoqués par H₂O₂, a été confirmée par des examens histologiques. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres études [217, 228].

Conclusion générale et perspectives

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées par l'Homme depuis l'antiquité pour se soigner, se guérir et se prévenir de différentes maladies. Selon l'organisation mondiale de la santé, plus de 80% de la population mondiale dépendent encore de la médecine traditionnelle pour se guérir.

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires que les plantes synthétisent en vue de défendre et de se protéger des agents extérieurs. Elles sont constituées d'un mélange de substances aromatiques dont la composition chimique est complexe, cette mixture de molécules bioactives leur procure une grande importance et utilité dans divers domaines à savoir pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique vue leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes très intéressantes. Plusieurs études scientifiques se sont focalisées sur les propriétés biologiques des plantes aromatiques et médicinales dans le but de développer de nouveaux médicaments vue leurs richesses en composés phénoliques et flavonoïdes.

De ce fait, la présente thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources végétales notamment de *Laurus nobilis* et de *Syzygium aromaticum* par le biais de la détermination de leur composition chimique, et l'évaluation de leur activité antibactérienne et antioxydante par le biais de l'exploration des extraits aqueux chez le rat wistar afin d'évaluer leurs effets diurétiques et les tester contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène.

Les huiles essentielles des deux plantes étudiées sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. Leurs compositions chimiques ont été déterminées par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM). Les résultats de l'analyse chromatographique a permis l'identification de quatre composés représentant plus de 99.28% de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* dont l'eugenol est

le composé majeur (87.03%) suivi de l'acétate d'eugenyl (11.25%) et de deux composés minoritaires représentant moins de 2%.

Alors que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* est constituée de vingt-huit composés, dont six composés majeurs : 1,8-cinéole (26.76%), 1- α -pinène (8.63%), linalool (7.78%), 2-carène (7.81%), α -terpineol (6.94%) et eugenyl methyl éther (6.63%).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide de cinq souches qui causent les infections nosocomiales néonatales. Les résultats ont montré que toutes les souches bactériennes ont été sensibles aux huiles essentielles avec des diamètres d'inhibition importants et des CMI de 3.75 $\mu\text{g/ml}$ et de 11.25 $\mu\text{g/ml}$ pour huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et pour *Laurus nobilis* respectivement.

En outre, l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* a confirmé les propriétés de piégeage de radicaux libres de différents oxydants. Les extraits des deux plantes sont riches en phénols et flavonoïdes totaux qui diffèrent d'un extrait à l'autre ce qui les dote d'une puissante activité antioxydante.

L'étude pharmacologique s'est faite sur deux parties. Le premier volet de l'étude in vivo a été effectué en évaluant l'effet diurétique des extraits aqueux du *Syzygium aromaticum* et du *Laurus nobilis* séparément. Les résultats ont démontré que les extraits aqueux des deux plantes ont augmenté l'excrétion urinaire avec amélioration des taux des électrolytes urinaire et sans aucun changement dans l'anatomie tissulaire rénale chez les rats wistar, en les comparant avec des rats traités avec du furosémide qui est un médicament diurétique de référence.

Le deuxième volet de l'étude in vivo est l'étude de l'effet protecteur des extraits aqueux des deux plantes contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène. L'administration quotidienne de ce dernier à une dose de 10 ml/Kg PC pendant 15 jours de traitement a provoqué chez les rats wistar une néphro-hépatotoxicité. Cependant, la co-administration de l'extrait aqueux des plantes à une dose de 300 mg/Kg PC pendant 12 jours a permis le rétablissement des rats vis-vis du H_2O_2 , avec une amélioration des enzymes hépatiques (AST, ALT et LDH), ainsi qu'une amélioration des paramètres plasmatiques tels que la créatinine, les protéines, urée qui témoignent du bon fonctionnement rénal. Cette amélioration ou protection contre la néphro-hépatotoxicité est justifiée par des analyses

histopathologiques des reins et foies des rats stressés et traités par les extraits de plantes en les comparant avec les rats témoins qui n'ont reçu que de l'eau distillée.

Enfin, nos résultats prouvent que les huiles essentielles et les extraits de *Syzygium aromaticum* et *Laurus nobilis* sont doués d'activité biologique très remarquables. En effet il est possible de les utiliser en thérapie en tant qu'alternative naturelle aux agents chimiothérapeutiques.

En perspective, d'autres recherches sont nécessaires pour compléter ce travail, notamment la HPLC pour identifier les molécules existant dans les extraits aqueux des deux plantes et l'isolement et la purification des molécules bioactives qui sont contenues dans ces huiles essentielles.

Les résultats concernant la combinaison des huiles essentielles avec d'autres agents antibactériens demeurent prometteurs, et pourraient servir de base pour des études ultérieures afin de proposer son utilisation en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs par l'élaboration de nouvelles formulations pharmaceutiques à base de ce mélange pour traiter les infections et pour désinfecter l'atmosphère des établissements de santé.

Références

1. WHO Traditional Medicine, World Health Organisation.
2. Richard, H. *Epices et aromates; sciences et techniques agroalimentaires*; Lavoisier.; 1992;
3. Wright, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1451–1470.
4. Levy, S.B. Antibiotic resistance—the problem intensifies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1446–1450.
5. Monroe, S.; Polk, R. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 496–501.
6. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 405–410.
7. Latini, A.; Pereira, P.J.S.; Couture, R.; Campos, M.M.; Talbot, S. Oxidative Stress: Neuropathy, Excitability, and Neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–2.
8. Khan, A.M.; Korzeniowska, B.; Gorshkov, V.; Tahir, M.; Schröder, H.; Skytte, L.; Rasmussen, K.L.; Khandige, S.; Møller-Jensen, J.; Kjeldsen, F. Silver nanoparticle-induced expression of proteins related to oxidative stress and neurodegeneration in an *in vitro* human blood-brain barrier model. *Nanotoxicology* **2019**, *13*, 221–239.
9. Ren, X.; Santhosh, S.M.; Coppo, L.; Ogata, F.T.; Lu, J.; Holmgren, A. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *134*, 350–358.

10. Wu, Q.; Wang, X.; Nepovimova, E.; Wang, Y.; Yang, H.; Kuca, K. Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: Oxidative stress, autophagy, and signalings. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *118*, 889–907.
11. Barkaoui, M.; Katiri, A.; Boubaker, H.; Msanda, F. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 338–350.
12. Wyk, B.-E.V. A family-level floristic inventory and analysis of medicinal plants used in Traditional African Medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *249*, 112351.
13. Sen, T.; Samanta, S.K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, *147*, 59–110.
14. Thuille, N.; Fille, M.; Nagl, M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, *206*, 217–221.
15. Gazengel, J.-M.; Orecchioni, A.-M. *le préparateur en pharmacie*; 2^{ème} édition Lavoisier.; Paris;
16. Bellakhdar, J.; Claisse, R.; Fleurentin, J.; Younos, C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *35*, 123–143.
17. Khouya, T.; Ramchoun, M.; Amrani, S.; Harnafi, H.; Rouis, M.; Couchie, D.; Simmet, T.; Alem, C. Anti-inflammatory and anticoagulant effects of polyphenol-rich extracts from *Thymus atlanticus*: An in vitro and in vivo study. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *252*, 112475.
18. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253.
19. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. 18.
20. Paris, M.; Hurabielle, M. *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)*; Masson.; 1981;

21. Sharifi-Rad, J.; Sureda, A.; Tenore, G.C.; Daglia, M.; Sharifi-Rad, M.; Valussi, M.; Tundis, R.; Sharifi-Rad, M.; Loizzo, M.R.; Ademiluyi, A.O.; et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *22*.
22. Bruneton, Jean *Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales.*; 5^{ème} édition.; Technique et documentation, 2016;
23. Couic-Marinier, F.; Lobstein, A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actual. Pharm.* **2013**, *52*, 18–21.
24. Marouf, A.; Tremblin, G. *Abrégé de biochimie appliquée*; Grenoble Sciences; 2^{ème} Edition.; EDP Sciences, 2016;
25. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*; Başer, K.H.C., Buchbauer, G., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, 2010; ISBN 978-1-4200-6315-8.
26. Kamari, F.E.; Taroq, A.; Atki, Y.E.; Aouam, I.; Oumokhtar, B.; Lyoussi, B.; Abdellaoui, A. Cymbopogon Nardus L. Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. *4*.
27. Festy, D. *Ma bible des huiles essentielles*; Leduc Editions.; 2007;
28. Benjilali, B. Extraction des plantes aromatiques et médicinales Cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. *43*.
29. Shellie, R.; Marriott, P.; Chaintreau, A. Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part 1): Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control 2004, 91–98.
30. Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 1079–1086.
31. Guignard, J.-L. Biochimie végétale. In *Biochimie Végétale*; Lavoisier, 2000; p. 166.

32. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
33. Paolini, J. *Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de Cistus albidus et de deux Asteraceae endémiques de Corse: Eupatorium cannabinum subsp. corsicum et Doronicum corsicum*; 2005;
34. Bouchonnet, S.; Libong, D. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. 25.
35. Barla, A.; Topcu, G.; Oksuz, S.; Tumen, G.; Kingston, D. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1478–1484.
36. Bedi, G.; Tonzibo, Z.F.; Oussou, K.R.; Choppard, C.; Mahy, J.P.; N'Guessan, T.Y. Effect of essential oil of *Chromolaena odorata* (Asteraceae) from Ivory Coast, on cyclooxygenase function of prostaglandin-H synthase activity. **2010**, *4*.
37. Bi, K.; Jacques, C.; Bedi, G.; Silvestre, V.; Loquet, D.; Barille-Nion, S.; Robins, R.; Tea, I. *Phytochemicals Isolated from Leaves of Chromolaena odorata : Impact on Viability and Clonogenicity of Cancer Cell Lines*; 2013; Vol. 27;.
38. Ogunwande, I.A.; Avoseh, O.N.; Olasunkanmi, K.N.; Lawal, O.A.; Ascrizzi, R.; Flamini, G. Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *232*, 188–192.
39. Sharma, P.R.; Mondhe, D.M.; Muthiah, S.; Pal, H.C.; Shahi, A.K.; Saxena, A.K.; Qazi, G.N. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179*, 160–168.
40. Celia, C.; Trapasso, E.; Locatelli, M.; Navarra, M.; Ventura, C.A.; Wolfram, J.; Carafa, M.; Morittu, V.M.; Britti, D.; Di Marzio, L.; et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 548–553.
41. Pudziuvelyte, L.; Stankevicius, M.; Maruska, A.; Petrikaite, V.; Ragazinskiene, O.; Draksiene, G.; Bernatoniene, J. Chemical composition and anticancer activity of *Elsholtzia*

ciliata essential oils and extracts prepared by different methods. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *107*, 90–96.

42. Kumar, P.; Febriyanti, R.; Sofyan, F.; Luftimas, D.; Abdulah, R. Anticancer potential of *Syzygium aromaticum* L. in MCF-7 human breast cancer cell lines. *Pharmacogn. Res.* **2014**, *6*, 350.

43. Ali, S.; Prasad, R.; Mahmood, A.; Routray, I.; Shinkafi, T.S.; Sahin, K.; Kucuk, O. Eugenol-rich Fraction of *Syzygium aromaticum* (Clove) Reverses Biochemical and Histopathological Changes in Liver Cirrhosis and Inhibits Hepatic Cell Proliferation. *J. Cancer Prev.* **2014**, *19*, 288–300.

44. Zohri, A.-N.; Abdel-Gawad, K.; Saber, S. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiol. Res.* **1995**, *150*, 167–172.

45. Taban, A.; Saharkhiz, M.J.; Niakousari, M. Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) essential oil and its chemical composition, antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. *Sustain. Chem. Pharm.* **2018**, *9*, 12–18.

46. Xu, J.-G.; Liu, T.; Hu, Q.-P.; Cao, X.-M. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **2016**, *21*, 1194.

47. Owlia, P.; Saderi, H.; Rasooli, I.; Sefidkon, F. Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. **2009**, *8*.

48. Omidbeygi, M.; Barzegar, M.; Hamidi, Z.; Naghdibadi, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* **2007**, *18*, 1518–1523.

49. Yang, V.W.; Clausen, C.A. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, *59*, 302–306.

50. Raimundo, K.F.; Bortolucci, W. de C.; Glamočlija, J.; Soković, M.; Gonçalves, J.E.; Linde, G.A.; Colauto, N.B.; Gazim, Z.C. Antifungal activity of *Gallesia integrifolia* fruit essential oil. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 229–235.

51. Bedoya-Serna, C.M.; Dacanal, G.C.; Fernandes, A.M.; Pinho, S.C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 929–935.
52. Prasad, R.C.; Herzog, B.; Boone, B.; Sims, L.; Waltner-Law, M. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 295–301.
53. Couic Marinier, F.; Lobstein, A. *Composition chimique des huiles essentielles*; 2013; Vol. 52;.
54. Palma, C.E.; Cruz, P.S.; Cruz, D.T.C.; Bugayong, A.M.S.; Castillo, A.L. Chemical composition and cytotoxicity of Philippine calamansi essential oil. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *128*, 108–114.
55. Melo, C.R.; Picanço, M.C.; Santos, A.A.; Santos, I.B.; Pimentel, M.F.; Santos, A.C.C.; Blank, A.F.; Araújo, A.P.A.; Cristaldo, P.F.; Bacci, L. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. *Crop Prot.* **2018**, *104*, 47–51.
56. Tu, X.-F.; Hu, F.; Thakur, K.; Li, X.-L.; Zhang, Y.-S.; Wei, Z.-J. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 192–200.
57. Radulović, N.S.; Genčić, M.S.; Stojanović, N.M.; Randjelović, P.J.; Stojanović-Radić, Z.Z.; Stojiljković, N.I. Toxic essential oils. Part V: Behaviour modulating and toxic properties of thujones and thujone-containing essential oils of *Salvia officinalis* L., *Artemisia absinthium* L., *Thuja occidentalis* L. and *Tanacetum vulgare* L. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *105*, 355–369.
58. Laccourreye, O.; Werner, A.; Laccourreye, L.; Bonfils, P. La phytothérapie en pratique clinique en otorhinolaryngologie : apport, limites et risques. *Ann. Fr. Oto-Rhino-Laryngol. Pathol. Cervico-Faciale* **2017**, *134*, 90–95.
59. Lamendin, H.; Toscano, G.; Requirand, P. Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *EMC - Dent.* **2004**, *1*, 179–192.

60. Dacosta, Y. *Les Phytonutriments bioactifs*; Éditions Yves Dacosta: Paris, 2003; ISBN 978-2-9518220-0-9.
61. Miguel, M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 291–312.
62. Ansari, K.N. The free radicals--the hidden culprits--an update. *Indian J. Med. Sci.* **1997**, *51*, 319–336.
63. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40.
64. Chen, L.; Hu, J.Y.; Wang, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *67*, 1013–1024.
65. Mena, S.; Ortega, A.; Estrela, J.M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat. Res.* **2009**, *674*, 36–44.
66. Michel, F.; Bonnefont-Rousselot, D.; Mas, E.; Draï, J.; Théron, P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* **2008**, *66*, 17.
67. Sohal, R.S.; Mockett, R.J.; Orr, W.C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 575–586.
68. Ece, A.; Gurkan, F.; Celik, F.; Bosnak, M.; Yel, S.; Balik, H.; Erel, O. Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 634–639.
69. Liou, G.-Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*.
70. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1250–1258.
71. Baraibar, M.A.; Friguet, B. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp. Gerontol.* **2013**, *48*, 620–625.
72. Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* **2012**, *2012*, 137289.

73. Atkin, M.A.; Gasper, A.; Ullegaddi, R.; Powers, H.J. Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2138–2144.
74. Nakajima, K.; Nakano, T.; Tanaka, A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2006**, *367*, 36–47.
75. Barouki, R. Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences* **2006**, *22*, 266–272.
76. Zhao, Z.; Zhao, C.; Zhang, X.H.; Zheng, F.; Cai, W.; Vlassara, H.; Ma, Z.A. Advanced glycation end products inhibit glucose-stimulated insulin secretion through nitric oxide-dependent inhibition of cytochrome c oxidase and adenosine triphosphate synthesis. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2569–2576.
77. Favier, A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* **2006**, *64*, 390–396.
78. Gardès-Albert, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Abedinzadeh, Z. Espèces réactives de l’oxygène. 6.
79. Winter, J.; Ilbert, M.; Graf, P.C.F.; Ozcelik, D.; Jakob, U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **2008**, *135*, 691–701.
80. Kim, J.R.; Yoon, H.W.; Kwon, K.S.; Lee, S.R.; Rhee, S.G. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal. Biochem.* **2000**, *283*, 214–221.
81. White, N.J. Artemisinin: current status. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *88 Suppl 1*, S3-4.
82. Soengas, P.; Sotelo, T.; Velasco, P.; Cartea, M.E. Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. *Glob. Sci. Books* **2011**, 13.
83. Lehucher-Michel, M.P.; Lesgards, J.F.; Delubac, O.; Stocker, P.; Durand, P.; Prost, M. [Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention]. *Presse Medicale Paris Fr. 1983* **2001**, *30*, 1076–1081.

84. Retsky, K.L.; Chen, K.; Zeind, J.; Frei, B. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 90–98.
85. Drake, I.M.; Davies, M.J.; Mapstone, N.P.; Dixon, M.F.; Schorah, C.J.; White, K.L.; Chalmers, D.M.; Axon, A.T. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 559–562.
86. Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288–306.
87. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2576–2581.
88. Mateos, R.; Vera, S.; Díez-Pascual, A.M.; San Andrés, M.P. Graphene solid phase extraction (SPE) of synthetic antioxidants in complex food matrices. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 223–230.
89. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **2004**, *26*, 10.
90. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
91. Moon, J.-K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.
92. Duan, X.; Wu, G.; Jiang, Y. Evaluation of the Antioxidant Properties of Litchi Fruit Phenolics in Relation to Pericarp Browning Prevention. *Molecules* **2007**, *12*, 759–771.
93. Valvi, S.R.; Rathod, V.S.; Yesane, D.P. Screening of three wild edible fruits for their antioxidant potential. **2011**, *5*.
94. Rosenthal, V.D.; Maki, D.G.; Mehta, Y.; Leblebicioglu, H.; Memish, Z.A.; Al-Mousa, H.H.; Balkhy, H.; Hu, B.; Alvarez-Moreno, C.; Medeiros, E.A.; et al. International

Nosocomial Infection Control Consortiu (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. *Am. J. Infect. Control* **2014**, *42*, 942–956.

95. Chemsî, M.; Chahid, I.; Lehlîmi, M.; Aalloula, O.; Zerouali, K.; Habzi, A.; Benomar, S. Incidence des infections bactériennes nosocomiales. Hôpital d'enfants Abderrahim Harouchi, CHU Ibn Rochd, Casablanca, Maroc. *J. Pédiatrie Puériculture* **2013**, *26*, 11–18.

96. Gastmeier, P.; Kampf, G.; Wischnewski, N.; Hauer, T.; Schulgen, G.; Schumacher, M.; Daschner, F.; Ruden, H. Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. *J. Hosp. Infect.* **1998**, *38*, 37–49.

97. Greatorex, J.; M Thorne, G. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and Escherichia coli O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **1994**, *32*, 1172–8.

98. Chart, H.; Rowe, B. Improved detection of infection by Escherichia coli O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome by means of IgA antibodies to lipopolysaccharide. *J. Infect.* **1992**, *24*, 257–61.

99. Maoulainine, F.-M.-R.; Elidrissi, N.-S.; Chkil, G.; Abba, F.; Soraa, N.; Chabaa, L.; Amine, M.; Aboussad, A. Épidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale marocain. *Arch. Pédiatrie* **2014**, *21*, 938–943.

100. Bertrand, X.; Slekovec, C.; Cholley, P.; Talon, D. Épidémiologie des infections à Pseudomonas aeruginosa. *Rev. Francoph. Lab.* **2011**, *2011*, 35–40.

101. Tong, S.Y.C.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 603–661.

102. Shafi, M.S.; Datta, N. INFECTION CAUSED BY PROTEUS MIRABILIS STRAINS WITH TRANSFERABLE GENTAMICIN-RESISTANCE FACTORS. *The Lancet* **1975**, *305*, 1355–1357.

103. Jacobsen, S.M.; Shirliff, M.E. Proteus mirabilis biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence* **2011**, *2*, 460–465.

104. Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T.; Pearson, M.M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* **2018**, *8*.
105. Andersson, D.I.; Hughes, D.; Kubicek-Sutherland, J.Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* **2016**, *26*, 43–57.
106. Henwood, C.J.; Livermore, D.M.; James, D.; Warner, M. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 789–799.
107. Waterer, G.W.; Wunderink, R.G. Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Crit. Care Med.* **2001**, *29*, N75-81.
108. Poole, K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *antimicrob agents chemother* **2000**, *44*, 5.
109. Sampaio, F.J.; Mandarim-de-Lacerda, C.A. [Morphometry of the kidney. Applied study in urology and imaging]. *J. Urol. (Paris)* **1989**, *95*, 77–80.
110. Ramilitiana, B.; Dodo, M.; Rakotoarimanga, H.N.; Randriamboavonjy, R.L.; Randriamarotia, W.F. Dimensions rénales en Service de Néphrologie Clinique, Befelatanana, Antananarivo. *Pan Afr. Med. J.* **2016**, *24*.
111. Ronco, C.; Chawla, L.S. Glomerular and Tubular Kidney Stress Test: New Tools for a Deeper Evaluation of Kidney Function. *Nephron* **2016**, *134*, 191–194.
112. Hackbarth, H.; Baunack, E.; Winn, M. Strain differences in kidney function of inbred rats: 1. Glomerular filtration rate and renal plasma flow. *Lab. Anim.* **1981**, *15*, 125–128.
113. Dunn, A.; Donnelly, S. The Role of the Kidney in Blood Volume Regulation: The Kidney as a Regulator of the Hematocrit. *Am. J. Med. Sci.* **2007**, *334*, 65–71.
114. Iida, K.; Shinki, T.; Yamaguchi, A.; DeLuca, H.F.; Kurokawa, K.; Suda, T. A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 6112–6116.

115. Dussol, B. Équilibre potassique, hypokaliémie et hyperkaliémie. *Néphrologie Thérapeutique* **2010**, *6*, 180–199.
116. Girerd, X.; Hansel, B. Hypertension artérielle chez les patients obèses : physiopathologie et prise en charge. *Presse Médicale* **2009**, *38*, 609–613.
117. Eladari, D.; Chambrey, R.; Leviel, F. Identification d'une nouvelle cible des diurétiques thiazidiques dans le rein. *médecine/sciences* **2010**, *26*, 549–552.
118. Seidowsky, A.; Moulonguet-Doleris, L.; Hanslik, T.; Yattara, H.; Ayari, H.; Rouveix, E.; Massy, Z.A.; Prinseau, J. Les acidoses tubulaires rénales. *Rev. Médecine Interne* **2014**, *35*, 45–55.
119. Taroq, A. ; El Kamari, F. ; Aouam, I. ; El Atki, Y. ; Lyoussi, B. ; Abdellaoui, A. antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of laurus nobilis l. from morocco. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2018**, *11*, 540.
120. El Atki, Y.; Aouam, I.; El kamari, F.; Taroq, A.; Lyoussi, B.; Taleb, M.; Abdellaoui, A. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from Teucrium polium growing wild in Morocco. *Mater. Today Proc.* **2019**, *13*, 777–783.
121. Aouam, I.; EL Atki, Y.; Taleb, M.; Taroq, A.; EL Kamari, F.; Lyoussi, B.; Abdellaoui, A. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Thymus riararum. *Mater. Today Proc.* **2019**, *13*, 579–586.
122. Mariano, L.N.B.; Boeing, T.; da Silva, R. de C.M.V. de A.F.; Cechinel-Filho, V.; Niero, R.; da Silva, L.M.; de Souza, P.; Andrade, S.F. de Preclinical evaluation of the diuretic and saluretic effects of (-)-epicatechin and the result of its combination with standard diuretics. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2018**, *107*, 520–525.
123. Chakraborty, M.; Kamath, J.V.; Bhattacharjee, A. Potential Interaction of Green Tea Extract with Hydrochlorothiazide on Diuretic Activity in Rats. *Int. Sch. Res. Not.* **2014**, *2014*, 1–5.

124. Liu, X.L.; Wang, D.D.; Wang, Z.H.; Meng, D.L. Diuretic Properties and Chemical Constituent Studies on *Stauntonia brachyanthera*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 1–8.
125. Prando, T.B.L.; Baciquete, T. da F.; Vieira, J.A.C.; Bressan, J.; Gasparotto, F.M.; Jesus, D.R.; Cardozo Junior, E.L.; Lourenço, E.L.B.; Gasparotto Junior, A. Amides from *Piper* as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of *Piper glabratum* Kunth. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 1–5.
126. Ntchapda, F.; Djedouboum Abakar; Kom, B.; Nana, P.; Bonabe, C.; Maguirgue Kakesse; Talla, E.; Dimo, T. Diuretic Activity of the Aqueous Extract Leaves of *Ficus glumosa* Del. (Moraceae) in Rats. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–10.
127. El Alalaoui Faris, F.Z.; El Oualidi, J.; Fennane, M.; Ibn Tattou, M.; Mathez, J.; Ouchbani, S.; Ouyahya, A.; Raymaud, C.; Salvo Tierra, Á.; El Abidine, A.Z. *Flore Pratique du Maroc*; 1999; ISBN 9954-0-1456-X.
128. Amin, G.; H Salehi Sourmaghi, M.; Jafari, S.; Hadjagae, R.; Yazdinezhad, A. Influence of phenological stages and method of distillation on Iranian cultivated Bay leaves volatile oil. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* **2007**, *10*, 2895–9.
129. Cherrat, L.; Espina, L.; Bakkali, M.; García-Gonzalo, D.; Pagán, R.; Laglaoui, A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation: Antimicrobial and antioxidant activity of *L. nobilis* and *M. communis* EOs. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 1197–1204.
130. Furtado, R.; Baptista, J.; Lima, E.; Paiva, L.; Barroso, J.G.; Rosa, J.S.; Oliveira, L. Chemical composition and biological activities of *Laurus* essential oils from different Macaronesian Islands. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *55*, 333–341.
131. Snuossi, M.; Trabelsi, N.; Ben Taleb, S.; Dehmeni, A.; Flamini, G.; De Feo, V. *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* Essential Oils: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Bacteria Isolated from Fish and Shellfish. *Molecules* **2016**, *21*, 1414.

132. Chahal, K.; Kaur, M.; Bhardwaj, U.; Singla, N.; Kaur, A. A review on chemistry and biological activities of *Laurus nobilis* L. essential oil. **2017**, *6*, 9.
133. Chmit, M.; Kanaan, H.; Habib, J.; Abbass, M.; Mcheik, A.; Chokr, A. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7*, S546–S552.
134. Derwich, E.; Benziane, Z.; Boukir, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. **2009**, *7*.
135. Merghni, A.; Marzouki, H.; Hentati, H.; Aouni, M.; Mastouri, M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Curr. Res. Transl. Med.* **2016**, *64*, 29–34.
136. Vilela, J.; Martins, D.; Monteiro-Silva, F.; González-Aguilar, G.; de Almeida, J.M.M.M.; Saraiva, C. Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinallis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. *Food Packag. Shelf Life* **2016**, *8*, 71–80.
137. Speroni, E.; Cervellati, R.; Dall’Acqua, S.; Guerra, M.C.; Greco, E.; Govoni, P.; Innocenti, G. Gastroprotective Effect and Antioxidant Properties of Different *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 499–504.
138. Nayak, S.; Nalabothu, P.; Sandiford, S.; Bhogadi, V.; Adogwa, A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica*. L. and *Laurus nobilis*. L. extracts on rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, *6*.
139. Khan, A.; Zaman, G.; Anderson, R.A. Bay Leaves Improve Glucose and Lipid Profile of People with Type 2 Diabetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2009**, *44*, 52–56.
140. Dias, M.I.; Barreira, J.C.M.; Calhelha, R.C.; Queiroz, M.-J.R.P.; Oliveira, M.B.P.P.; Soković, M.; Ferreira, I.C.F.R. Two-Dimensional PCA Highlights the Differentiated Antitumor and Antimicrobial Activity of Methanolic and Aqueous Extracts of *Laurus nobilis* L. from Different Origins. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–10.

141. Shibata, M.; Ohkubo, T.; Tsuruda, K.; Takahashi, H. Mode of analgesic action of phenolic dental medicaments through substance P release. *Jpn. J. Oral Biol.* **1994**, *36*, 49–59.
142. Hakk, M. Chemical composition and content of essential oil. 5.
143. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoilova, I.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Schmidt, E. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6303–6307.
144. Julianus Sohilit, H. Chemical Composition of the Essential Oils in <i>Eugenia caryophyllata</i>, Thunb from Amboina Island. *Sci. J. Chem.* **2015**, *3*, 95.
145. Gülçin, İ. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 975–985.
146. Gülçin, İ.; Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* **2012**, *5*, 489–499.
147. Mueller, L.; Boehm, V. Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. *Molecules* **2011**, *16*, 1055–1069.
148. Brochot, A.; Guilbot, A.; Haddioui, L.; Roques, C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. 6.
149. Radünz, M.; da Trindade, M.L.M.; Camargo, T.M.; Radünz, A.L.; Borges, C.D.; Gandra, E.A.; Helbig, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chem.* **2019**, *276*, 180–186.
150. Ghedira, K.; Goetz, P.; Le Jeune, R. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytotherapie* **2010**, *8*, 37–43.
151. Tanko, Y.; Mohammed, A.; Okasha, M.; Umah, A.; Magaji, R. Anti-Nociceptive And Anti-Inflammatory Activities Of Ethanol Extract Of *Syzygium aromaticum* Flower Bud In Wistar Rats And Mice. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2008**, *5*.

152. Adams, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. *Carol Stream* **2005**, 16, 65–120.
153. Gulluce, M.; Aslan, A.; Sokmen, M.; Sahin, F.; Adiguzel, A.; Agar, G.; Sokmen, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nyländeriana*. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2006**, 13, 515–521.
154. Jehl, F.; Twizeyimana, E. *Sensibilité des bactéries aux antibiotiques: les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme*; 2015; Vol. 2015;.
155. Marcel, J.P. L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques* **2005**, 7, 53–58.
156. Hayes, A.J.; Markovic, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2002**, 40, 535–543.
157. Ginocchio, C.C. Role of NCCLS in antimicrobial susceptibility testing and monitoring. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* **2002**, 59, S7-11.
158. Bouhdid, S.; Abrini, J.; Zhiri, A.; Espuny, M.J.; Manresa, A. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, 106, 1558–1568.
159. Bougandoura, N.; Bendimerad, N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. . *B* **2013**, 6.
160. Boulanouar, B.; Abdelaziz, G.; Aazza, S.; Gago, C.; Miguel, M.G. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod.* **2013**, 46, 85–96.
161. Amezouar, F.; Badri, W.; Mohammed, H.; Bourhim, N.; H, F. *Évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de Erica arborea L. du Maroc*; 2013; Vol. 61;.

162. Musci, M.; Yao, S. Optimization and validation of Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2017**, *68*, 913–918.
163. Matic, P.; Sabljic, M.; Jakobek, L. *Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content.*; United States, 2017; Vol. 100;.
164. Tawk, M. ; Salloum, S. ; Tayyara, L. bacterial resistance to antibiotics and associated factors in two hospital centers in lebanon from january 2017 to june 2017. *Infect. Prev. Pract.* **2020**, 100043.
165. Jayashree, M.; Singhi, S.; Ray, P.; Gautam, V.; Ratol, S.; Bharti, S. Longitudinal comparative trial of antibiotic cycling and mixing on emergence of gram negative bacterial resistance in a pediatric medical intensive care unit. *J. Crit. Care* **2020**, *56*, 243–248.
166. Boovaragamoorthy, G.M.; Anbazhagan, M.; Piruthiviraj, P.; Pugazhendhi, A.; Kumar, S.S.; Al-Dhabi, N.A.; Mohammed Ghilan, A.-K.; Arasu, M.V.; Kaliannan, T. Clinically important microbial diversity and its antibiotic resistance pattern towards various drugs. *J. Infect. Public Health* **2019**, *12*, 783–788.
167. Sawa, T.; Kooguchi, K.; Moriyama, K. Molecular diversity of extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J. Intensive Care* **2020**, *8*, 13.
168. Zhang, Y.-J.; Gan, R.-Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Li, A.-N.; Xu, D.-P.; Li, H.-B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules* **2015**, *20*, 21138–21156.
169. Manilal, A.; Sabu, K.R.; Shewangizaw, M.; Aklilu, A.; Seid, M.; Merdekios, B.; Tsegaye, B. In vitro antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. *Heliyon* **2020**, *6*, e03303.

170. Guadie, A.; Dakone, D.; Unbushe, D.; Wang, A.; Xia, S. Antibacterial activity of selected medicinal plants used by traditional healers in Genta Meyche (Southern Ethiopia) for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Herb. Med.* **2020**, 100338.
171. Peris, I.; Blázquez, M.A. Comparative GC-MS Analysis of Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) Essential Oils in Commercial Samples. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 757–762.
172. El Kamari, F.; Tarog, A.; Atki, Y.E.; Aouam, I.; Lyoussi, B.; Abdellaoui, A. Chemical composition of essential oils from vitex agnus-castus l. growing in Morocco and its in vitro antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2018**, *11*, 365.
173. Aouam, I.; El Atki, Y.; Tarog, A.; El Kamari, F.; Abdellaoui, A. chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of two Moroccan thymus essential oils. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2019**, *12*, 447.
174. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Nasr, S.B.; El-Beyrouthy, M.; Mnif, W. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Laurus nobilis*. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2018**, *31*, 2397–2402.
175. Cortés-Rojas, D.F. ; de Souza, C.R.F. ; Oliveira, W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, 90–96.
176. Lim, T.K. *Syzygium aromaticum*. In *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2014; pp. 460–482 ISBN 978-94-017-8747-5.
177. Pilar Santamarina, M.; Roselló, J.; Giménez, S.; Amparo Blázquez, M. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 325–332.
178. Srivastava, A.K.; Srivastava, S.K.; Syamsundar, K.V. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 51–53.
179. Fernández, N.J.; Damiani, N.; Podaza, E.A.; Martucci, J.F.; Fasce, D.; Quiroz, F.; Meretta, P.E.; Quintana, S.; Eguaras, M.J.; Gende, L.B. *Laurus nobilis* L. Extracts against

Paenibacillus larvae : Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**.

180. Yang, X.; Sun, Z.; Wang, W.; Zhou, Q.; Shi, G.; Wei, F.; Jiang, G. Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Sci. Total Environ.* **2018**, *643*, 559–568.

181. Viskupicova, J.; Danihelova, M.; Ondrejovic, M.; Liptaj, T.; Sturdik, E. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chem.* **2010**, *123*, 45–50.

182. Topuz, F.; Uyar, T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. *Food Res. Int.* **2020**, *130*, 108927.

183. Ramonatxo, C. *Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires*; 2006; Vol. 20;.

184. Dugas, A.J.J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H.; Winston, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 327–331.

185. Palanichamy, P.; Krishnamoorthy, G.; Kannan, S.; Marudhamuthu, M. Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* **2018**, *5*, 303–312.

186. Bouyahya, A.; Belmehdi, O.; Benjouad, A.; Hassani, R.A.E.; Amzazi, S.; Dakka, N.; Bakri, Y. Pharmacological properties and mechanism insights of Moroccan anticancer medicinal plants: What are the next steps? *Ind. Crops Prod.* **2020**, *147*, 112198.

187. Kumar, P.; Shaunak, I.; Verma, M.L. Chapter 6 - Biotechnological application of health promising bioactive molecules. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*; Verma, M.L., Chandel, A.K., Eds.; Elsevier, 2020; pp. 165–189 ISBN 978-0-444-64323-0.

188. Hong, T.; Perumalsamy, H.; Jang, K.; Na, E.; Ahn, Y.-J. Ovicidal and larvicidal activity and possible mode of action of phenylpropanoids and ketone identified in *Syzygium aromaticum* bud against *Bradysia procera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *145*, 29–38.

189. Issac, A.; Gopakumar, G.; Kuttan, R.; Maliakel, B.; Krishnakumar, I.M. Safety and anti-ulcerogenic activity of a novel polyphenol-rich extract of clove buds (*Syzygium aromaticum* L). *Food Funct.* **2015**, *6*, 842–852.
190. Bakour, M.; Soulo, N.; Hammas, N.; Fatemi, H.; Aboulghazi, A.; Taroq, A.; Abdellaoui, A.; Al-Waili, N.; Lyoussi, B. The Antioxidant Content and Protective Effect of Argan Oil and *Syzygium aromaticum* Essential Oil in Hydrogen Peroxide-Induced Biochemical and Histological Changes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 610.
191. Pokorny, J.; Schmidt, S. *Antioxidants in Food: Practical Applications*; 2001;
192. Ouibrahim, A.; Kaki, Y.T.-A.; Bennadja, S.; Mansouri, R.; Kaki, A.; Khbizi, S. Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. provenant de la région d'El Kala (Nord–Est Algérien). **2015**, *9*.
193. Do, Q.D.; Angkawijaya, A.E.; Tran-Nguyen, P.L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F.E.; Ismadji, S.; Ju, Y.-H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 296–302.
194. Muñoz-Márquez, D.B.; Martínez-Ávila, G.C.; Wong-Paz, J.E.; Belmares-Cerda, R.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar, C.N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 1149–1154.
195. Dall'Acqua, S.; Cervellati, R.; Speroni, E.; Costa, S.; Guerra, M.C.; Stella, L.; Greco, E.; Innocenti, G. Phytochemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. leaf infusion. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 869–876.
196. Abdillah, S.; Tambunan, R.M.; Farida, Y.; Sandhiutami, N.M.D.; Dewi, R.M. Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2015**, *5*, 454–457.
197. El Atki, Y.; Aouam, I.; El Kamari, F.; Taroq, A.; Lyoussi, B.; Oumokhtar, B.; Abdellaoui, A. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan

Teucrium polium L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arab. J. Chem.* **2019**, S1878535219300309.

198. Begum, S.; Sara, S.; Ameen, A.; Tauseef, S.; Tahir Ali, S.; Siddiqui, B.; Ahmad, A. Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract, fractions and pure compounds of *Syzygium aromaticum*. *World J. Pharm. Sci.* **2016**, *4*, 24–27.

199. Dua, A.; Singh, A.; Mahajan, R. Antioxidants of clove (*Syzygium aromaticum*) prevent metal induced oxidative damage of biomolecules. *Int. Res. J. Pharm.* **2015**, *6*, 273–278.

200. Hartanti, L.; Yonas, S.M.K.; Mustamu, J.J.; Wijaya, S.; Setiawan, H.K.; Soegianto, L. Influence of extraction methods of bay leaves (*Syzygium polyanthum*) on antioxidant and HMG-CoA Reductase inhibitory activity. *Heliyon* **2019**, *5*, e01485.

201. Boy, H.I.A.; Rutilla, A.J.H.; Santos, K.A.; Ty, A.M.T.; Alicia, I.Y.; Mahboob, T.; Tangpoong, J.; Nissapatorn, V. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. *Digit. Chin. Med.* **2018**, *1*, 131–142.

202. Lachance, P.; Bagshaw, S.M. Loop and Thiazide Diuretics. In *Critical Care Nephrology*; Elsevier, 2019; pp. 358–364.

203. El Menyiy, N.; Al-Waili, N.; El-Haskoury, R.; Bakour, M.; Zizi, S.; Al-Waili, T.; Lyoussi, B. Potential effect of *Silybum marianum* L. and *Cistus ladaniferus* L. extracts on urine volume, creatinine clearance and renal function. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2018**, *11*, 393.

204. *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*; Vogel, H.G., Ed.; 2nd completely rev., updated, and enl. ed.; Springer: Berlin ; New York, 2002; ISBN 978-3-540-42396-6.

205. Sica, D.A.; Carter, B.; Cushman, W.; Hamm, L. Thiazide and loop diuretics. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **2011**, *13*, 639–643.

206. Dias, M.I.; Morales, P.; Barreira, J.C.M.; Oliveira, M.B.P.P.; Sánchez-Mata, M.C.; Ferreira, I.C.F.R. Minerals and vitamin B9 in dried plants vs. infusions: Assessing

absorption dynamics of minerals by membrane dialysis tandem in vitro digestion. *Food Biosci.* **2016**, *13*, 9–14.

207. Özcan, M.M.; Akbulut, M. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. *Food Chem.* **2008**, *106*, 852–858.

208. Adefegha, S.A.; Oboh, G.; Oyeleye, S.I.; Osunmo, K. Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. *Food Sci. Nutr.* **2015**, *4*, 250–260.

209. Nassar, M.I. Flavonoid triglycosides from the seeds of *Syzygium aromaticum*. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 160–163.

210. Mariano, L.N.B.; Boeing, T.; da Silva, R. de C.M.V. de A.F.; Cechinel-Filho, V.; Niero, R.; da Silva, L.M.; de Souza, P.; Andrade, S.F. de Preclinical evaluation of the diuretic and saluretic effects of (-)-epicatechin and the result of its combination with standard diuretics. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2018**, *107*, 520–525.

211. Gasparotto Junior, A.; Gasparotto, F.M.; Boffo, M.A.; Lourenco, E.L.B.; Stefanello, M.E.A.; Salvador, M.J.; da Silva-Santos, J.E.; Marques, M.C.A.; Kassuya, C.A.L. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-an active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 210–215.

212. Korovila, I.; Hugo, M.; Castro, J.P.; Weber, D.; Höhn, A.; Grune, T.; Jung, T. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 550–567.

213. Kleniewska, P.; Pawliczak, R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2017**, *94*, 100–108.

214. Scicchitano, B.M.; Pelosi, L.; Sica, G.; Musaro, A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *170*, 37–44.

215. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 55–74.
216. Jagadeesan, G.; Bharathi, E. In vivo restoration of hepatic and nephro protective potential of hesperidin and ellagic acid against mercuric chloride intoxicated rats. *Biomed. Aging Pathol.* **2014**, *4*, 219–222.
217. Bakour, M.; Al-Waili, N.S.; El Menyiy, N.; Imtara, H.; Figuira, A.C.; Al-Waili, T.; Lyoussi, B. Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 4205–4212.
218. Abozid, M. Antioxidant And Protective Effect Of Clove Extracts And Clove Essential Oil On Hydrogen Peroxide Treated Rats. *Int. J. ChemTech Res.* **2013**, *5*, 1477.
219. Olayinka, E.T.; Ore, A.; Ola, O.S.; Adeyemo, O.A. Protective Effect of Quercetin on Melphalan-Induced Oxidative Stress and Impaired Renal and Hepatic Functions in Rat. *Chemother. Res. Pract.* **2014**, *2014*, 1–8.
220. Saague, P.W.K.; Moukette Moukette, B.; Njimou, J.R.; Biapa, P.C.N.; Nzufu Tankeu, F.; Moor, V.J.A.; Pieme, C.A.; Ngogang, J.Y. Phenolic Compounds from Water-Ethanol Extracts of *Tetrapleura tetraptera* Produced in Cameroon, as Potential Protectors against *In Vivo* CC 14 -Induced Liver Injuries. *Sci. World J.* **2019**, *2019*, 1–10.
221. Ganie, S.A.; Haq, E.; Hamid, A.; Masood, A.; Zargar, M.A. Long dose exposure of hydrogen peroxide (H₂O₂) in albino rats and effect of Podophyllum hexandrum on oxidative stress. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2011**, *15*, 906–915.
222. Javid, A.Z.; Haybar, H.; Dehghan, P.; Haghizadeh, M.H.; Mohaghegh, S.M.; Ravanbakhsh, M.; Mohammadzadeh, A. The effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) in chronic stable angina on serum biomarkers of oxidative stress, inflammation and lipid profile. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 785–791.
223. Kabamba, A.T.; Bakari, S.A.; Longanga, A.O.; Lukumwena, Z.K. Baisse du HDL-cholestérol indicateur du stress oxydatif dans le diabète de type 2. *Pan Afr. Med. J.* **2014**, *19*.

224. Awadallah, S.M.; Atoum, M.F.; Nimer, N.A.; Saleh, S.A. Ischemia modified albumin: An oxidative stress marker in β -thalassemia major. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 907–910.
225. Thapa, B.R.; Walia, A. Liver Function Tests and their Interpretation. *Indian J. Pediatr.* **2007**, *74*, 9.
226. Nita, M.; Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 3164734.
227. Yakubu, N.; Oboh, G.; Olalekan, A.A. Antioxidant and Hepatoprotective Properties of Tofu (*Curdle Soymilk*) against Acetaminophen-Induced Liver Damage in Rats. *Biotechnol. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–7.
228. Dhibi, S.; Mbarki, S.; Elfek, A.; Hfaiedh, N. Eucalyptus globulus extract protects upon acetaminophen-induced kidney damages in male rat. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2014**, *14*, 99.

Annexe

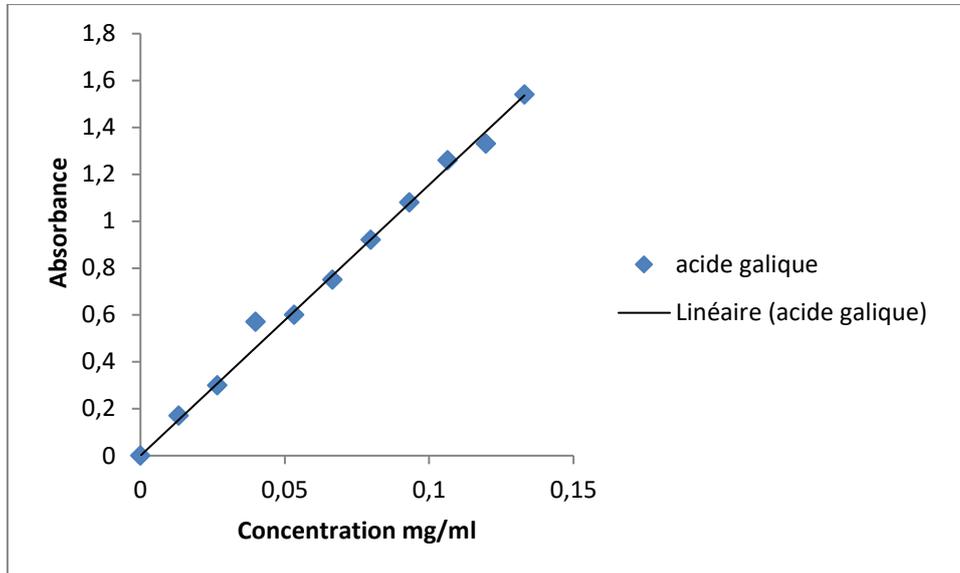


Figure 38 : Gamme d'étalonnage d'acide galique

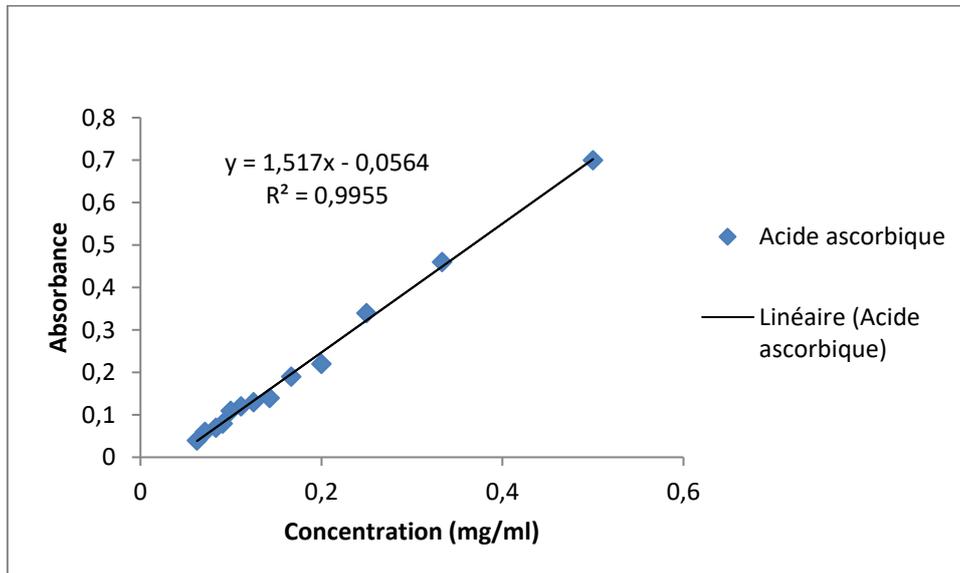


Figure 39 : Gamme d'étalonnage d'acide ascorbique

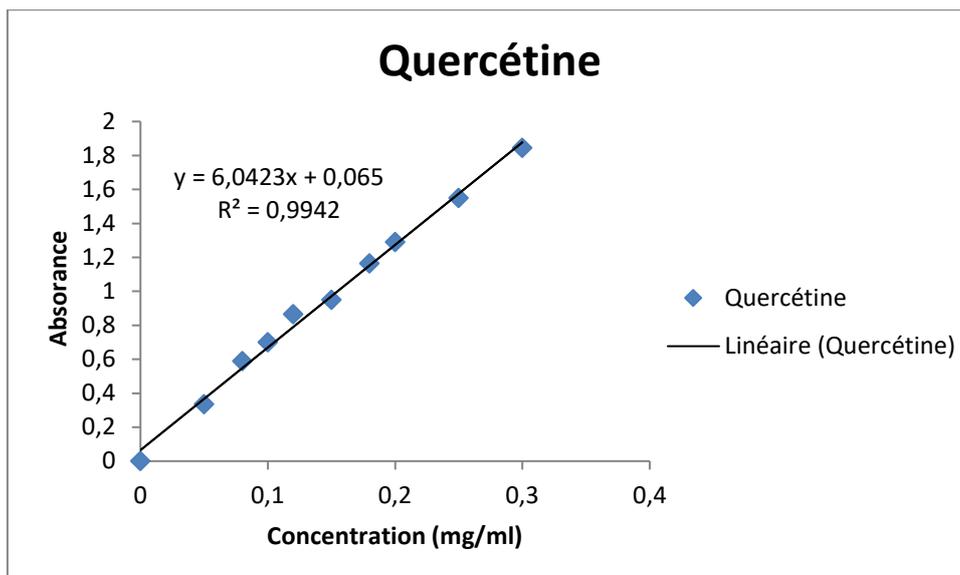


Figure 40 : Gamme d'étalonnage de la Quercétine pour dosage des flavones et flavonols

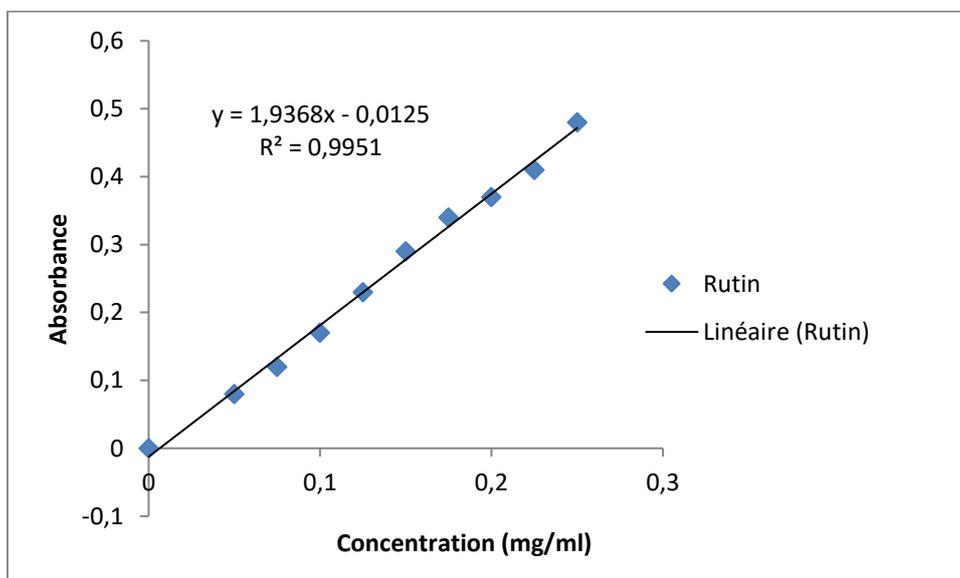


Figure 41 : Gamme d'étalonnage du Rutin pour dosage des flavonoïdes totaux