

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem



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

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences alimentaires
Option : Nutrition et Santé

Présentée par :
Mr. BOUZIANE Nabil

Intitulé :

Propriétés biologiques du Chitosane associé ou non aux composés phénoliques

Soutenue le/...../2024

Devant le jury :

Présidente :	Prof. Ziar Hasnia	Univ. Mostaganem
Directeur de thèse :	Prof. Riazi Ali	Univ. Mostaganem
Co-directrice de thèse :	Dr Sadoud Merien (MCA)	Univ. Chlef
Examineurs :	- Dr Yahla Imene (MCA)	Univ. Mostaganem
	- Pr Boualga Ahmed	Univ. Oran 1
	- Dr Moussaoui Badreddine (MCA)	Univ. Tissemsilt

Année universitaire: 2023/2024

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le Pr Ali Riazi.

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, **Mr. RIAZI Ali**, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, initiée à la recherche et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail.

Mme Sadoud Meryem, Maitre de conférence de classe A à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef, a assuré le co-encadrement de cette thèse, je lui exprime toute ma reconnaissance pour tout ce qu'elle a fait avec rigueur pour l'aboutissement de ce travail.

Mes respectueux remerciements sont adressés aux membres de mon jury :

- **Mme ZIAR Hasnia**, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, pour avoir bien voulu présider le jury de ma thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.
- **Mme Yahla Imene**, Maitre de conférences de classe A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'y apporter ses critiques.
- **Mr Boualga Ahmed**, Professeur à l'université Ahmed Benbela Oran 1, a aimablement accepté de prendre part à ce jury. Je le remercie pour son honorable participation à l'examen de cette thèse.
- **Mr Moussaoui Badreddine**, Maitre de conférences de classe A à l'université de Tissemsilt pour m'avoir honoré de sa présence à cette soutenance en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier également mon ami et collègue le **Dr. Benguendouz Abdenour**, pour son soutien, sa présence et son aide à la mise en forme du manuscrit.

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés au **Dr Hamed Djahira** et **Dr Bentaiba Karima** pour leur précieuse aide pratique.

Un grand merci à tous **mes Etudiants** que j'ai encadré sur cette thématique et qui ont largement contribué à l'avancement des manipulations. Je les remercie pour leur dévouement et pour le respect qu'ils m'ont témoigné.

Je salue chaleureusement mes collègues enseignants des départements de Biologie et des Sciences Alimentaires pour leurs encouragements ainsi que toute l'équipe du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS).

Un grand merci pour mes amis d'enfance, messieurs Amara Nabil et Khelifi Mohamed, pour leur encouragement continu et leur présence à mes cotés durant toute la période de réalisation de ce travail.

Enfin merci à tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de recherche.

Mostaganem, Mai 2024

Nabil Bouziane

Dédicace

Mes chers parents, c'est à vous que je dédie ce modeste travail qui a façonné la personne que je suis aujourd'hui. Malgré mes responsabilités familiales, votre soutien constant a été d'une valeur inestimable pour finaliser cette thèse. Je vous suis profondément reconnaissant pour cela. Je veux aussi vous remercier chaleureusement pour votre affection, présence, soutien et encouragements tout au long de mes études.

Que Dieu les préserve en bonne santé et leur accorde longue vie

« Merci ma mère, Merci mon père »

Â ma sœur, Â mes chers frères

Karima, Mohamed, Rachid, Djamel et Ali

Mercie pour vos encouragements et votre présence à mes cotés

Â mon épouse Souhila

Â mes fils Younes, Mostepha, Djamel, Karima et Adam

Je remercie Dieu de vous avoir dans ma vie !!!

Mostaganem, Mai 2024

Nabil Bouziane

Abstract

Natural compounds are often endowed with biological properties of health, food and pharmacological interest. Chitosan from crustacean shells and polyphenols from artichoke heart, *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (*C. scolymus*), are examples of natural compounds that are preferable to chemical substances as food preservatives. The current study investigates the antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp shell waste, both alone and combined with polyphenols of *C. scolymus*. Shrimp shells were washed, dried, ground, and the issued flour was demineralized and deproteinised to prepare chitin. Chitosan was obtained by deacetylation of chitin and then analyzed on the basis of its moisture, ash, protein, molecular weight and degree of deacetylation. The polyphenols of *C. scolymus* were extracted using water and methanol as solvents. Total phenolic and flavonoid contents of *C. scolymus* were determined using spectrophotometry. DPPH and β -carotene bleaching tests were used to assess the antioxidant activity of chitosan and *C. scolymus* extracts. The antibacterial activity of chitosan and *C. scolymus* extracts against five pathogenic strains and two beneficial strains was determined. Results have shown that chitosan extraction yield was about $5.80 \pm 1.09\%$, and it contains 4.43 ± 0.57 , 1.32 ± 0.62 and $0.18 \pm 0.04\%$ of moisture, ash and protein, respectively. Its molecular weight and its degree of deacetylation were about 859.48 ± 21.62 KDa and 75%, respectively. The combination of chitosan and *C. scolymus* extracts was more effective on DPPH radical scavenging capacity and β -carotene degradation prevention ($P < 0.05$) than those of chitosan or *C. scolymus* extracts used separately. Furthermore, this combination significantly inhibits the growth of the five pathogenic bacteria. This suggests that chitosan, in association with *C. scolymus* polyphenols might be used to prevent food spoilage. Concerning the study on the anti-inflammatory activity of artichoke extract, chitosan, and their combination "in vivo" and "in vitro" revealed that the artichoke extract/chitosan combination has an effect similar to diclofenac, which may be explained by the union of two natural products with remarkable anti-inflammatory properties that could substitute industrial anti-inflammatories. Regarding the study conducted on carob "*C. siliqua*", it recorded levels of 24.12 mg GAE/g and 38.23 mg GAE/g for methanolic extract and aqueous extract, respectively ($P < 0.05$). Additionally, the DPPH radical inhibition capacity was established in the following order: Chitosan alone ($IC_{50} = 1.728$ mg/mL) > chitosan + Methanolic extract ($IC_{50} = 3.008$ mg/mL) > chitosan + Aqueous extract ($IC_{50} = 3.895$ mg/mL) > Methanolic extract ($IC_{50} = 5.248$ mg/mL) > Aqueous extract ($IC_{50} = 6.625$ mg/mL). Finally, the antibacterial effect of chitosan, carob extract, and their combination, it was observed that inhibition of different pathogenic bacteria by carob extract (methanolic and aqueous), chitosan, and their combination (extract/chitosan) was observed at different levels ($P < 0.05$). Chitosan proved to be more active in inhibiting "Staphylococcus aureus" strains, followed by the chitosan/methanolic carob extract combination on the same strain (*S. aureus*), chitosan alone on "Listeria monocytogenes" and "Salmonella Typhimurium," and the aqueous carob extract on "Escherichia coli" with inhibition diameters of 32.5mm, 18.5mm, 32.5mm, 29.5mm, and 14.5mm, respectively ($P < 0.05$).

Key words: Shrimp shell, chitosan, artichoke heart, carob, polyphenols, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory.

Résumé

Les composés naturels sont souvent dotés de propriétés biologiques d'intérêt sanitaire, alimentaire et pharmalogique. Le chitosane extrait des coquilles de crustacés et les polyphénols du cœur d'artichaut, *Cynara cardunculus var. scolymus* (*C. scolymus*), sont des exemples de composés naturels qui sont préférables par rapport aux substances chimiques comme les conservateurs alimentaires. La présente étude met en exergue les propriétés antioxydantes et antibactériennes du chitosane extrait des déchets de coquilles de crevettes, à la fois seul et combiné avec des polyphénols de *C. scolymus*. Les coquilles de crevettes ont été lavées, séchées, broyées et la farine obtenue a été déminéralisée et déprotéinisée pour préparer de la chitine. Le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine puis analysé afin de déterminer son humidité, ses cendres, ses protéines, son poids moléculaire et son degré de désacétylation. Les polyphénols de *C. scolymus* ont été extraits en utilisant de l'eau et du méthanol comme solvants. Les teneurs totales en composés phénoliques et flavonoïdes de *C. scolymus* ont été déterminées par spectrophotométrie. Des tests de blanchiment à la DPPH et au β -carotène ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de chitosane et de *C. scolymus*. L'activité antibactérienne des extraits de chitosane et de *C. scolymus* sur cinq souches de bactéries pathogènes et deux souches bénéfiques a été déterminée. Les résultats ont montré que le rendement d'extraction du chitosane était d'environ $5,80 \pm 1,09\%$ et qu'il contient respectivement $4,43 \pm 0,57$, $1,32 \pm 0,62$ et $0,18 \pm 0,04\%$ d'humidité, de cendres et de protéines. Son poids moléculaire et son degré de désacétylation étaient respectivement d'environ $859,48 \pm 21,62$ KDa et 75% . La combinaison de chitosane avec les extraits de *C. scolymus* étaient plus efficaces sur la capacité de piégeage des radicaux DPPH et la prévention de la dégradation du β -carotène ($P < 0,05$) que ceux des extraits de chitosane ou de *C. scolymus* utilisés séparément. De plus, cette combinaison inhibe de manière significative la croissance des cinq bactéries pathogènes. Cela suggère que le chitosane, en association avec les polyphénols de *C. scolymus*, pourrait être utilisé pour prévenir la détérioration des aliments. Concernant l'étude sur l'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'artichaut, le chitosane, et leur association "in vivo" et "in vitro" a révélé que l'association de l'extrait d'artichaut/chitosane a un effet identique à celui du declofénac, cela peut être expliquer par l'union de deux produits naturels ayant un pouvoir anti-inflammatoire remarquable et qui pourrait substituer les anti-inflammatoires industriels.

En ce qui concerne l'étude menée sur la caroube, il a enregistré des teneurs de 24.12 mg EAG/g et 38.23 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, respectivement ($P < 0,05$). En outre, la capacité d'inhibition du radical DPPH était établie dans l'ordre suivant : Chitosane seul ($IC_{50} = 1,728$ mg/mL) > chitosane + Extrait methanolique ($IC_{50} = 3,008$ mg/mL) > chitosane + extrait aqueux ($IC_{50} = 3,895$ mg/mL) > Extrait méthanolique ($IC_{50} = 5,248$ mg/mL) > extrait aqueux ($IC_{50} = 6,625$ mg/mL). Il a été constaté que la capacité d'inhibition du radical DPPH était établie dans l'ordre suivant : Chitosane seul ($IC_{50} = 1,728$ mg/mL) > chitosane + Extrait methanolique ($IC_{50} = 3,008$ mg/mL) > chitosane + extrait aqueux ($IC_{50} = 3,895$ mg/mL) > Extrait méthanolique ($IC_{50} = 5,248$ mg/mL) > extrait aqueux ($IC_{50} = 6,625$ mg/mL). Enfin, l'effet antibactérien du chitosane, de l'extrait de caroube et de leur association, a laissé observé que l'inhibition des différentes bactéries pathogènes par l'extrait de caroube (méthanolique et aqueux), le chitosane et leur association (extrait/chitosane) a été enregistrée à différents niveaux ($P < 0.05$). Le chitosane s'est avéré être plus actif dans l'inhibition de la souches « *Staphylococcus aureus* »,

suivi de l'association chitosane/extrait méthanolique de caroube sur la même souche (*S. aureus*), le chitosane seul sur « *Listeria monocytogène* » et sur « *Salmonella Typhimurium* » et l'extrait aqueux de caroube sur « *Escherichia Coli* » avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de 32.5mm, 18.5mm, 32.5mm, 29.5mm et 14.5mm, respectivement ($P < 0.05$).

Mots clefs : Carapace de crevette, chitosane, cœur d'artichaut, caroube, polyphéols, antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire.

ملخص

المركبات الطبيعية غالبًا ما تكون مزودة بخصائص بيولوجية ذات اهتمام صحي وغذائي وصيدلاني. الكيتوزان المستخرج من قشور القشريات والبوليفينولات المستخرجة من قلب الخرشوف، (*C. scolymus*) هما مثالان على المركبات الطبيعية التي تُفضل على المواد الكيميائية كمضافات غذائية. تبحث الدراسة الحالية في الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للشيتوزان المستخرج من نفايات قشور الجمبري، سواء بمفرده أو عند دمجها مع بوليفينولات *C. scolymus*. تم غسل قشور الجمبري وتجفيفها وطحنها، وتم استخراج الدقيق منها وإزالة المعادن والبروتينات لتحضير الكيتين. تم الحصول على الكيتوزان عن طريق إزالة الأسيتيل من الكيتين، ثم تم تحليله بناءً على محتواه من الرطوبة والرماد والبروتين والوزن الجزيئي ودرجة إزالة الأسيتيل. تم استخراج بوليفينولات *C. scolymus* باستخدام الماء والميثانول كمذيبات. تم تحديد إجمالي محتويات الفينول والفلافونويد في *C. scolymus* باستخدام التحليل الطيفي.

تم استخدام اختبارات DPPH وتبييض بيتا كاروتين لتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الشيتوزان و *C. scolymus*. كما تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الكيتوزان و *C. scolymus* ضد خمسة سلالات ممرضة وسلالتين مفيدتين. أظهرت النتائج أن مردود استخراج الكيتوزان كان حوالي $5.80 \pm 1.09\%$ ، ويحتوي على $4.43 \pm 0.57\%$ رطوبة، $1.32 \pm 0.62\%$ رماد، و $0.18 \pm 0.04\%$ بروتين. كان وزنه الجزيئي ودرجة إزالة الأسيتيل حوالي 859.48 ± 21.62 كيلو دالتون و 75% على التوالي. كان الجمع بين مستخلصات الشيتوزان و *C. scolymus* أكثر فعالية في القدرة على التخلص من الجذور الحرة DPPH ومنع تدهور بيتا كاروتين ($P < 0.05$) مقارنة باستخدام مستخلصات الكيتوزان أو *C. scolymus* بشكل منفصل. علاوة على ذلك، يثبط هذا المزيج بشكل كبير نمو البكتيريا الممرضة الخمسة. يشير ذلك إلى أن الكيتوزان، عند اتحاده مع بوليفينولات *C. scolymus*، قد يُستخدم لمنع تلف الطعام. أما بالنسبة للدراسة حول النشاط المضاد للالتهابات لمستخلص الخرشوف والكيتوزان ومزيجهما "في الجسم الحي" و"في المختبر"، فقد أظهرت أن مزيج مستخلص الخرشوف/الكيتوزان له تأثير مشابه للديكلوفيناك، وهو ما يمكن تفسيره بالاتحاد بين منتجين طبيعيين يتمتعان بخصائص مضادة للالتهابات مميزة يمكن أن تحل محل المضادات الصناعية.

بالنسبة للدراسة التي أجريت على الخروب "*C. siliqua*"، فقد سجلت مستويات 24.12 ملغ/GAE و 38.23 ملغ/GAE للمستخلص الميثانولي والمستخلص المائي على التوالي ($P < 0.05$). بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد قدرة تثبيط الجذور الحرة DPPH بالترتيب التالي: الكيتوزان وحده ($IC_{50} = 1.728$ ملغ/مل) < الكيتوزان + المستخلص الميثانولي ($IC_{50} = 3.008$ ملغ/مل) < الكيتوزان + المستخلص المائي ($IC_{50} = 3.895$ ملغ/مل) < المستخلص الميثانولي ($IC_{50} = 5.248$ ملغ/مل) < المستخلص المائي ($IC_{50} = 6.625$ ملغ/مل). وأخيراً، في ما يخص التأثير المضاد للبكتيريا للكيتوزان، ومستخلص الخروب، ومزيجهما، لوحظ أن تثبيط البكتيريا الممرضة المختلفة بواسطة مستخلص الخروب (الميثانولي والمائي)، والكيتوزان، ومزيجهما (مستخلص/كيتوزان) كان عند مستويات مختلفة ($P < 0.05$). أثبت الكيتوزان أنه أكثر نشاطاً في تثبيط سلالات "*Staphylococcus aureus*"، يليه مزيج الكيتوزان/مستخلص الخروب الميثانولي على نفس السلالة (*S. aureus*)، والكيتوزان وحده على "*Listeria monocytogenes*" و"*Salmonella Typhimurium*"، ومستخلص الخروب المائي على "*Escherichia coli*" بأقطار تثبيط تبلغ 32.5 ملم، 18.5 ملم، 32.5 ملم، و 14.5 ملم على التوالي ($P < 0.05$).

الكلمات المفتاحية: قشور الجمبري، الكيتوزان، قلب الخرشوف، الخروب، البوليفينولات، مضادات الأكسدة، مضادات الميكروبات، مضاد الالتهاب

Liste des abréviations

Le degré d'acétylation	DA
Le degré désacétylation	DDA
Concentration minimale inhibitrice	CMI
Equivalent acide galique	EAG
2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle	DPPH
Matière sèche	MS
Matière grasse	MG

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales applications du chitosane dans le secteur agro-alimentaire (Collin et Crouzet, 2011).

Tableau 2. Composés phénoliques à activité antivirale (Kamboj et al., 2012).

Tableau 3. Composition biochimique de l'artichaut (*C. scolymus*) et de la caroube (*C. siliqua*) en g/100g de farine

Tableau 4. Rendement d'extraction (%) des composés phénoliques à partir du cœur d'artichaut et de pulpe de caroube par l'eau et le méthanol

Tableau 5. Rendements d'extraction du chitosane (%) obtenus après chaque traitement chimique (deminéralisation, déprotéinisation, blanchiment et désacétylation).

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane de carapaces de crevette.

Tableau 7 Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de cœur d'artichaut, le chitosane et de leur association. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 déterminations.

Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de la pulpe de caroube, le chitosane et de leur association. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

Tableau 9. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/mL) des souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de cœur d'artichaut, le chitosane et leur association. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 déterminations.

Tableau 10. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/mL) de souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de pulpe de caroube, le chitosane et leur association.

Tableau 11. Effet anti-hémolytique (en %) de différentes concentrations (500, 250, 125 et 62.5 µg /mL) de diclofenac (standard), de l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association

Tableau 12. Taux d'inhibition de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf par différentes concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5 et 25 µg /mL) d'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut (*C. scolymus*), le chitosane, de et par leur association en comparaison avec celui du diclofenac (standard) à différentes concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5 et 25 µg /ml)

Tableau 13. Taux d'inhibition de l'inflammation (en %) provoquée par la carraghénine dans les différents lots de rats wistar traités par le diclofenac, l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, le chitosane et leur association (extrait/chitosane) durant 6 heures post-injection de carraghénie. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 3 déterminations.

Liste des figures

- Figure 1.** Quelques sources naturelles de chitine et de chitosane (Jardine et Sayed, 2017).
- Figure 2.** Les parts en % du marché mondial de chitosane par région, 2019. (Oyatogun et al., 2020)
- Figure 3.** Structure chimique de la chitine et du chitosane (Brasselet et al, 2019).
- Figure 4.** Chemins réactionnels selon la source conduisant à l'obtention de la chitine et du chitosane (Collin and Crouzet, 2011).
- Figure 5.** Structure d'un noyau phénol (Singla et al., 2019)
- Figure 6.** Principales classes de polyphénols (Singla et al., 2019).
- Figure 7.** Structure chimique de quelques acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Singla et al., 2019).
- Figure 8.** Squelette de base des flavonoïdes (Singla et al., 2019)
- Figure 9.** Structure générale des principales classes de flavonoïdes (Shen et al., 2022)
- Figure 10.** Structure chimique de base des stilbènes (forme trans et cis) (Collin and Crouzet, 2011).
- Figure 11.** Structure chimique de base des lignanes (Lamblin et al., 2008).
- Figure 12.** Structure chimique de la coumarine (Hopkins, 2003).
- Figure 13.** Classification des tanins (Brillouet et al., 2013)
- Figure 14.** Deux exemples de tanins hydrolysables (Macheix et al., 2005)
- Figure 15.** Structure chimique des proanthocyanidols dimériques de type B (Tong et al., 2002).

Figure 16. Formation du radical aryloxy suite à l'oxydation du phénol (A) et stabilisation de ce radical par ses formes mésomères (B) (Cai et al., 2004).

Figure 17. Quelques composés phénoliques issus des voies générales de phénylpropanoïdes et de shikimate (Gravot, 2009, Goulas, 2019)

Figure 18. Voie de l'acide malonique responsable de la synthèse de quelques métabolites secondaires (Zagoskina et al., 2023).

Figure 19. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) et en flavonoïdes (mg EQ/g) des extraits phénoliques méthanolique et aqueux de cœur d'artichaut (*C. scolymus*). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

Figure 20. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) et en flavonoïdes (mg EQ/g) des extraits méthanolique et aqueux de la pulpe de caroube (*C. siliqua*).

Figure 21. Aspect du chitosane extrait des carapaces de crevettes

Figure 22. Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH (IC50 en mg/mL) des extraits phénoliques méthanolique et aqueux de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparées à celle du standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de 3 déterminations (n = 3).

Figure 23. Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH (IC50 en mg/mL) des extraits phénoliques méthanolique et aqueux de la pulpe de caroube, du chitosane et de leur association en comparaison avec un standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de 3 déterminations (n = 3).

Figure 24. Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits phénoliques méthanolique et aqueux de cœur d'artichaut, le chitosane et leur association en comparaison avec l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type de 3 déterminations (n = 3).

Figure 25. Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits phénoliques méthanolique et aqueux de pulpe de caroube, le chitosane et leur association comparé à celui du standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type de 3 déterminations ($n = 3$).

Figure 26. Les concentrations inhibitrices de 50% de l'hémolyse des globules rouges par l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, le chitosane et leur association comparée à celui du diclofenac comme anti-inflammatoire standard. Les concentrations indiquées sont en $\mu\text{g/mL}$.

Figure 27. Effet inhibiteur de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf par l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparé à celui du diclofenac comme anti-inflammatoire standard.

Figure 28. Effet de l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparé à celui du dichlofenac comme anti-inflammatoire standard sur l'épaisseur des oedèmes de pattes des rats Wistar 6h après avoir reçu de la carraghénine 1%.

Sommaire

Avant-propos	
Dédicaces	
Abstract	
Résumé	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Le chitosane	
I.1. Définition et principales caractéristiques	4
I.2. Sources et marchés de production	4
I.3. Structure chimique	6
I.4. Procédés d'extraction du chitosane	8
I.4.1. Procédé d'extraction chimique	8
I.4.1.1. Déminéralisation.....	8
I.4.1.2. Déprotéinisation	9
I.4.1.3. Décoloration ou blanchiment.....	9
I.4.1.4. Déacétylation.....	10
I.4.2. Procédé d'extraction biologique	10
I.4.2.1. Déprotéinisation enzymatique	12
I.4.2.2. Déprotéinisation et déacétylation par fermentation.....	13
I.5. Propriétés physico-chimiques du chitosane	14
I.5.1. Le degré d'acétylation (DA) ou de désacétylation (DDA)	14
I.5.2. Le poids moléculaire	15
I.5.3. La viscosité	15

I.5.4. La solubilité	15
I.5.5. La cristallinité	16
I.6. Propriétés biologiques du chitosane	16
I.6.1. La biodégradabilité.....	17
I.6.2. La biocompatibilité	17
I.6.3. Effet antimicrobien.....	18
I.6.4. Activité antifongique	18
I.6.5. Activité antioxydante.....	19
I.6.6. Activité anti-inflammatoire	20
I.6.7. Activité anti-tumorale.....	20
I.7. Fonctionnalités et principaux débouchés du chitosane	21
I.7.1. Secteur agroalimentaire	21
I.7.2. Secteur pharmaceutique et médical.....	22
I.7.3. Secteur des cosmétiques	22
I.7.4. Secteur de traitement des eaux.....	23

Chapitre II. Les composés phénoliques

II.1. Qu'est-ce que les polyphénols ?	24
II.2. Structure chimique et principales classes de polyphénols	24
II.2.1. Structure chimique	24
II.2.2. Principales classes de polyphénols	25
II.2.2.1. Les acides phénoliques	26
II.2.2.2. Les flavonoïdes	27
II.2.2.3. Les stilbènes.....	30
II.2.2.4. Les lignanes	30
II.2.2.5. Les coumarines.....	32
II.2.2.6. Les tanins	34
II.3. Propriétés physicochimiques des polyphénols	36
II.3.1. La solubilité	36

II.3.2. Le point d'ébullition.....	37
II.3.3. L'acidité.....	37
II.3.4. Le pouvoir réducteur.....	37
II.4. Voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	39
II.4.1. Voie de l'acide shikimique.....	39
II.4.2. Voie de l'acide malonique.....	39
II.5. Activités biologiques des polyphénols.....	40
II.5.1. Activité antioxydante.....	40
II.5.2. Activité antivirale.....	43
II.5.3. Activité anti-inflammatoire.....	43
II.6. Domaines d'application des polyphénols.....	44
II.6.1. L'agroalimentaire.....	44
II.6.2. Le cosmétique.....	45
II.6.3. L'industrie pharmaceutique.....	46

Chapitre III. Matériels et Méthodes

III.1. Matériels.....	47
III.1.1. Matériel végétal.....	47
III.1.1.1. Le cœur d'artichaut.....	47
III.1.1.2. Les gousses de caroube.....	47
III.1.2. Matière animale, souches bactériennes et rats expérimentaux.....	47
III.1.2.1. Carapaces de crevette.....	47
III.1.2.2. Les souches bactériennes.....	48
III.1.2.3. Les rats expérimentaux.....	48
III.2. Méthodes.....	49
III.2.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de coeur d'artichaut et de la pulpe de gousses de caroube.....	49
III.2.1.1. Dosage de la cellulose brute.....	49
III.2.1.2. Détermination de la teneur en cendres.....	49
III.2.1.3. Dosage des protéines.....	50
III.2.1.4. Dosage de la matière grasse.....	51

III.2.1.5. Dosage des glucides	51
III.2.1.6. Détermination de la teneur en eau	52
III.2.2. Méthodes d'extraction et de dosage des composés phénoliques de coeur d'artichaut et de la pulpe de gousse de caroube.....	52
III.2.2.1. Les extractions de polyphénols.....	52
III.2.2.2. Dosage des polyphénols.....	52
III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	53
III.2.3. Extraction et analyse du chitosane	53
III.2.3.1. Préparation de la chitine et obtention du chitosane	53
III.2.3.1.1. Déminéralisation et déprotéinisation de la chitine	54
III.2.3.1.2. Désacétylation de la chitine	54
III.2.3.2. Analyse du chitosane.....	54
III.2.3.2.1 Détermination de la teneur en humidité	54
III.2.3.2.2. Détermination de la teneur en cendres	55
III.2.3.2.3. Détermination de la teneur en protéines	55
III.2.3.2.4. Mesure de la viscosité moyenne et du poids moléculaire.....	55
III.2.3.2.5. Détermination du degré désacétylation	56
III.2.4. Méthodes in vitro d'exploration des propriétés antioxydantes des extraits phénoliques de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.....	56
III.2.4.1. Activité de piégeage des du radical libre DPPH.....	56
III.2.4.2. Test de blanchiment du β -carotène	58
III.2.5. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.....	58
III.2.5.1. Les souches microbiennes utilisées	58
III.2.5.2. Réactivation des souches microbiennes	59
III.2.5.3. Mesure de l'activité antimicrobienne.....	59
III.2.5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	59
III.2.6. Détermination de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut , du chitosane et de leur association	60

III.2.6.1. Activité anti-inflammatoire in Vitro	60
III.2.6.1.1. Activité anti-hémolytique de l'extrait phénolique aqueux.....	60
III.2.6.1.2. Mise en évidence de l'activité protectrice de l'extrait phénolique aqueux vis-à-vis de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf.....	61
III.2.6.2. Activité anti-inflammatoire in Vivo.....	62
III.2.6.2.1. Mise en lots des rats.....	62
III.2.6.2.2. Induction de l'inflammation par la carragénine.et mesure de l'épaisseur de l'inflammation.....	63

Chapitre IV. Résultats et Discussion

IV.1. Composition chimique des poudres de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube.....	70
IV.1.1. Teneur en eau et en cendres.....	70
IV.1.2. Teneur en protéines.....	70
IV.1.3. Teneur en glucides.....	71
IV.1.4. Teneur en matière grasse	71
IV.2. Les composés phénoliques du cœur d'artichaut et de la pulpe de caroube	72
IV.2.1. Rendements d'extraction à l'eau et au méthanol.....	72
IV.2.2. Teneurs en polyphenols totaux et en flavonoides des extraits phénoliques aqueux et méthanolique de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube.....	74
IV.2.2.1. Polyphénols et flavonoides de cœur d'artichaut.....	74
IV.2.2. 2. Polyphénols et flavonoides de la pulpe de caroube.....	77
IV.3. Rendement d'extraction et caractéristiques physico-chimiques du chitosane de carapace de crevette.....	79
IV.3.1. Rendement d'extraction du chitosane.....	79
IV.3.2. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane.....	81
IV.4. Pouvoir antioxydant des différents extraits phénoliques de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.....	84
IV.4.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH.....	84
IV.4.1.1. Cas des extraits phénoliques de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association.....	84
IV.4.1.2. Cas des extraits de caroube, du chitosane et de leur association.....	87

IV.4.2.	Inhibition du blanchiment du β -carotène	88
IV.4.2.1.	Inhibition par les extraits phénoliques de cœur d'artichaut, le chitosane et leur association.....	88
IV.4.2.2.	Inhibition par les extraits phénoliques de pulpe de caroube, le chitosane et leur association.....	91
IV.5.	Activité antibactérienne et concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits phénoliques de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.	92
IV.5.1.	Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité des souches.....	92
IV.5.1.1.	Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits phénoliques de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association.....	92
IV.5.1.2.	Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits phénoliques de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.....	96
IV.5.2.	Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits phénoliques et de leur association avec le chitosane.....	99
IV.5.2.1.	CMI des extraits phénoliques du cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association.....	99
IV.5.2.2.	CMI des extraits phénoliques de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.....	101
IV.6.	Activité anti-inflammatoire in Vitro et in Vivo des extraits phénoliques de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association	103
IV.6.1.	Activité anti-inflammatoire in Vitro	104
IV.6.1.1.	Activité anti-hémolytique.....	104
IV.6.1.2.	Pouvoir inhibiteur de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf.....	107
IV.6.2.	Activité anti-inflammatoire in Vivo.....	109
Conclusion		118
Références bibliographiques		122

INTRODUCTION

Introduction

Il est connu que les produits alimentaires sont soumis à diverses altérations chimiques et microbiennes, qui dans les conditions normales de manipulation, de transformation et de stockage, entraînent diverses modifications de leurs caractéristiques et rendent les aliments indésirables ou bien inappropriés à la consommation humaine (Gutiérrez-del-Río et al, 2018). Les processus d'oxydation d'une part et les altérations d'ordre microbiologique d'autre part sont les principales causes de détérioration des aliments, qui se produit pendant leur transformation, leur cuisson et leur stockage. Ainsi, ces paramètres sont les causes d'apparition de plusieurs aspects induisant l'inacceptabilité des aliments par le consommateur, à savoir le goût de rance, des odeurs et des saveurs désagréables, voir même des contaminations pouvant induire des toxi-infections.

Dans ce contexte, les acides gras polyinsaturés sont principalement affectés par l'oxydation, ce qui peut réduire la valeur nutritionnelle, la qualité des aliments et la durée de conservation de leur conservation. Elle génère des radicaux libres, des peroxydes et d'autres métabolites toxiques nocifs pour la santé des consommateurs (Grosso et al, 2020).

Par ailleurs, l'altération microbiologique survenant pendant l'entreposage et la distribution des aliments est un problème majeur qui affecte la qualité et la salubrité des aliments tout en raccourcissant la durée de conservation. De plus, le développement de microorganismes pathogènes dans les aliments est associé à des infections et/ou des intoxications (Moschopoulou et al, 2019).

Les agents de conservation synthétiques des aliments sont utilisés depuis des décennies pour prévenir la détérioration des aliments malgré leurs effets négatifs sur la santé en induisant une augmentation du nombre des bactéries multirésistantes. La sensibilisation des consommateurs oblige les fabricants à les remplacer progressivement par des composés antioxydants et antibactériens naturels. Par conséquent, il est important de rechercher de

nouveaux composés naturels utiles pour préserver les aliments de la détérioration microbienne et de l'oxydation.

Le chitosane et les polyphénols sont deux exemples de composés naturels aux propriétés antioxydantes et antibactériennes (Youcefi et al, 2017). Le chitosane est un ingrédient fonctionnel qui peut être utilisé dans les produits alimentaires pour améliorer la durée de conservation et préserver la santé des consommateurs (Ngo et Kim, 2014).

Il s'agit d'un polymère polysaccharidique cationique linéaire de D-glucosamine et N-acétyl-B-D-glucosamine liés entre elles par des liaisons glycosidiques B (1-4) (Tikhonov et al, 2006). Le chitosane est obtenu par désacétylation alcaline partielle de la chitine à partir de carapaces de crevettes et d'insectes, ainsi que de champignons ou de mollusques, dans laquelle les groupes acétyle sont transformés en groupes amine (Ngo et Kim, 2014).

Durant ces dernières années, ce polymère a suscité un intérêt considérable en raison de ses caractéristiques favorables telles que la biodégradabilité, la biocompatibilité, la sécurité et la non – allergénicité. De plus, il possède de nombreuses propriétés biologiques telles que des effets antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires, antidiabétiques, anticancéreux, anti-obésité et neuroprotecteurs, entre autres (Mohan et al, 2020).

Dans le même sens, les polyphénols sont un groupe de métabolites végétaux secondaires qui peuvent être utilisés comme conservateurs naturels dans les aliments. En plus d'être sains, ils peuvent prolonger la durée de conservation des produits périssables (Martillanes et al, 2017).

La plante méditerranéenne *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (artichaut) appartenant à la famille des astéracées, est l'une des sources les plus riches en composés phénoliques bioactifs comprenant les acides gallique, caféique et coumarique (Schütz et al, 2004 ; Lattanzio et al, 2009).

L'artichaut est riche en nutriments tels que les protéines, les lipides, les glucides, les vitamines et les minéraux, et possède de bonnes propriétés sensorielles (Lattanzio et al, 2009).

Il a été rapporté que les extraits de *C. scolymus* ont de nombreux effets thérapeutiques tels que des activités anticancéreuses, hépatoprotectrices, antibactériennes, antioxydantes, anti-virales (VIH) et peuvent inhiber la biosynthèse du cholestérol et l'oxydation des lipides (Wang et al, 2003 ; Ciancolini et al, 2013).

Il en est de même pour la caroube, fruit de l'espèce végétale *Ceratonia siliqua* (L.) qui est un arbre vivace à feuilles persistantes appartenant à la famille des Fabacées (Légumineuses), d'origine méditerranéenne. Le caroubier peuple maintenant de nombreuses régions du monde, y compris l'Amérique du Nord et du Sud, l'Afrique et l'Australie. Cette plante a été utilisée par les humains depuis la nuit des temps et qui est apprécié pour son importance économique et culinaire (Dahmani et al, 2023).

En plus de ses utilisations culinaires, la caroube aurait plusieurs activités pharmacologiques, notamment des effets antioxydants, anti-diarrhéiques, antibactériens, anti-ulcéreux et anti-inflammatoires (Rtibi et al, 2016). Le même auteur suggère d'utiliser la caroube comme antioxydant naturel sous forme de complément alimentaire pour la prévention des dommages causés par le stress oxydatif. En outre, les feuilles, l'écorce et les graines de cette espèce végétale ont traditionnellement été utilisées en médecine pour traiter diverses maladies, notamment la diarrhée, le diabète et l'hypertension (Baytop, 1984 ; Ali-Shtayeh et al, 2013).

Enfin, à notre connaissance, l'effet synergique potentiel du chitosane et des polyphénols sur l'activité antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire n'a pas été exploré. La présente étude a été conçue et menée dans le but de combler ce manque d'information tout en valorisant les déchets de carapace de crevettes, et d'explorer l'effet synergique de la combinaison de leur teneur en chitosane avec les polyphénols du cœur d'artichaut d'une part et les polyphénols de gousses de caroube d'autre part, dans le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la croissance des bactéries responsables d'intoxication alimentaire et dans l'atténuation de l'inflammation.

Chapitre I

Le chitosane

1.1. Définition et principales caractéristiques

Le chitosane (ou chitine désacétylée) est un copolymère linéaire, composé d'un arrangement aléatoire d'unités de glucosamine (GlcN) et de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) liées entre elles par des liaisons glucosidiques β -(1-4) (Jayakumar et al., 2011).

Rarement présent dans la nature, le chitosane est produit essentiellement à partir de la chitine, l'un des polysaccharides les plus abondants sur terre après la cellulose (le chitosane est le produit de la réaction de désacétylation de la chitine extraite de la biomasse, à l'aide de traitements acide et basique).

La distinction entre chitine et chitosane s'établit en fonction des propriétés de solubilité et quelques autres paramètres qui caractérisent le polymère tels que : le degré d'acétylation, le poids moléculaire et, de manière plus fine, la séquence des résidus GlcN et GlcNAc, le long de la chaîne du polysaccharide (Kasaai, 2009).

Offrant plusieurs propriétés biologiques (biodégradabilité, biocompatibilité, non toxicité...), le chitosane trouve aujourd'hui son application dans des domaines aussi variés que la pharmaceutique, le biomédical, le secteur des cosmétiques et celui de l'agroalimentaire (Gzyra-Jagiela et al., 2019).

1.2. Sources et marchés de production

La chitine, biopolymère largement répandu dans la nature, constitue la principale source de chitosane (Bornet et Teissedre, 2005). Bien que les sources de chitine soient nombreuses et aussi variées, tels que les insectes, les champignons et certaines algues, les mollusques et les carapaces de crustacés (crevette, langouste, calamar, crabe et Krill) restent les deux sources naturelles les plus abondantes et les plus exploitées commercialement (Randriamahatody, 2011). (Fig.1).

Le problème des opérations de transformation des produits de la mer et de valorisation de leurs coproduits pour la production de chitine et autres molécules bioactives, telles que les protéines et les

producteurs et consommateurs de chitosane (Bornet et Teissedre, 2005).

Les pays leaders du marché, affichent un développement rapide dans la consommation et la commercialisation de ce produit, grâce au développement des industries de production, associées à la présence d'une matière première abondante, et à une reconnaissance précoce des avantages offerts par le chitosane. La demande croissante de consommation dans cette même région d'Asie, est aussi liée au programme de soutien gouvernemental (Korea Food & Drug Administration, Japan Food Chemical Research Foundation) qui considèrent le produit comme sûr pour être utilisé en tant qu'additif dans plusieurs catégories de produits alimentaires (Oyatogun et al., 2020).

La consommation de chitosane dans les pays asiatiques est aujourd'hui courante, car il est incorporé dans plusieurs aliments, des pilules amincissantes, ou encore dans des crèmes cosmétiques régénératrices et antirides.

En Amérique du Nord, deuxième producteur mondial de chitosane, ce produit est employé comme ingrédient dans certaines transformations alimentaires et comme film comestible protecteur des aliments.

En Europe, la réglementation sur l'utilisation de ce biopolymère dans le domaine alimentaire est restrictive ; ainsi, il est autorisé uniquement comme complément alimentaire dans des formulations diététiques. En outre, l'augmentation des dépenses dans l'industrie pharmaceutique et la popularité croissante des produits cosmétiques naturels devraient propulser la demande au cours de la période de prévision (Oyatogun et al., 2020).

La figure 2 donne un aperçu général sur la dynamique du marché de production et de consommation de chitosane dans le monde à travers les cinq continents.

I.3. Structure chimique

Comme déjà mentionné précédemment, la chitine et son dérivé le chitosane, sont des polysaccharides naturels constitués de deux monosaccharides, la N-acétyl-D-glucosamine et la D-

glucosamine, reliés par des liaisons glucosidiques β (1-4) (Fig.3) (Akakuru et al., 2018).

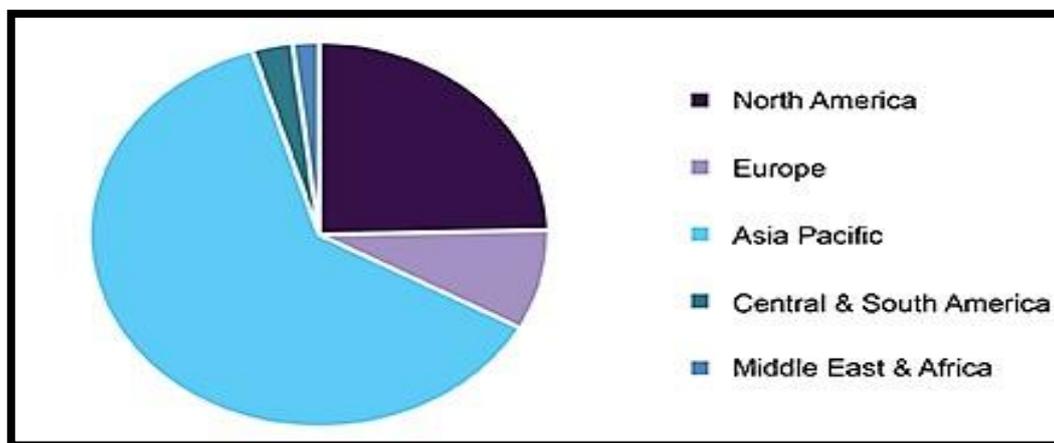


Figure 2. Les parts en % du marché mondial du chitosane par région, 2019 (Oyatogun et al., 2020).

En fonction de la fréquence et de la proportion de ces monosaccharides, la molécule est définie comme chitine ou chitosane, sachant que la chitine contient principalement de l'acétyl-D-glucosamine et peut être transformée en chitosane par désacétylation partielle du monomère N-acétyl-D-glucosamine en glucosamine (Gzyra-Jagiela et al. 2019).

La nature cationique du chitosane (un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6, respectivement) lui confère une propriété particulière comparée à la majorité des polysaccharides qui sont généralement soit neutres, soit chargés négativement dans un milieu acide.

Le chitosane est soluble en dessous de son PKa (proche de 6.3) et se voit attribuer une charge positive grâce à ses fonctions amines libres, une particularité rare qui lui permettra de former des complexes électrostatiques ou des structures multicouches avec d'autres polymères, synthétiques ou naturels chargés négativement (Gzyra-Jagiela et al., 2019).

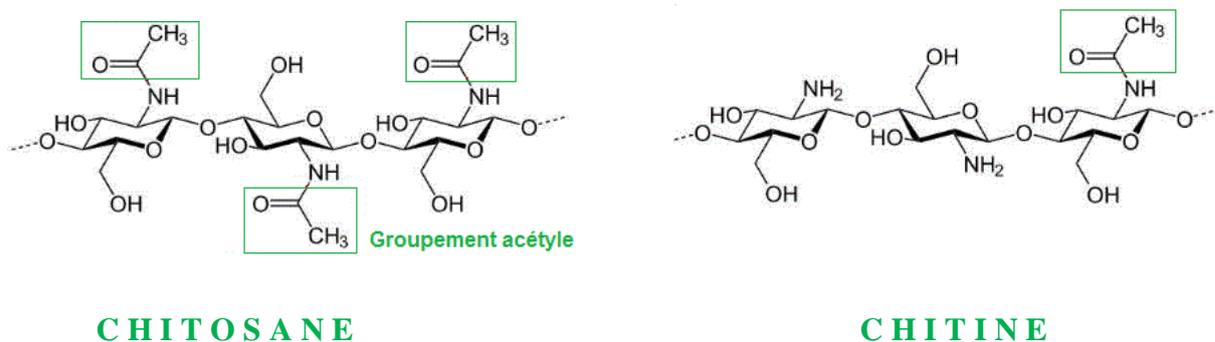


Figure 3. Structure chimique de la chitine et du chitosane (Brasselet et *al*, 2019).

I.4. Procédés d'extraction du chitosane

Les procédés d'extraction du chitosane font appel à différentes méthodes qui consistent en une série de traitements chimiques ou biologiques (enzymatiques, fermentation) incluant plusieurs étapes de déprotéinisation, de déminéralisation et de blanchiment pour obtenir la chitine, suivie d'une étape supplémentaire de désacétylation pour l'obtention du chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990).

1.4.1. Procédé d'extraction chimique

Les méthodes chimiques ont été la première approche utilisée dans l'extraction de la chitine. Elles reposent sur l'hydrolyse des protéines et l'élimination des matières inorganiques, plus une étape de décoloration si nécessaire, réalisée le plus souvent par des agents oxydants (Younes et Rinaudo, 2015).

1.4.1.1. Déminéralisation

La déminéralisation est une étape de traitement qui consiste à éliminer les minéraux (principalement le carbonate de calcium CaCO_3) liés à la chitine (Younes et Rinaudo, 2015) par hydrolyse acide, sous agitation et à température ambiante.

Classiquement, le réactif préférentiel pour cette réaction est l'acide chlorhydrique dilué à différentes concentrations bien que d'autres acides comme les acides nitrique, formique, sulfurique et acétique peuvent être utilisés.

Le facteur décisif de la déminéralisation est lié à l'aire de contact entre la matrice de chitine et le solvant. Cependant, il a été signalé que des températures élevées, des incubations plus longues et des concentrations élevées en acide, affectent les propriétés physico-chimiques finales de la chitine résultante.

I.4.1.2. Déprotéinisation

Dans cette étape, les protéines associées à la chitine sont éliminées par hydrolyse basique, à chaud, sous agitation, pendant quelques minutes à quelques jours (les conditions de réaction varient dans chaque étude).

Un large éventail de produits chimiques testés comme réactifs de déprotéinisation peuvent être utilisés, notamment, la soude (NaOH), le carbonate de soude (Na₂CO₃), le bicarbonate de soude (NaHCO₃), l'hydroxyde de potassium (KOH), le carbonate de potassium (K₂CO₃), l'hydroxyde de calcium (CaOH₂), le sulfite de sodium (Na₂SO₃), le bisulfite de sodium (NaHSO₃), le bisulfite de calcium (CaHSO₃), le phosphate trisodique (Na₃PO₄) et le monosulfure de sodium (Na₂S). La soude est le réactif préférentiel et elle est appliquée à une concentration allant de 0.125 à 5M et à des températures variables (pouvant atteindre les 160°C) (Younes et Rinaudo, 2015).

I.4.1.3. Décoloration ou blanchiment

Bien que facultative, la décoloration permet de retirer les pigments qui peuvent subsister après les deux traitements précédents (déprotéinisation et déminéralisation). Les agents oxydants les plus souvent utilisés pour l'obtention d'une chitine quasiment blanche sont l'eau de javel et l'acétone

I.4.1.4. Désacétylation de la chitine

La désacétylation de la chitine se fait par l'emploi d'acides ou d'alcalis. Cependant, la désacétylation alcaline est la plus fréquemment utilisée en raison de la sensibilité des liaisons glycosidiques à l'acide (Younes et Rinaudo, 2015).

Dans ce sens, la chitine est déacétylée par une hydrolyse des groupements acétyles en milieu fortement alcalin (NaOH ou KOH à 50 %), à température dépassant 100°C pendant 5 à 10 min, sous agitation. Le mélange est ensuite refroidi et le chitosane recueilli par filtration est lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité (Fig. 4). Il est finalement séché dans un flux d'air chaud ou tout simplement laissé à l'air libre pendant 24 à 48h. De nombreux paramètres peuvent avoir un impact sur les caractéristiques finales du produit obtenu. La concentration de NaOH, la température et le temps de traitement ont un effet significatif sur le degré de désacétylation (DA) et le poids moléculaire (PM) du chitosane (Tsaih et Chen, 1997).

Des facteurs supplémentaires pourraient aussi influencer le processus de désacétylation, tels que la nature du réactif alcalin (le traitement au NaOH est beaucoup plus efficace que le KOH), les conditions atmosphériques, la taille des particules, le rapport chitine/solvant et la source ou l'origine de la matière première (Araiza et al., 2008). La figure 4, résume les chemins réactionnels qui conduisent à l'obtention de la chitine et ses principaux dérivés à partir des carapaces de crustacés et plumes de calamar (Collin et Crouzet, 2011).

I.4.2. Procédé d'extraction biologique

Le développement des techniques d'extraction basées sur le concept de « chimie verte » ont fait l'objet d'une attention accrue, favorisant l'utilisation d'enzymes et de microorganismes pour l'extraction de la chitine. Plusieurs études comparatives d'extraction à partir de coquilles de crevettes et autres crustacés réalisées par des méthodes chimiques et biologiques, ont indiqué que la méthode biologique (utilisant des micro-organismes) était meilleure que la méthode chimique car elle préserve la structure de la chitine.

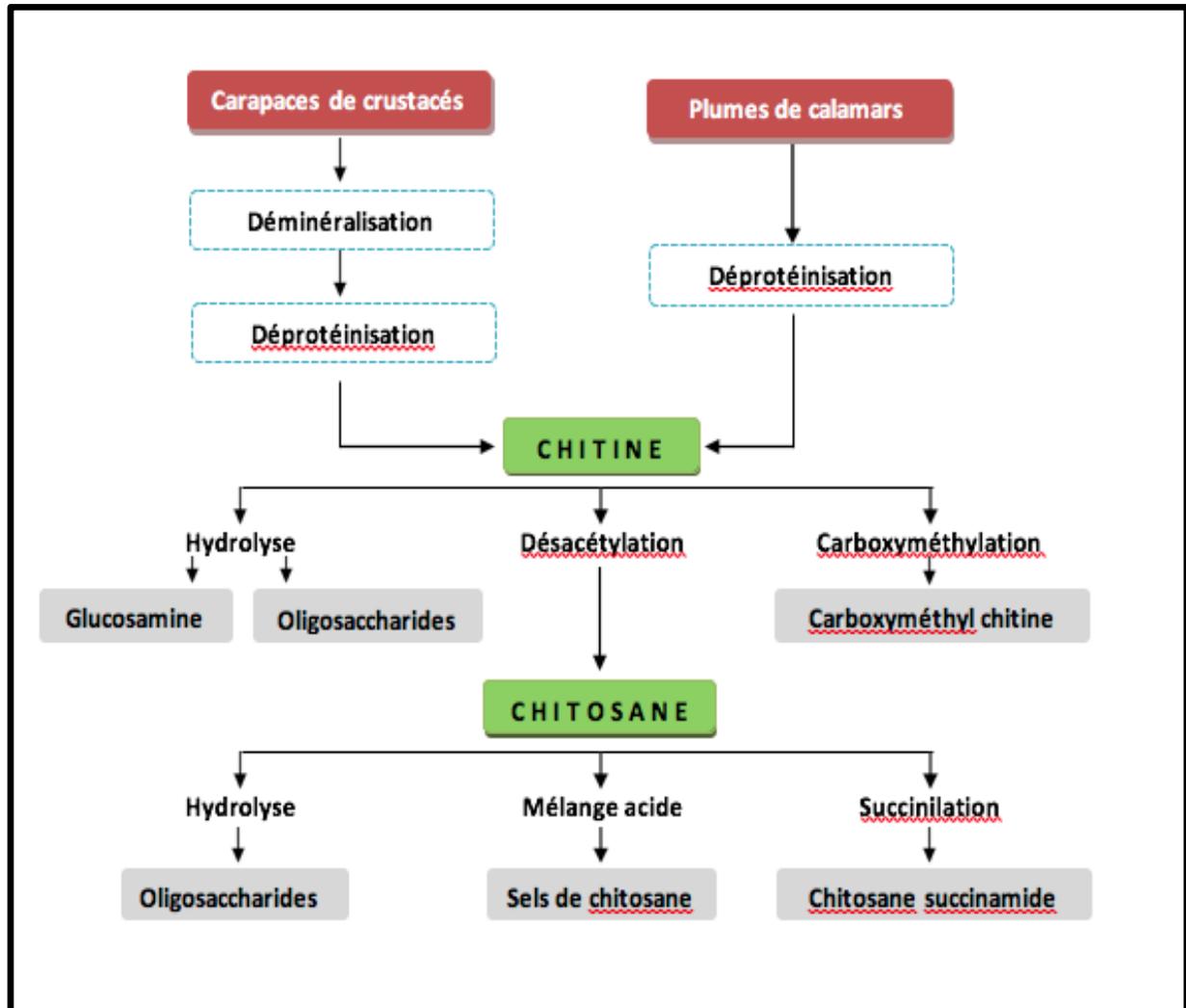


Figure 4. Chemins réactionnels selon la source conduisant à l'obtention de la chitine et du chitosane (Collin et Crouzet, 2011).

Bustos et Healy (1994) ont également démontré que la chitine obtenue par déprotéinisation des coquilles avec divers micro-organismes protéolytiques a des poids moléculaires élevés par rapport à la chitine des crustacés chimiquement préparée.

L'extraction biologique de la chitine offre une reproductibilité élevée en un temps plus court, une manipulation plus simple, une consommation de solvant plus faible et un apport d'énergie plus

faible (Younes et Rinaudo, 2015).

I.4.2.1. Déprotéinisation enzymatique

Dans cette déprotéinisation, l'extraction de la chitine nécessite l'utilisation d'enzymes protéolytiques (protéases) provenant essentiellement de sources végétales, animales ou microbiennes. L'alcalase, la pepsine, la papaïne, la pancréatine, et la trypsine sont parmi les différentes protéases utilisées dans ce processus d'élimination des protéines pendant l'extraction de la chitine.

Des protéases purifiées ou brutes peuvent être utilisées ; cependant, les enzymes purifiées sont coûteuses par rapport aux protéases brutes, qui sont non seulement moins chères mais aussi plus efficaces en raison de la présence de protéases coexistantes. Les protéases brutes, principalement dérivées de bactéries et de viscères de poisson, sont donc largement utilisées dans le processus d'extraction de la chitine, une autre manière de préserver l'environnement des sous-produits de la mer, jetés comme déchets (Younes et Rinaudo, 2015).

De nombreux travaux de recherches ont démontré l'efficacité des protéases bactériennes dans la déprotéinisation. Ainsi, Synowiecki et Al-Khateeb (2000) ont appliqué une déprotéinisation enzymatique sur les déchets de crevettes précédemment déminéralisés, afin de produire de la chitine et un hydrolysat de protéines à intérêt nutritionnel. Une sérine endopeptidase (ou alcalase 2.4 L), obtenue à partir de *Bacillus licheniformis*, a été utilisée par ces auteurs.

Dans une autre étude, de nombreuses protéases microbiennes ont été comparées sur la base de leur efficacité dans la déprotéinisation des carapaces de crevettes. Récemment, de nombreuses protéases brutes de poissons et d'invertébrés marins ont été utilisées pour la déprotéinisation des carapaces de crevettes. Une possibilité d'utiliser les déchets de crustacés à la fois comme substrat et comme source de protéases a été également effectuée (Mukhin et Novikov, 2001).

I.4.2.2. Déprotéinisation et désacétylation par fermentation

Par ce procédé, la chitine est extraite par fermentation lactique, en présence de souches bactériennes endogènes ou sélectionnées, pendant 5 jours à 30°C. L'acidification du milieu par la production d'acide lactique par les bactéries, conduit à une déminéralisation partielle tandis que les bactéries assurent la déprotéinisation.

L'étape de déprotéinisation par fermentation peut être réalisée en une seule étape (la déprotéinisation et la liquéfaction simultanée des protéines pourraient se produire par action de protéases produites par des souches ajoutées), en deux étapes (après fermentation suivie par un traitement à l'acide lactique), ou par co-fermentation (en présence de deux bactéries, une produisant l'acide lactique tel que *Lactobacillus paracasei tolerans* et l'autre produisant des protéases extracellulaires comme *Serratia marcescens*) (Younes et Rinaudo, 2015).

L'efficacité de la fermentation dépend de plusieurs facteurs, principalement l'espèce et la quantité d'inoculum, la source de carbone et sa concentration, le pH initial et l'évolution du pH pendant la fermentation ainsi que la température et la durée de fermentation. Cependant, le faible degré de pureté des chitines obtenues par cette méthode et les traitements supplémentaires souvent nécessaires pour améliorer la déminéralisation ainsi que le temps de réactions beaucoup plus longs par rapport à la voie chimique, restent des facteurs limitant quant à son application.

L'utilisation de chitine désacétylases pour la conversion de la chitine en chitosane, contrairement à la procédure chimique actuellement utilisée, est un processus alternatif qui offre un bon rendement de désacétylation, aboutissant à la production de chitosane nouveau et bien défini (Araiza et al., 2008). L'activité enzymatique de ces désacétylases a été rapportée chez plusieurs champignons (*Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans* et *Colletotrichum lindemuthianum*) et quelques

espèces d'insectes.

Un prétraitement des substrats de chitine avant l'addition d'enzymes s'avère être nécessaire afin d'améliorer l'accessibilité des groupes acétylés à l'enzyme. Dans certaines conditions, l'enzyme est capable de désacétyler le chitosane jusqu'à 97% (Younes et Rinaudo, 2015). Cependant, cette méthode reste limitée à l'échelle du laboratoire en raison du coût élevé des enzymes comme cela a été signalé précédemment. Néanmoins, les méthodes enzymatiques, plus respectueuses de l'environnement, peuvent être vues comme les méthodes de production du chitosane de demain (Araiza et al., 2008).

I.5. Propriétés physicochimiques du chitosane

I.5.1. Le degré d'acétylation (DA) ou de désacétylation (DD)

Le degré d'acétylation (DA) ou de désacétylation (DD) est le principal paramètre qui distingue la chitine du chitosane (la chitine correspond à un polymère dont le DD est inférieur à 60%, sinon il s'agit de chitosane. Il est défini comme étant le rapport du nombre d'unités acétylés (N-acétyl-D-glucosamine) sur le nombre global de motifs (GlcNAc + GlcN) qui constituent ce polymère.

$$DA = \text{Nombre d'unités N-acétyl-D-glucosamine) acétylées} / \text{Nombre global de motifs}$$

$$DD = 1 - DA$$

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer le degré de désacétylation du chitosane. Cependant, la précision des valeurs obtenues par ces différentes méthodes est très variable comme rapporté par plusieurs auteurs. La spectroscopie IR (Chatelet et al., 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai, 2009), la RMN solide ou sur des échantillons en solution (dosage UV et titrage colloïdal) (Lou et al., 2012), et la RMN liquide (Rabiul et al., 2013) sont parmi les méthodes les plus utilisées. Cependant, la technique qui semble la plus adaptée pour une caractérisation rapide est la Spectroscopie IR.

Il est à noter que le degré de désacétylation du chitosane pourrait influencer un bon nombre de facteurs liés à ce copolymère, tels que sa solubilité en milieux aqueux, sa capacité de gonflement et sa vitesse de dégradation enzymatique, des paramètres qui, par la suite, vont affecter sa biodégradabilité, son activité immunologique et ses propriétés mécaniques et rhéologiques.

I.5.2. Le poids moléculaire

Le poids ou la masse moléculaire (PM) d'un polymère, constitue le deuxième paramètre important affectant sa fonctionnalité. Sa valeur dépend fortement de la méthode de préparation ou d'obtention du chitosane qui peut induire une dépolymérisation ou une dégradation des chaînes macromoléculaires par effet mécanique ou chimique et de la source ou l'origine du matériel brut utilisé.

Les chaînes de chitosane obtenues industriellement ont souvent des masses très variées (entre 100 à 1000 kDa), et le choix du PM approprié doit être adapté à l'application industrielle visée. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination du PM du chitosane ainsi que sa polydispersité. La chromatographie par perméation sur gel et les mesures viscosimétriques sont parmi les méthodes classiques de détermination.

I.5.3. La viscosité

La viscosité est également une propriété importante, qui donne une idée sur le comportement du chitosane en solution. Cette viscosité est sous l'influence de plusieurs paramètres comme le degré de désacétylation du polymère (plus ce polymère est désacétylé, plus il est soluble) son poids moléculaire (relation proportionnelle), sa concentration (la viscosité augmente avec l'augmentation de la concentration), le pH du solvant utilisé (plus il est bas, plus la viscosité est élevée) et la température (la viscosité diminue avec l'augmentation de la température) (Aljawish et al., 2014).

I.5.4. La solubilité

Le chitosane est insoluble dans l'eau, les alcalis et les solvants organiques. Cependant, il est

soluble dans la plupart des solutions d'acides organiques ayant un pH inférieur à 6 (en général, le chitosane est parfaitement soluble à un pH égal à 4). Les acides acétique et formique sont parmi les acides les plus couramment utilisés pour dissoudre le chitosane. Certains acides inorganiques dilués, tels que l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, et l'acide perchlorique peuvent également être utilisés pour préparer une solution de chitosane, mais uniquement après agitation et réchauffement.

En plus de dissoudre le chitosane dans une solution acide, des mélanges tels que le diméthylformamide avec du tétr oxyde de diazote dans un rapport (3/1) semblent également être de bons solvants pour le chitosane. La solubilité du chitosane dans une solution dépend aussi de quelques paramètres intrinsèques liés au produit, tels que le degré de désacétylation du polymère, sa viscosité, sa force ionique, du pH et de la nature de l'acide utilisé dans la solubilisation (Rinaudo, 2006 ; Aljawish et al., 2014).

I.5.5. La cristallinité

La cristallinité et l'agencement moléculaire sont deux paramètres importants qui contrôlent un certain nombre de propriétés comme la solubilité, l'accessibilité des sites internes des macromolécules, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles (Aljawish et al., 2014).

Par rapport à cette propriété physico-chimique, le chitosane est une substance semi-cristalline et son état cristallin dépend de son origine, du procédé d'obtention du chitosane et du degré d'acétylation de ce matériau (la cristallinité augmente avec l'augmentation du DA) (Benbettaieb et al. 2018).

Des études de diffraction aux rayons X (DRX) ont permis de démontrer plusieurs structures polymorphes (ou cristallines) de chitosane : structures hydratées, structures anhydres et structures amorphes (selon l'agencement moléculaire et la teneur en eau dans les mailles unitaires).

I.6. Propriétés biologiques du chitosane

Le chitosane présente d'exceptionnelles propriétés biologiques, qui sont à la fois variées

et complémentaires. Déjà utilisé pour sa biodégradabilité et sa biocompatibilité, il trouve aujourd'hui de nouvelles applications qui ouvrent la voie à de nouvelles possibilités grâce à ses effets antimicrobiens et sa typicité antioxydante. À l'exposé de ces propriétés spécifiques, les récentes avancées dans le domaine biomédical et alimentaire ont permis de mettre en évidence les bienfaits de cet oligosaccharide sur l'organisme.

I.6.1. La biodégradabilité

Chez les mammifères, la biodégradation du chitosane se fait essentiellement par l'action d'une enzyme protéolytique non spécifique appelé : lysozyme (Varum et *al.*, 1997). Son action porte sur la dégradation des liaisons glycosidiques β (1-4) des unités N-acétyl-D-glucosamine (Aljawish et al., 2014) en oligomères acétylés ou non, de longueur variable, métabolisables dans l'organisme (Araiza et al., 2008).

La biodégradabilité du chitosane est fortement liée à ses propriétés intrinsèques comme son PM et son degré d'acétylation (Ratajska et Boryniec, 1998). Un chitosane ayant un DA égal à 50% est plus rapidement dégradé (dégradation optimale) par rapport à un chitosane ayant un DA inférieur à 30%. Celui qui a un DA inférieur à 15% montre une plus faible vitesse de dégradation et peut subsister plusieurs mois *in vivo* (Araiza et al., 2008).

I.6.2. La biocompatibilité

Le chitosane est un biopolymère de plus en plus utilisé dans l'ingénierie tissulaire de la peau, des os et du cartilage puisqu'il présente une intéressante caractéristique de biocompatibilité. Il s'est en fait avéré plus cytocompatible, hémocompatible, non toxique et bio-résorbable (Aljawish et al., 2014), toléré par les sous-systèmes biologiques du corps, après avoir été mise en contact direct avec les cellules et les tissus par divers moyens, tels que les injections et les implants (Sarmiento and Neves, 2012).

Imitant la structure des autogreffes tissulaires tout en étant capable de soutenir les cellules

ensemencées sur ces matériaux, il peut également agir comme un véhicule de certains antibiotiques ou agents thérapeutiques indépendamment de la nature de la lésion à réparer (Croisier and Jérôme, 2013).

La combinaison du chitosane avec divers composés tel que la phosphatidylcholine (lipide neutre entrant dans la composition de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire) peut entraîner une augmentation de la biocompatibilité du polymère et ainsi reproduire les propriétés de la membrane cellulaire.

I.6.3. Effet antimicrobien

L'activité antibactérienne du chitosane est l'une des propriétés les plus convoitées (Cuero, 1999). Inhibant la croissance d'une grande variété de bactéries à Gram positif et à Gram négatif) par son effet bactériostatique ou bactéricide, le chitosane semble avoir un effet inhibiteur sur certaines enzymes responsables de la production de toxines et s'avère posséder la capacité de rompre la barrière de perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif comme celle d'*Escherichia coli* (Araiza et al., 2008).

Le chitosane agit également comme un agent chélateur d'anions pouvant éliminer de l'environnement bactérien certains métaux (à l'état de traces) indispensables à la croissance des micro-organismes et/ou à la production de toxines.

L'activité antibactérienne du chitosane est influencée par plusieurs paramètres, incluant l'origine biologique du chitosane (sa nature), le pourcentage de désacétylation, le degré de polymérisation, ainsi que le type d'organismes ciblés (Aljawish et al., 2014).

I.6.4. Activité antifongique

Le chitosane est considéré comme l'un des produits les plus prometteurs pour le contrôle de plusieurs champignons post-récolte, isolés de divers fruits et légumes. Les résultats de l'efficacité du chitosane sur la sporulation, la croissance mycélienne et la germination, ont démontré que ce dernier

peut contrôler divers isolats de phytopathogènes tels que : *Colletotrichum*, *Fusarium* et *Rhizopus*, isolés respectivement de bananiers (*Musa paradisiaca* et *Musa sapientum*) et du jacquier (*Artocarpus heterophyllus*.) pour le genre *Rhizopus*.

En raison de ses diverses propriétés (capacité de former des films, biodégradabilité et sa fonction d'éliciteur), le chitosane est devenu une alternative à l'utilisation de fongicides pour contrôler les maladies phytopathogènes et ainsi préserver la qualité du fruit après sa récolte.

Dans une étude relativement récente, l'enrobage de la fraise par du chitosane a révélé un succès dans son application. Les résultats obtenus ont montré une diminution de la fréquence respiratoire du fruit, une réduction de la perte d'eau et une préservation de la fermeté pendant le stockage des fruits traités (Porfirio et al., 2018).

I.6.5. Activité antioxydante

Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence l'activité antioxydante du chitosane et de ses dérivés *in vitro*. Ces composés éliminent les radicaux oxygènes tels que l'hydroxyle, le superoxyde, l'alkyle ainsi que les radicaux DPPH. Sun et al. (2006) ont rapporté que le chitosane et ses dérivés agissent comme donneurs d'hydrogène pour empêcher la séquence oxydative.

En outre, il a été observé que les propriétés d'élimination des radicaux dépendent du DA et du PM du chitosane. Park et al. (2004) ont démontré que les chitosanes de faible PM sont plus actifs (pouvaient présenter plus de 80% d'activité de piégeage des radicaux superoxydes) que ceux à PM élevé. L'influence du chitosane avec différents PM (30.90 et 120 kDa) sur l'activité antioxydante de la peau du saumon a également été étudiée (Younes et Rinaudo, 2015).

Même si le mécanisme précis de l'activité d'élimination des radicaux n'est pas aussi clair, il est cependant, attribué aux groupes aminés et hydroxyles (attachés aux positions C-2, C-3 et C-6 du cycle pyranose) qui réagissent avec les radicaux libres instables, facilitant la formation de macromolécules stables.

Aujourd'hui, la capacité du chitosane à réduire l'oxydation lipidique de certains aliments trouve son utilité dans plusieurs filières alimentaires (filiale viande, poisson et produits de charcuterie) (Aljawish et al., 2014).

I.6.6. Activité anti-inflammatoire

De nombreuses recherches ont été menées sur les propriétés anti-inflammatoires et pro-inflammatoires du chitosane et ses dérivés. Olivera et al. (2012) ont montré que les macrophages et les cellules dendritiques au contact du chitosane entraînaient la production de signaux pro et anti-inflammatoires, balance importante dans la réparation tissulaire.

Davydova et al. (2016), ont montré que le PM du chitosane n'influençait pas la production de cytokines anti-inflammatoires (IL10) dans le sang et la suppression de la cholestérolémie. Gallo et al. (2018) suggèrent que cet effet était dû à des éléments structurels.

Les nanoparticules de chitosane-alginate inhibent la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires induites par *Propionibacterium acnes* dans l'acné (Kim et al., 2002 ; Gallo et al., 2018).

I.6.7. Activité anti-tumorale

Outre les différentes activités biologiques précédemment citées du chitosane, ce dernier a également montré un effet inhibiteur de la croissance des cellules tumorales et une inhibition de l'angiogénèse induite par la tumeur et les métastases tumorales (Aljawish et al., 2014).

Ta et al. (2010) ont démontré que l'administration intra-tumorale de molécules de chitosane seul favorise l'effet anti-tumoral dans plusieurs modèles de cancers tel que le cancer du sein et inhibe directement la prolifération des cellules tumorales en induisant leur apoptose. Un tel résultat fut confirmé par Hasegawa et al. (2001) dans le cas des cellules tumorales de la vessie.

Le chitosane inhibe la croissance des cellules tumorales dans le carcinome ascitique d'Ehrlich

en diminuant la glycolyse, minimisant ainsi l'absorption du glucose et le niveau d'ATP dans les cellules intactes de la tumeur (Guminska et al., 1996 ; Se-Kwon, 2011).

I.7. Fonctionnalités et principaux débouchés du chitosane

Les propriétés exceptionnelles du chitosane expliquent l'engouement des industriels pour cette macromolécule. Extraite des carapaces de crustacés, elle trouve aujourd'hui de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que le cosmétique, le biomédical, l'agriculture ou encore le traitement des eaux (Younes et Rinaudo, 2015).

I.7.1. Secteur agroalimentaire

En agriculture, le chitosane présente de nombreuses applications potentielles. Il est utilisé pour l'enrobage des semences, l'arrosage des cultures et supposé intervenir même dans le renforcement des mécanismes de défense chez les plantes (Se-Kwon, 2011).

Hadwiger et al. (1984), ont découvert que le traitement au chitosane dans l'enrobage des graines avait de nombreux effets bénéfiques, tels que l'inhibition de la croissance de plusieurs agents pathogènes (bactériens et fongiques) et l'amélioration des réponses ou de résistance de la plante contre les maladies avant même que la plante ne soit en contact avec l'agent pathogène. Le chitosane offre aussi la possibilité de remplacer une partie des produits chimiques actuellement en usage par des solutions naturelles (bio-pesticide du futur).

Dans le secteur alimentaire, le chitosane offre aussi plusieurs possibilités d'usage. Il est utilisé pour la stabilisation des aliments, la désacidification du café, l'élimination des teintures ou la clarification des boissons (Se-Kwon, 2011). Il est également utilisé pour prolonger les temps de conservation des aliments en raison de ses propriétés antibiotiques. Les principales applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont mentionnées dans le tableau 1.

Tableau 1. Les principales applications du chitosane dans le secteur agro-alimentaire
(Collin et Crouzet 2011).

Secteur	Applications
Alimentaire	Additifs (liant, émulsifiant, épaississant), conservateur (antioxydant, antibactérien), emballages comestibles, etc...
Agricole	Enrobage de semence, éliciteurs, films biodégradables et fertilisants,

I.7.2. Secteur pharmaceutique et médical

Les caractéristiques particulières du chitosane (bactériostatique, immuno-modulatrice, anti-tumorale, cicatrisante, hémostatique et anticoagulante) lui confèrent une grande utilité dans le domaine pharmaceutique et médical.

Il trouve plusieurs applications en ophtalmologie (lentilles à base de chitosane), dans le traitement des brûlures (peau artificielle qui présente à la fois des propriétés de perméabilité et d'hydratation) la cicatrisation des plaies et en tant que revêtement d'objets mis en contact avec le tissus vivants (ex : prothèses vasculaires et valves cardiaques).

Le chitosane contribue également à la régénération des gencives défectueuses (crèmes dentaires) et sert à la fabrication des fils de suture et quelques produits chirurgicaux comme les pansements (Ben Dhiab, 2014). La possibilité qu'il a d'être modelé et travaillé (fibres, fils, gels, billes et membranes) est aussi une propriété remarquable convoitée par plusieurs industriels dans son application.

I.7.3. Secteur des cosmétiques

En cosmétique, une large gamme de produits est à base de chitine et de chitosane. Le

chitosane est aujourd'hui utilisé en formulations de shampoings, de crèmes hydratantes, de crèmes de soins pour la peau ou pour la souplesse des cheveux et en tant que tenseur du tégument cutané, voir comme adjuvant de cicatrisation. Il offre aussi des utilisations dans les soins bucco-dentaires (Collin et Crouzet 2011).

Ce polysaccharide est capable de former un film hydratant (propriété particulièrement convoitée par l'industrie des cosmétiques), facilitant ainsi l'interaction avec les téguments communs (couvertures cutanées) et les cheveux.

Le rôle potentiel du chitosane et ses dérivés en tant que composants de plusieurs produits cosmétiques a également été connu via leurs activités biologiques (l'activité antioxydante, antiallergique et photoprotectrice) (Bornet et Teissedre, 2005). Son innocuité liée à son origine naturelle permet d'éviter toute sorte d'effets secondaires.

I.7.4. Secteur de traitement des eaux

Le chitosane est une substance qui possède un fort potentiel dans le traitement des eaux en raison de sa nature biologique, de sa provenance (obtenu principalement à partir de déchets de l'industrie de la pêche), de sa non-toxicité, de son caractère polycationique qui le distingue des autres polysaccharides et polymères naturels, et de sa versatilité technologique. Une substance qui suscite en effet un intérêt croissant depuis les années 2000 pour récupérer et éliminer un spectre très large de contaminants présents dans les effluents industriels (Crini et al., 2019).

Le chitosane est souvent conditionné sous forme de billes de gels, de fibres ou de membranes jouant un rôle plus ou moins identique à celui des adsorbants conventionnels et résines commerciales. Le procédé de coagulation-floculation par ajout de chitosane est actuellement utilisé dans la moitié des cas de traitement des eaux usées au Japon, et selon une proportion variable dans certains autres pays asiatiques.

Chapitre 2

Les composés phénoliques

II.1. Qu'est-ce que les polyphénols ?

Les polyphénols sont une grande famille de molécules bioactives présentes dans les végétaux, issus du métabolisme secondaire de la plante au cours de son développement.

Ayant été dénommés « tanins végétaux » jusqu'à l'introduction du terme polyphénol en 1980, ces composés chimiques ont une fonction bien définie : défendre la plante contre les attaques de l'environnement (rayons UV, insectes nuisibles, champignons, parasites et autres agressions), contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

Aussi responsables du goût, de l'arôme, et de la couleur des végétaux, les polyphénols sont considérés comme d'excellents antioxydants naturels (Wu et al., 2006). En effet, cette propriété antioxydante leur confère de multiples bienfaits pour la santé ; ils seraient impliqués dans la prévention de plusieurs maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète, l'ostéoporose et plusieurs types de cancers (Singla et al., 2019). Ils bénéficient aujourd'hui d'une réputation grandissante puisqu'ils sont devenus en quelques années, les molécules préférées des nutritionnistes, des industriels de l'agroalimentaire et des laboratoires cosmétiques et pharmaceutiques. Au total, près de 10.000 molécules de polyphénols ont été identifiées à ce jour.

II.2. Structure chimique et principales classes de polyphénols

II.2.1. Structure chimique

D'un point de vue structural, l'élément fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un noyau aromatique à 6 carbones (cycle benzénique) (Fig.5), auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle (OH), libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Singla et al., 2019). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des molécules hautement complexes de plus de 30.000 Daltons, comme les tanins.



Figure 5. Structure d'un noyau phénol (Singla et al., 2019)

II.2.2. Principales classes de polyphénols

Les polyphénols ne constituent pas un groupe homogène de molécules. En effet, ceux-ci se divisent en plusieurs grandes familles selon l'origine, la fonction biologique ou la structure chimique. En utilisant la classification selon la structure chimique (c'est-à-dire, par rapport au nombre de noyaux aromatiques qu'ils contiennent et les éléments structuraux qui lient ces noyaux), les polyphénols, peuvent être divisés en plusieurs classes qui s'étendent de molécules simples (phénols simples) aux composés phénoliques complexes. La figure 6 illustre les principales classes de polyphénols (Singla et al., 2019).

- La première classe de polyphénols, comprend les acides phénoliques simples, divisée en deux groupes d'acides : les acides hydroxybenzoïques comme l'acide gallique et les acides

hydroxycinnamiques tels que les acides caféïque, férulique et coumarique ainsi que leurs esters phénoliques comme les acides chlorogénique ou rosmarinique (Fig. 6).

- La seconde classe regroupe la famille des flavonoïdes, dont la structure de base est en C6-C3-C6. Elle renferme plusieurs milliers de molécules réparties en plus de dix groupes (Flavones, Flavonols, Flavanols, Isoflavones....) (Fig. 6).

- Les troisième et quatrième classe de polyphénols comporte les stilbènes et les lignanes (Singla et al. 2019) (Fig. 6).

II.2.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils confèrent aux différents fruits et légumes des propriétés uniques de goût, de saveur ainsi que des usages bénéfiques pour la santé (Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011).

Sur le plan structural, ils décrivent un cycle phénol, qui possède au moins une fonction carboxylique. Les acides phénoliques sont représentés par deux sous-classes : les acides hydroxybenzoïques, dérivés de l'acide benzoïque avec un squelette de base de type C6-C1 et les acides hydroxycinnamiques, qui, plus abondants, présentent un squelette carboné de type C6-C3 (Saibabu et al., 2015).

Bien que le squelette de base reste le même, le nombre et la position des groupes hydroxyles sur le cycle aromatique créent la variété (Robbins et Rebecca, 2003). Parmi les acides hydroxybenzoïques les plus connus, on trouve : l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique.

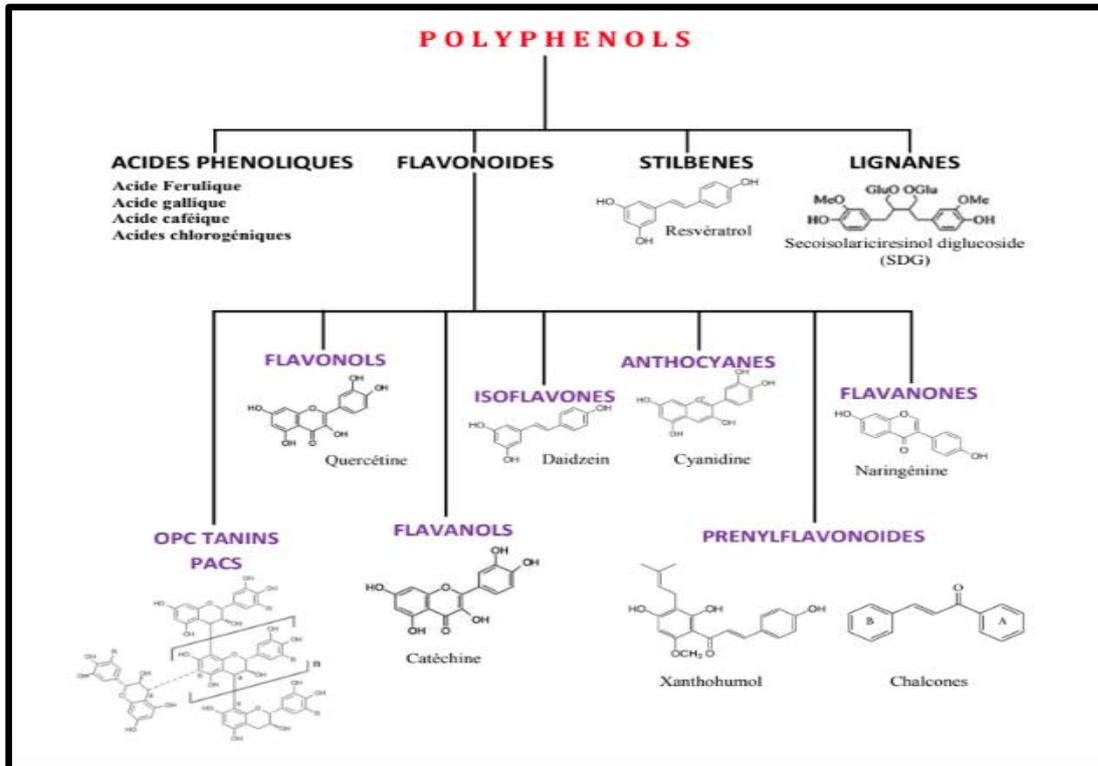


Figure 6. Principales classes de polyphénols (Singla et al., 2019).

Les plus abondants des dérivés de l'acide cinnamiques sont l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique. Les acides phénoliques sont présents sous forme liée à partir d'amides, d'esters ou de glycosides et rarement sous forme libre. La figure 7 présente la classification structurale des acides phénoliques naturels discutée dans ce paragraphe.

II.2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols (avec plus de 5000 composés différents identifiés). Ils sont formés d'un squelette de base à 15 atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane (Singla et al., 2019) (Fig. 8).

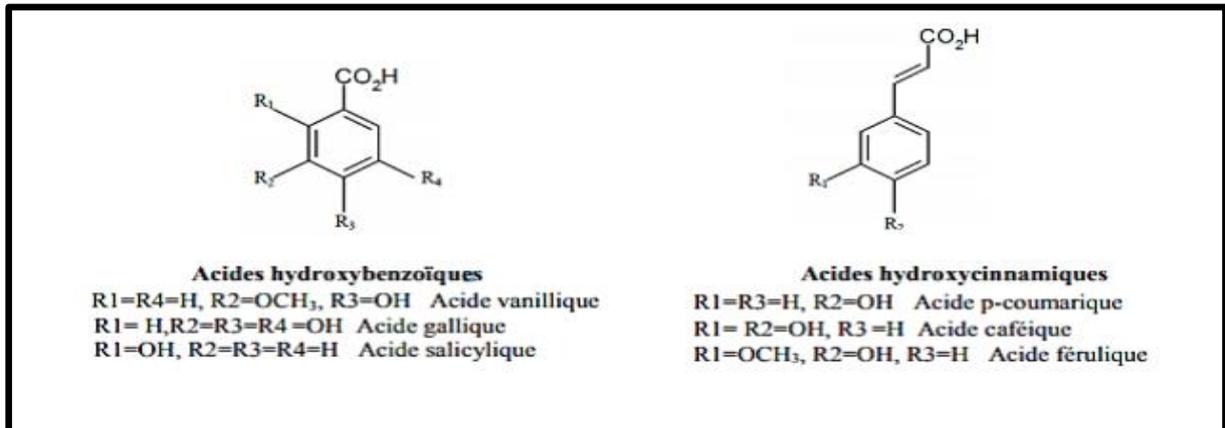


Figure 7. Structure chimique de quelques acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Singla et al., 2019)

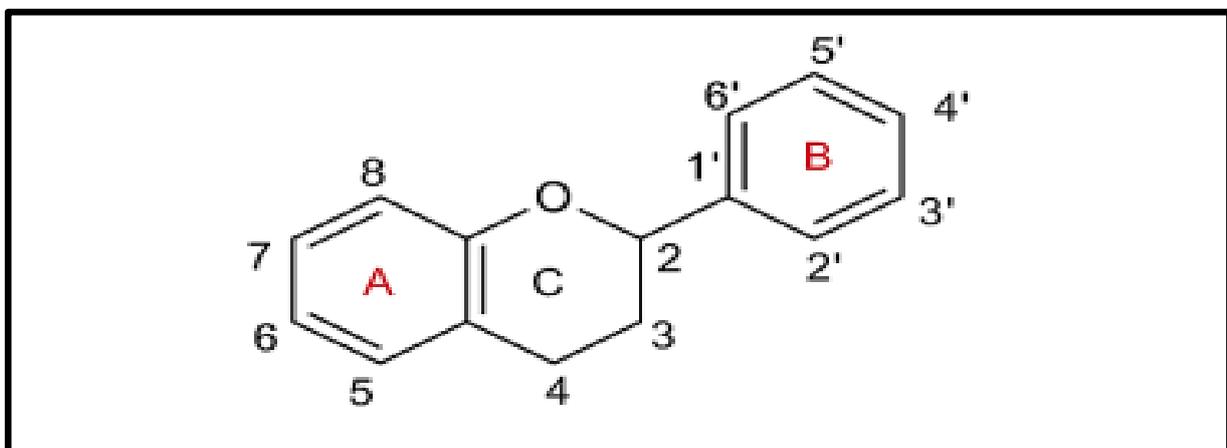


Figure 8. Squelette de base des flavonoïdes (Singla et al., 2019).

Contenus dans le thé, le vin et dans de nombreux fruits et légumes, les flavonoïdes sont considérés comme de remarquables antioxydants. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Causse, 2005).

Répartis en plusieurs classes, les plus importants groupes de flavonoïdes sont les Flavones, les Flavonols, les Flavanones, les Flavanols (ou catéchines), les Isoflavones et les Anthocyanosides (Bruneton, 2009) (Fig. 9).

C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle central correspond aux anthocyanidines, toujours présentes en milieu acide sous forme d'un cation de couleur rouge.

En revanche, dans le cas des flavanes comme la catéchine, le cycle est très fortement réduit. On trouve des situations intermédiaires chez les flavonones, les flavones et les flavonols. Exceptionnellement, le noyau central de la molécule peut ne pas être totalement cyclisé (comme chez les chalcones et molécules voisines) ou se présenter sous forme d'un cycle n'ayant que 5 sommets (comme dans le cas des aures) (Shen et al., 2022).

À l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base portent principalement sur trois points :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles ;
- Le niveau de méthylation (groupement O-CH₃ à la place des seules fonctions phénoliques) ;

- Le niveau de glycosylation (en dehors de quelques exceptions).

II.2.2.3. Les stilbènes

Ces composés phénoliques sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures. Ils sont produits en réponse à un stress biotique, dû à une attaque par des microorganismes pathogènes, ou abiotique en présence de métaux lourds toxiques et détergents.

La structure chimique de base des stilbènes comme l'illustre la figure 10, est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène. Les deux formes isomères des stilbènes (cis et trans) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes et des inter-conversions trans/cis sont observées en présence de chaleur ou de rayonnements UV (Collin et Crouzet, 2011).

Le stilbène le plus étudié, est le resvératrol et ce grâce à ses propriétés anticancéreuses et activités biologiques contre plusieurs maladies chroniques, en particulier contre les maladies neurodégénératives. Il a également été montré que les autres stilbènes pourraient avoir un effet bénéfique sur la santé (Richard et al., 2014). Parmi les sources principales de stilbènes, on trouve le raisin, le vin, les fruits rouges, le soja et les arachides.

II.2.2.4. Les lignanes

Les lignanes sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs et non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes.

Leur appartenance aux métabolites secondaires ainsi que les caractéristiques toxiques, antifongiques et antibactériennes de certains lignanes font émettre l'hypothèse de leur implication dans les défenses chimiques des plantes contre les herbivores (Selosse, 2019).

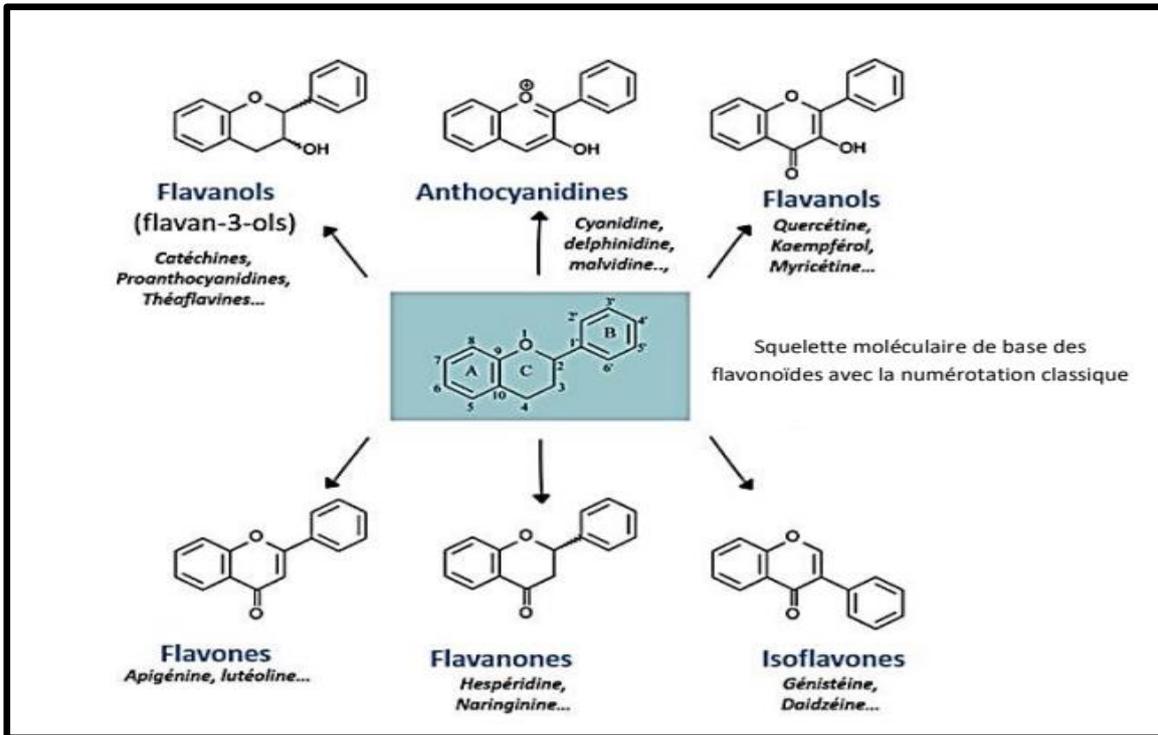


Figure 9. Structure générale des principales classes de flavonoïdes (des exemples ont été donnés pour chacune des classes) (Shen et al., 2022).

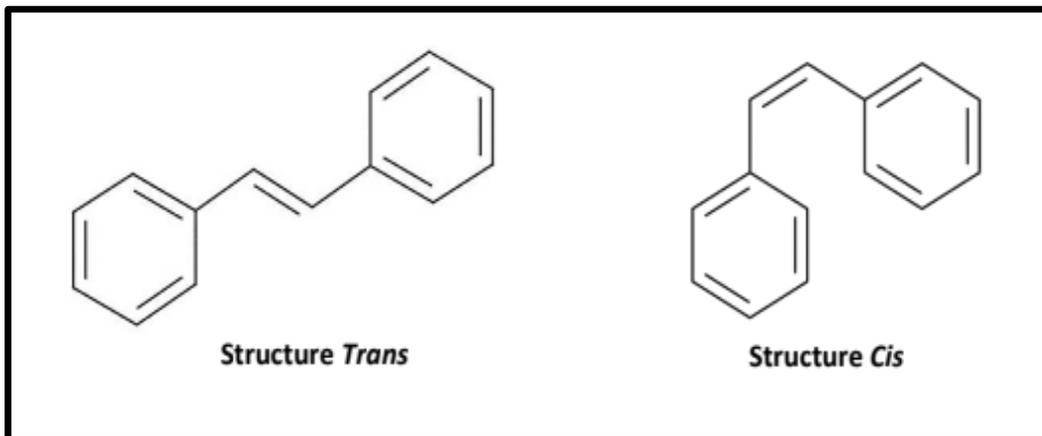


Figure 10. Structure chimique de base des stilbènes (forme trans et cis) (Collin and Crouzet, 2011).

Pour l'homme, ils sont considérés comme des phyto-œstrogènes, offrant une protection face à l'apparition et au développement de certains cancers hormono-dépendants (sein et prostate). Les études menées *in vitro* sur des modèles cellulaires de mammifères tendent à confirmer les effets bénéfiques observés lors d'études épidémiologiques et apportent des éclairages sur leurs mécanismes d'action (Lamblin et al., 2008).

D'un point de vue structural, les lignanes répondent à une représentation de type dimérique (de phénylpropanoïdes (C6-C3)₂) dans lesquels les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) de chaque chaîne propyle (Fig. 11). La présence de carbones asymétriques chez les lignanes est à l'origine des différents mésomères rencontrés selon les végétaux (Lamblin et al., 2008).

II.2.2.5. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe de lactones largement répandues dans la nature. Elles sont présumées être produites par les plantes comme moyen de défense chimique pour décourager la prédation (Matos et al., 2015).

Portant une ossature typique des benzopyrones comme illustré dans la figure 12, les coumarines sont issues de la formation d'un cycle fermé à partir de l'acide hydroxycinnamique (Hopkins, 2003).

La simplicité et la polyvalence des échafaudages coumariniques en font un point de départ pour une large gamme d'applications. Aujourd'hui il existe des coumarines parfums, des coumarines en cosmétiques et d'autres coumarines utilisées comme additifs industriels. Certains de leurs dérivés sont aussi utilisés comme exhausteurs d'arôme dans différentes sortes de tabacs et certaines boissons alcoolisées (Matos et al., 2015). L'odeur douceâtre du foin fraîchement coupé est une caractéristique attribuée aux coumarines (Hopkins, 2003).

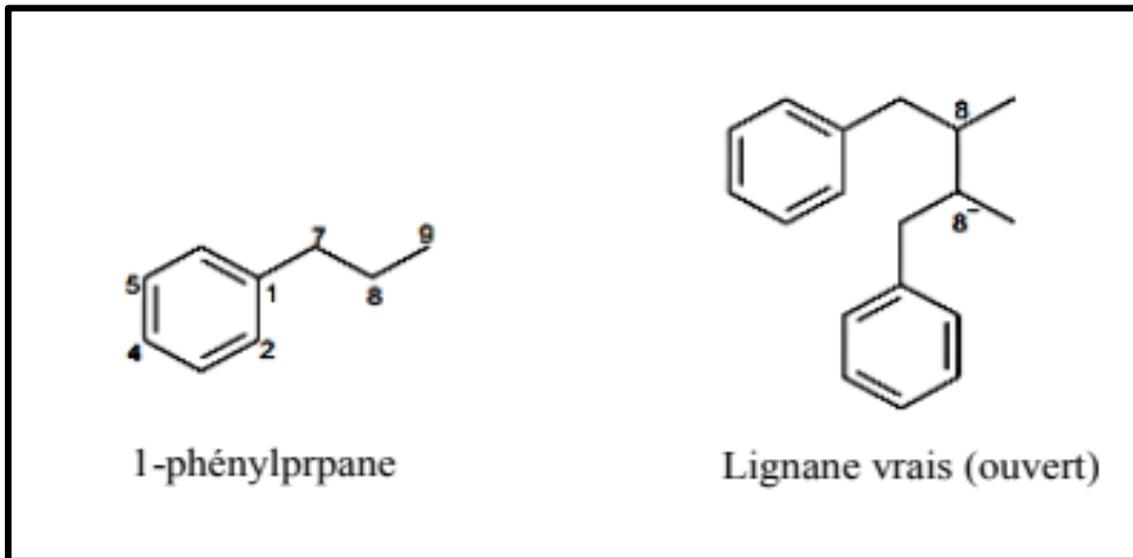


Figure 11. Structure chimique de base des lignanes (Lamblin et al., 2008).

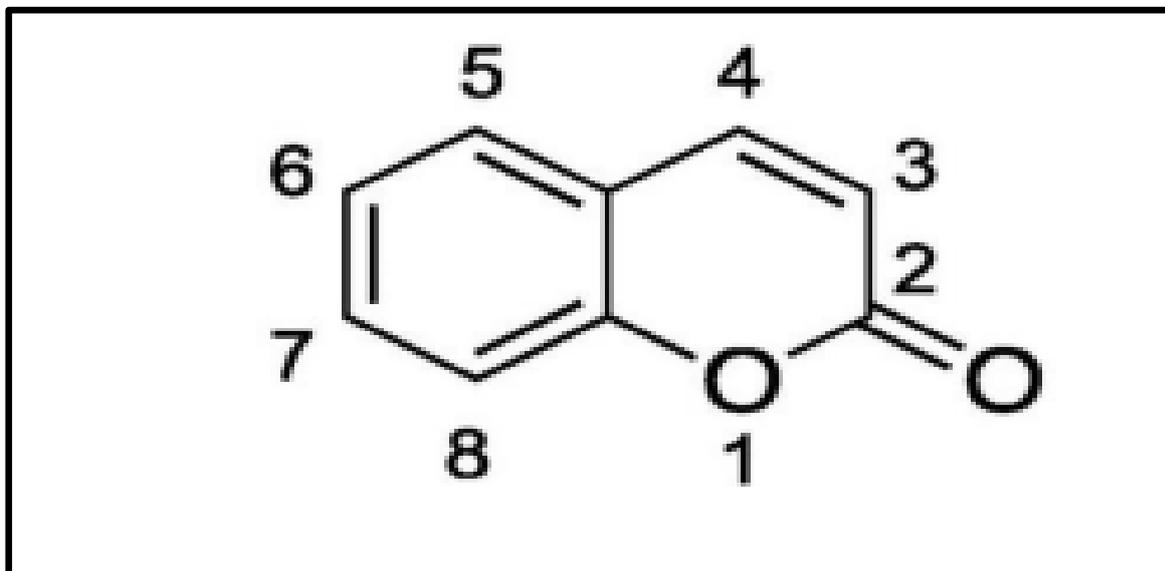


Figure 12. Structure chimique de la coumarine (Hopkins, 2003).

II.2.2.6. Les tanins

Les tanins représentent une classe importante de polyphénols utilisés principalement par l'homme pour tanner la peau et la rendre imputrescible par la création de liaisons (propriétés de combinaison) entre ces molécules et les fibres de collagène contenues dans la peau.

Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont localisés dans toutes les parties de la plante, à savoir l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes sont le vin et le thé.

Sur le plan structural, les molécules de tanins présentent de nombreuses fonctions (hydroxyles et phénoliques) qui vont leur permettre de se complexer avec de nombreuses macromolécules telles que les protéines, et pouvoir chélater les ions tels que le fer et le cuivre (Macheix et al., 2005).

Leur structure complexe est formée d'unités monomériques répétitives qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation. La variabilité structurale des tanins permet de les diviser en deux grands groupes : les tanins hydrolysables, qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique et les tanins condensés, non hydrolysables, qui rougissent par oxydation et donnent du pyrocatechol (Fig. 13).

La figure 14, présente une forme simple de tanins hydrolysables, le pentagalloylglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes comme la castalagine chez le châtaignier (Macheix et al., 2005).

• Les tanins condensés

Appelés aussi tanins catéchiques ou proanthocyanidines, ces molécules, et contrairement aux tanins hydrolysables, sont résistantes à l'hydrolyse (seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader) et ne possèdent aucun sucre dans leur structure.

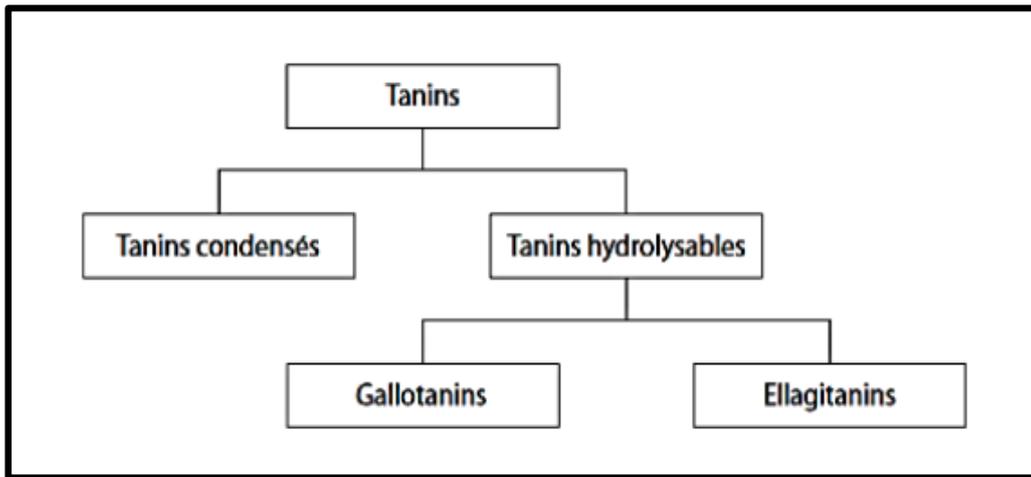


Figure 13. Classification des tanins (Brillouet et al., 2013).

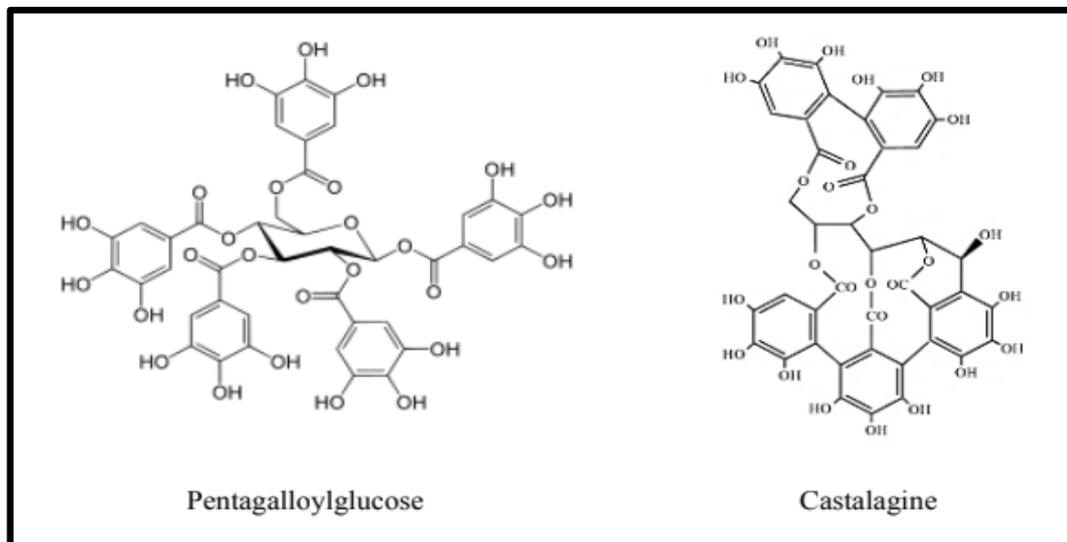


Figure 14. Deux exemples de tanins hydrolysables (Macheix et al., 2005).

Ils sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées, situées sous l'épiderme des feuilles et des tiges de quelques plantes herbacées, de certaines légumineuses et arbustives, ils dévoilent une forte affinité pour les protéines. Une caractéristique importante dans la mesure où elle protège les protéines de la dégradation dans le rumen et où elle éviterait la formation des mousses impliquées dans la météorisation (Jarrige et al., 1995).

Sur le plan structural, ces molécules à noyau flavone sont considérées comme des dimères, des oligomères ou des polymères par addition successives d'unités flavanols. Les proanthocyanidols dimériques les plus simples sont les procyanidols. La figure 15, présente deux structures chimiques des proanthocyanidols dimériques de type B (Tong et al., 2022). L'enchaînement des différentes unités constitutives des tanins se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C, soit par des ramifications grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes qui restent cependant solubles dans l'eau des vacuoles.

II.3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

II.3.1. La solubilité

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique qui varie de composés simples à fortement polymérisés (Mahmoudi et al., 2013). La possibilité de former des liaisons hydrogènes suggère que les phénols non substitués devraient avoir une bonne solubilité dans l'eau, alors que ses dérivés substitués ne le sont pas. Les groupes alkyles et halogènes améliorent le caractère hydrophobe du cycle aromatique, entraînant une diminution de la solubilité dans l'eau.

Pour les phénols possédant des groupes fonctionnels à fort caractère polaire, les différences d'aptitude à la dissolution sont plus prononcées (même pour les isomères d'un

même composé) (Sobiesiak, 2017). Pour la plupart des polyphénols, la solubilité ne dépasse pas les 30 g/L. Cette dernière est aussi affectée par la polarité du solvant utilisé dans le processus d'extraction (Mahmoudi et al., 2013).

II.3.2. Le point d'ébullition

Les composés phénoliques ont généralement des points d'ébullition plus élevés par rapport à d'autres hydrocarbures avec des masses moléculaires égales. Cela est dû à la présence de liaisons hydrogènes intermoléculaires entre les groupes hydroxyles des molécules de phénols. Le point d'ébullition des phénols augmente en général avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone (Galland, 2010).

II.3.3. L'acidité

Les valeurs d'acidité (pKa) de la plupart des polyphénols sont comprises entre 8 et 10 ; ce qui signifie que ce sont des acides plus forts que l'eau (pKa de l'eau 15,7) mais plus faibles que l'acide carbonique (pKa de 6,4). L'acidité du phénol est le résultat de la délocalisation de la charge négative dans le cycle aromatique et de l'effet de résonance.

Dans le cas des phénols substitués, l'acidité diminue si un groupe électrodonneur est attaché au cycle, tandis que l'acidité augmente dans le cas d'un groupe électroattracteur (Pezzola et al., 2022).

II.3.4. Le pouvoir réducteur :

Les phénols sont des composés réducteurs ; ce qui signifie qu'ils ont une bonne aptitude à céder un électron. Dans le cas de la fonction phénol, la perte d'un électron est immédiatement suivie de la perte d'un proton pour conduire à la formation d'un radical aryloxy (Fig. 16-A). Ce dernier est stabilisé par la possibilité de délocalisation de l'électron

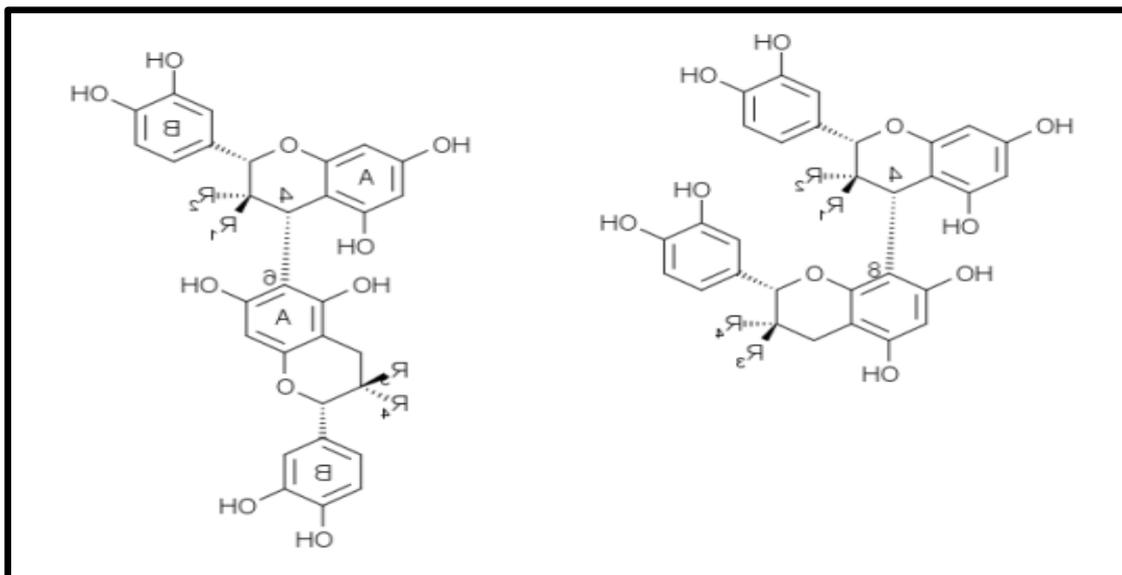


Figure 15. Structure chimique des proanthocyanidols dimériques de type B (Tong et al., 2002).

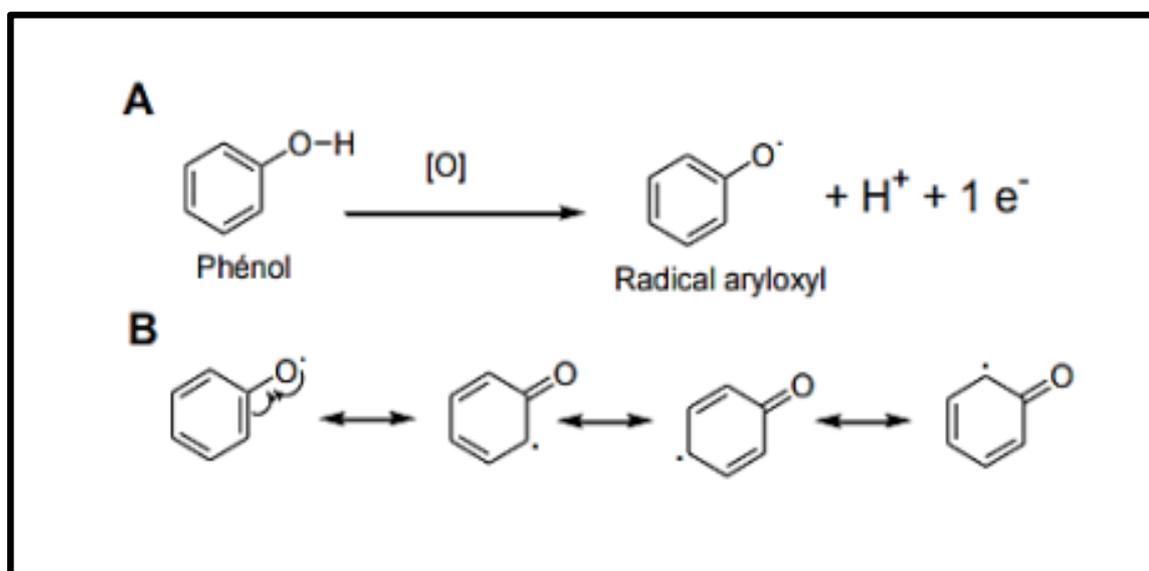


Figure 16. Formation du radical aryloxyl suite à l'oxydation du phénol (A) et stabilisation de ce radical par ses formes mésomères (B) (Cai et al., 2004).

libre sur plusieurs autres sites du noyau aromatique (Fig. 16- B). Même si d'autres mécanismes existent, cette propriété est largement responsable du caractère antioxydant des polyphénols car le faible potentiel rédox du couple phénol/radical aryloxy permet des réactions rapides avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que les radicaux oxyl (RO.) et peroxy (ROO.) (Cai et al., 2004).

II.4. Voies de biosynthèse des composés phénoliques

II.4.1. Voie de l'acide shikimique

La voie du shikimate, constitue le point de départ de la plupart des polyphénols végétaux. C'est une voie qui lie le métabolisme des hydrates de carbone à la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Zagoskina et al., 2023) et assure la synthèse des acides aminés aromatiques : tyrosine, tryptophane et phénylalanine, essentiels à la synthèse protéique, et précurseurs des voies de biosynthèse de nombreux métabolites secondaires indoliques chez les plantes (Hu et al., 2022).

La majeure partie des composés aromatiques, constitués de phénylpropanoïdes dérivent de la phénylalanine, qui par désamination par une enzyme clé (la phénylalanine ammonia-lyase (PAL)), conduit à la formation de l'acide cinnamique, carrefour métabolique intermédiaire entre le métabolisme primaire et secondaire et précurseur direct des phénols (Fig. 17) (Gravot, 2009).

II.4.2. Voie de l'acide malonique

Principale voie de biosynthèse des produits phénoliques chez les champignons et les bactéries, elle conduit à la formation de certaines quinones végétales et diverses phénylpropanoïdes à chaîne latérale allongée (Romani et al., 2014).

Présentant des similitudes avec la synthèse des acides gras, elle consiste en la cyclisation

des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation de groupements acétates. C'est une voie qui impliquerait l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA en tant qu'intermédiaires dans les étapes cruciales de biosynthèse (Fig.18) (Zagoskina et al., 2023).

II.5. Activités biologiques des polyphénols

II.5.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est l'une des propriétés les plus appréciées des polyphénols qui agissent sur les radicaux libres et, ainsi, permettent de lutter naturellement contre l'oxydation des cellules et ralentir ainsi le vieillissement et la mort cellulaire. Les radicaux libres, définis comme étant des atomes déséquilibrés, sont des substances inévitables à l'organisme mais qui restent inoffensives tant qu'ils sont en faible quantité.

Cependant, quand ces substances se trouvent en excès, il se crée un stress oxydatif (qui se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les capacités cellulaires antioxydantes) qui peut être à l'origine de plusieurs maladies dégénératives et serait par la suite impliqué dans plusieurs maladies chroniques : cardiovasculaires, inflammatoires et carcinogènes.

L'introduction de polyphénols aux propriétés anti-radicalaires, permettent de lutter contre la formation de radicaux libres en excès dans l'organisme par plusieurs mécanismes d'action dont :

- Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), interrompant ainsi la cascade des réactions conduisant à la peroxydation des lipides ;
- La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans leur production ;
- La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (individuellement ou par action synergique avec d'autres antioxydants) (Rudrapal et al., 2022).

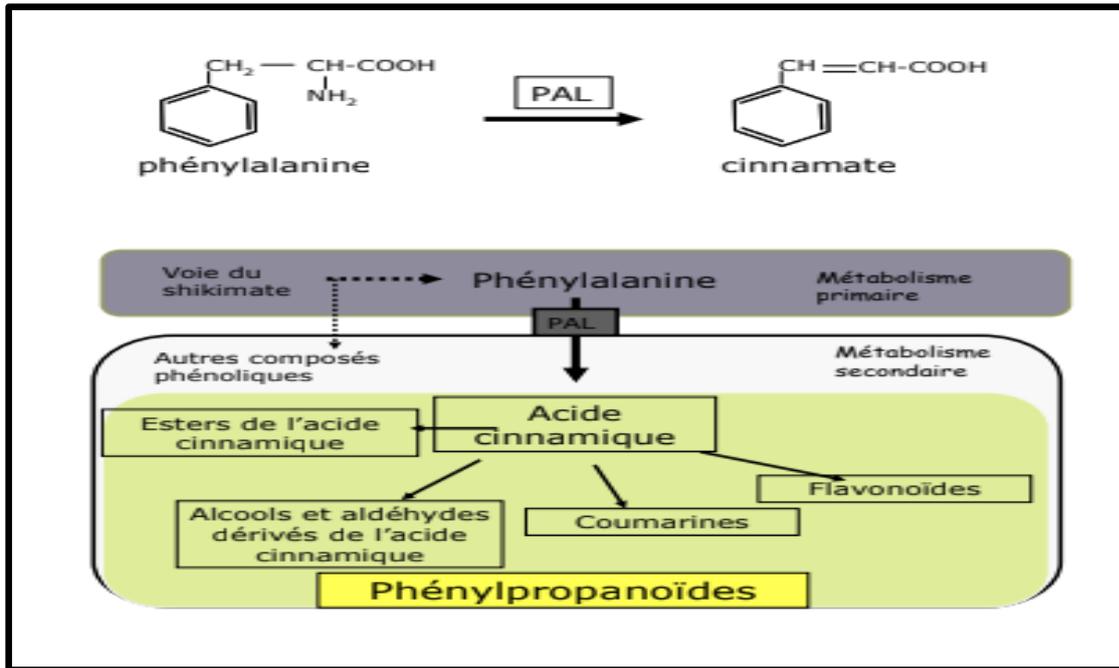


Figure 17. Quelques composés phénoliques issus des voies générales de phénylpropanoïdes et de shikimate (Gravot, 2009).

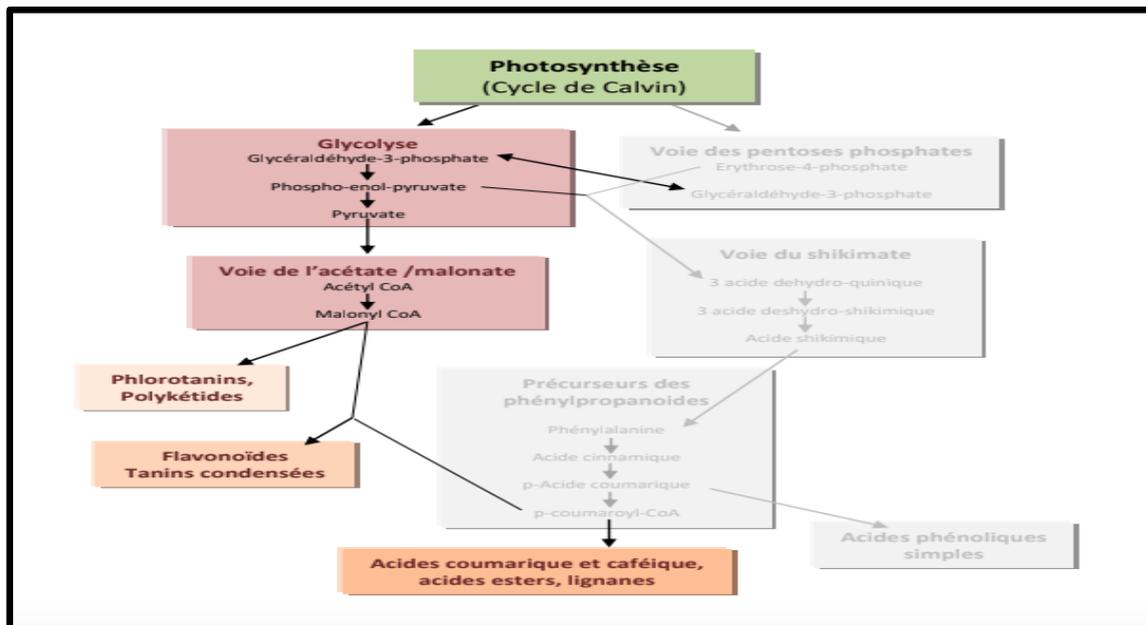


Figure 18. Voie de l'acide malonique responsable de la synthèse de quelques métabolites secondaires (Zagoskina et al., 2023).

Il faut noter que certains composés phénoliques expriment un potentiel pro-oxydant qui ne doit pas être négligé.

Outre les propriétés antioxydantes, de nombreux polyphénols (en particulier les flavonols et les tanins), ont aussi montré une activité antimicrobienne potentielle contre plusieurs agents pathogènes (Ferrazzano et al., 2011).

Par divers mécanismes d'action, ces composés peuvent interférer avec la physiologie des bactéries par intercalation dans la membrane et pénétration jusqu'au cytoplasme ou par perturbation du métabolisme influençant ainsi les propriétés colonisatrices des germes pathogènes (Coppo et Marchese, 2014).

En s'intercalant dans la membrane, les composés phénoliques interfèrent avec les fonctions membranaires et suppriment certains facteurs de virulence, notamment les enzymes, les toxines et les récepteurs de signaux responsables de la formation des biofilms bactériens (Calixto et Perez-Jiménez, 2018).

En atteignant le cytoplasme, ils peuvent agir comme des acides en acidifiant le milieu interne des cellules. Cette acidification du cytoplasme entraîne une altération des fonctions enzymatiques et/ou des molécules structurales ainsi qu'une perte d'énergie nécessaire à l'efflux des protons (Chen et al., 2024).

Pour d'autres polyphénols, un autre mécanisme d'action antimicrobien a été rapporté. Il s'agit de la perturbation du métabolisme par l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques accompagnée le plus souvent d'une dégradation de l'ADN ou par l'inhibition du métabolisme énergétique causé par le blocage de l'enzyme NADH Cytochrome-C-réductase ou de l'ATP synthétase (Chen et al., 2024). Certains polyphénols ont également démontré un effet synergique avec certains antibiotiques comme les catéchines qui modulent la résistance de certaines souches multi-résistantes comme *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* aux β -lactamines (Coppo et Marchese, 2014).

II.5.3. Activité antivirale

Les flavonoïdes sont l'une des principales classes de polyphénols ayant une activité antivirale importante comme la quercétine, le kaempférol et la rutine. Il a été constaté que les flavonols sont plus actifs que les flavones contre le virus de l'herpès simplex de type 1 et le virus VIH. Une synergie a également été rapportée entre les flavonoïdes et d'autres agents antiviraux (Kamboj et al., 2012).

La Quercétine, par exemple, potentialise les effets de la 5-éthyl-2'-dioxuridine (EUdR) et de l'acyclovir (médicaments antiviraux) contre l'infection par le HSV (virus de l'herpès) et la pseudorange (aussi appelée maladie d'Aujeszky, responsable d'une affection neurologique et respiratoire chez les porcs) (Pol et Le potier, 2011). L'apigénine (un autre flavonoïde) renforce également l'activité antivirale de l'acyclovir contre ces virus (Kamboj et al., 2012).

Le tableau 2 énumère quelques-uns de ces composés phénoliques à activité antivirale (dont l'acide gallique, ellagique et catéchique) agissant sur quelques types de virus bien définis.

II.5.4. Activité anti-inflammatoire

Les données actuelles soutiennent l'idée que différents polyphénols peuvent exercer des effets anti-inflammatoires par des activités de piégeage des radicaux, la régulation des activités cellulaires dans les cellules inflammatoires et la modulation des voies de signalisation et des événements transcriptionnels impliqués dans le processus d'inflammation (inhibition d'enzymes associées à des propriétés pro-inflammatoires) (Bucciantini et al., 2021).

Des preuves solides provenant d'expériences avec des composés phytochimiques naturels se sont avérés moduler différents médiateurs inflammatoires tels que les métabolites dérivés de l'acide arachidonique, divers peptides, acides aminés excitateurs et cytokines (Hussain et al., 2016).

À cet effet, les polyphénols en tant qu'aliments fonctionnels démontrés pour atténuer et inverser la production de fractions pro-inflammatoires impliquées dans la progression de plusieurs maladies, attirent de plus en plus l'attention et sont proposés aujourd'hui comme un outil qui offre des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques avec moins d'effets secondaires (Collin and Crouzet, 2011).

II.6. Domaines d'application des polyphénols

II.6.1. L'agroalimentaire

Par leurs propriétés antiseptique, antioxydante, antibactérienne et antifongique, les polyphénols peuvent avoir une incidence sur la conservation des aliments dont l'état de conservation doit être le plus parfait possible tout au long de leur cycle de vie.

Tableau 2. Composés phénoliques à activité antivirale (Kamboj et al., 2012).

N°	Types de virus	Composés phénoliques antiviraux
1	Virus de la rage	Quercétine, rutine
2	Virus de la para-grippe	Quercétine, rutine
3	Virus de l'herpès type – 1	Galangine, quercétine, kaempférol, apigénine, chrysine
4	Virus de la pomme de terre	Quercétine, rutine, morine
5	Virus de la grippe	Quercétine, rutine
6	Virus de l'herpès type – 2	Quercétine, chrysine
7	Virus de la respiration	Quercétine, Naringine
8	Virus de l'immunodéficience	Apigénine, acide caféique
9	Virus azesky	Quercétine, morine, apigénine, Lutéoline
10	Virus de la polio	Quercétine
11	Virus de la mangue	Quercétine
12	Virus de la pseudorange	Quercétine
13	Virus de la dengue	Acide ellagique, rutine, quercétine
14	Cytomégalovirus humain	Kaempférol, chrysine
15	Virus Coxsachie B	Galangine, Kaempférol, chrysine
16	Virus de l'hépatite A et B	Acide ellagique
17	Virus de la diarrhée épidémique porcine	Quercétine – 7 – rhamnoside
18	Rotavirus	Kaempférol, chrysine
19	Coronavirus	Kaempférol, chrysine
20	Virus Sindbis	Catéchine

Les nombreuses applications expérimentales des composés phénoliques en industrie alimentaire ont démontré qu'ils sont bien adaptés pour être utilisés comme conservateurs, procurant ainsi un effet protecteur contre la détérioration de l'aliment. Ils pourraient constituer une alternative valable par rapport aux additifs alimentaires synthétiques (Martillanes et al., 2017).

L'emballage bioactif est une autre stratégie innovante où les composés phénoliques peuvent jouer un rôle important pour améliorer l'évaluation globale et prolonger la durée de conservation des produits commerciaux. Ces emballages issus des films bioactifs respectueux de l'environnement, peuvent remplacer ceux en plastique dérivés du pétrole (Kaewprachu et al., 2018).

Également liés à la fourniture de différents saveurs et couleurs aux divers produits alimentaires, les polyphénols apparaissent aussi comme un choix parfait en tant que colorant naturel par rapport aux colorants synthétiques précédemment utilisés. Ils se sont vus récemment inclus dans la classe des prébiotiques en raison de leur capacité d'interagir avec la flore intestinale de l'hôte (De Araujo et al., 2021).

II.6.2. Le cosmétique

Les effets bénéfiques des polyphénols en tant qu'ingrédients fonctionnels ont suscité une attention considérable chez les industriels du cosmétique ces dernières années. En conséquence, de nombreux produits de soin de la peau (dits cosméceutiques) ont été développés à base d'extraits végétaux enrichis en polyphénols (Zillich et al., 2015).

Souvent considérés comme des molécules anti-âges, les polyphénols ont prouvé leur efficacité grâce à leurs effets antioxydant, anti-inflammatoire et antimicrobien. Ajoutés à ces propriétés, ils présentent également un large éventail de propriétés cyto-protectrices, diminuant l'influence des rayons UV et la pollution des parois capillaires.

Leur utilisation potentielle comme inhibiteurs du vieillissement ou même de la carcinogénèse cutanée dans des nouvelles formules dermo-cosmétiques, est aujourd'hui envisagée dans certaines crèmes et autres produits de soins (Szewczyk et Zgórk, 2019).

II.6.3. L'industrie pharmaceutique

Vue l'efficacité prouvée des polyphénols dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et certains cancers, plusieurs brevets et publications ont revendiqué leur utilisation dans des formulations pharmaceutiques et en phytothérapie (Hennebelle et al., 2004).

Principe actif de nombreux médicaments, ils sont utilisés par les industriels comme protecteur vasculaire ou pour lutter contre les radicaux libres liés au phénomène d'oxydation (Vercauteren et al., 1998). On les trouve aussi sous forme d'hydrogels pour la libération contrôlée de médicaments ou de nutraceutiques (De Araujo et al., 2021).

Chapitre III

Matériels et Méthodes

III.1. Matériels

III.1.1. Matériel végétal

III.1.1.1. Le cœur d'artichaut

L'espèce végétale étudiée est *Cynara scolymus L.*, une plante potagère appartenant à la famille des Astéracées. Elle a été récoltée en mars 2020 dans la commune d'Ouled-Maalah (36° 00' 25" Nord, 0° 35' 31" Est) (wilaya de Mostaganem). Seules les capitules ont été récoltés.

Une fois la récolte terminée, la partie comestible (le réceptacle) a été séparée des feuilles, des bractées externes et des tiges, qui ont ensuite été éliminées. Le cœur d'artichaut est la partie de la plante qui a fait l'objet de cette étude.

Les cœurs d'artichaut ont été triés et séchés à l'air libre devant une source de chaleur, dans un endroit sec et ventilé, pendant trois jours pour diminuer l'activité de l'eau et ainsi empêcher le développement des micro-organismes.

La matière séchée a été broyée à l'aide d'un moulin à café électrique pour obtenir une poudre très fine facilitant son utilisation. Après broyage, la poudre a été soigneusement conservée dans des pots en verre hermétiquement fermés, à température ambiante, à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière afin de préserver ses qualités.

III.1.1.2. Les gousses de caroube

Les gousses de caroube (*Ceratonia siliqua L.*) utilisées dans notre expérimentation ont été collectées dans la région de Chlef (36° 10' Nord, 1° 20' Est) en mois de janvier 2021. Après avoir été séchées, les gousses ont été concassées pour séparer les graines de la pulpe. La pulpe a subi par la suite un broyage à l'aide d'un broyeur électrique, tamisée à travers un tamis fin pour obtenir une poudre très fine. Cette dernière a été conservée dans des bocaux en verre dans un endroit sec.

III.1.2. Matière animale, souches bactériennes et rats expérimentaux

III.1.2.1. Carapaces de crevette

C'est à partir de 8 Kg de déchets de poissons récupérés au niveau de plusieurs

restaurants de la pêcherie de la ville de Mostaganem que l'on a trié 1 Kg de carapaces de crevette.

III.1.2.2. Les souches bactériennes

Huit souches de bactéries pathogènes de référence appartenant à la collection américaine ATCC (American Type Culture Collection) et aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie du département des sciences pharmaceutiques de Messine en Italie ont été utilisées dans notre expérimentation. Il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermis* (ATCC 49139), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311), *Carnobacterium sp* (ATCC 20730). Une neuvième souche pathogène, *Shigella sp*, isolée dans notre laboratoire a également été retenue dans cette expérience.

Deux autres souches bénéfiques, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (Bb12) provenant de l'unité Mixte de recherches UMR 910 de l'institut MICALIS Jouy-en-Josas (France), et *Lactobacillus plantarum*, isolée dans notre laboratoire ont également fait l'objet de cette expérience.

III.1.2.3. Les rats expérimentaux

Les rats utilisés dans cette expérience sont de la souche "Wistar" âgés de 7 semaines et pesant 150 à 200g et nous ont été fournis par l'institut Pasteur d'Alger. Ils sont gardés dans des cages en plastique de 55cm de longueur, 33 cm de largeur et 19 cm de hauteur placées dans une pièce correctement aérée, à température contrôlée (25 ± 1 °C) et sous un cycle nyctéméral de 12h et une humidité relative de $55 \pm 10\%$. Les rats sont nourris ad libitum avec de l'aliment granulé standard fourni par la société de fabrication d'aliments pour animaux d'expérience (Bouzzareah, Alger). Ils ont reçu l'eau à volonté et ont été maintenus pendant une semaine en adaptation avant le démarrage de l'expérience.

III.2. Méthodes

III.2.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de cœur d'artichaut et de la pulpe de gousse de caroube

III.2.1.1. Dosage de la cellulose brute

La méthode de Weende a été utilisée pour mesurer la teneur de cellulose brute (CB). Pour ce faire, 1g de poudre de végétal a subi deux hydrolyses successives à chaud pendant 30 min chacune. La première hydrolyse a été réalisée avec de l'acide sulfurique (H₂SO₄) 0.26N, tandis que la seconde a été effectuée avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) 0.23N. Après l'hydrolyse, les échantillons sont étuvés à 105°C, puis calcinés à 550°C dans un four à moufle.

Le taux de cellulose brute (CB en %) est calculé par la formule suivante :

$$CB (\%) = \left[\frac{Pse - Psf}{pe \times Ms} \right] \times 100$$

Avec CB : Cellulose brute exprimée en % par rapport à la matière sèche.

Ms : Matière sèche exprimée en %

Pse : Poids de l'échantillon à la sortie de l'étuve en g.

Psf : poids de l'échantillon à la sortie du four à moufle en g.

Pe : poids de la prise d'essai en g.

III.2.1.2. Détermination de la teneur en cendres

Pour déterminer le taux de cendres, 2 g d'échantillon sont placés dans des creusets en porcelaine, puis incinérés dans un four à moufle à une température de 550 °C pendant 5h, jusqu'à ce que l'échantillon prenne une couleur gris clair ou blanchâtre. Ensuite, les creusets sont refroidis dans un dessiccateur et leur poids final est mesuré. Le taux de cendres est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux des cendres (\%)} = (M1 - M2) / P \times 100$$

M1 : Masse (en g) du creuset et la matière sèche avant l'incinération.

M2 : Masse (en g) du creuset avec les cendres.

P : La masse (en g) de la prise d'essai.

III.2.1.3. Dosage des protéines

La méthode de Kjeldhal a été utilisée pour déterminer la teneur en protéines. Cette méthode comporte trois étapes :

Étape 1 : Digestion de l'échantillon (1 g dans notre expérimentation)

Lors de la digestion, la matière organique subit une oxydation dans l'acide sulfurique concentré à haute température, en présence d'un catalyseur (le sélénium), ce qui conduit à la transformation de l'azote protéique en azote ammoniacal.

L'acide sulfurique permet d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniac NH_3 , mais il est également utilisé pour piéger l'ammoniac gazeux sous forme de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ce processus s'effectue par réaction de la base avec l'acide. L'ajout de sélénium a pour objectif d'abaisser le point d'ébullition de la solution, ce qui accélère la réaction de minéralisation de la matière organique.

Étape 2 : Distillation de l'ammoniac

Pour distiller l'ammoniac (NH_3) avec de la vapeur d'eau, il est nécessaire de la déplacer de sa forme sel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en ajoutant une solution concentrée de soude NaOH en excès. Ensuite, l'ammoniac est distillé avec de la vapeur d'eau et piégé dans une solution d'acide borique, où il réagit pour former des sels de borate d'ammonium.

Étape 3 : Titrage de l'ammoniac

Les sels de borate d'ammonium obtenus sont par la suite titrés directement en utilisant une solution standardisée d'acide sulfurique 0.1N en présence de l'un indicateur coloré de Tashiro. On procède ensuite à la préparation d'un blanc en utilisant tous les réactifs, à l'exception de l'échantillon.

Expression des résultats

L'azote total est calculé comme suit : $N (\%) = (T - B) \times N \times 1,401$

Avec : T : mL d'échantillon titré, B : mL d'échantillon titré à blanc, N : normalité de l'acide.

$$\text{Taux de protéines} = N \times 6,25$$

III.2.1.4. Dosage de la matière grasse

La méthode d'extraction semi-continue à chaud des lipides consiste à utiliser l'appareil Soxhlet en utilisant de l'hexane (AOAC, 1995). 10 g de poudre de végétal sont placés dans une cartouche de cellulose et insérés dans l'extracteur Soxhlet, obstrué par un morceau de coton. L'extraction est effectuée en utilisant 150 mL d'hexane pendant 4h, après quoi les lipides sont pesés une fois le solvant éliminé au rotavapor à 60°C. Dans le cas où l'échantillon contient 8 à 10% d'humidité, il est nécessaire de procéder à un séchage à l'aide d'une étuve à 105°C (Moussaoui et al., 2020). Le taux de lipides (TL) est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$TL (\%) = \left[\frac{P_2 - P_1}{P_0} \right] \times 100$$

Avec : TL (%) : Taux de lipides, P₀ : Poids de la prise d'essai (g), P₁ : Poids du ballon vide (g), P₂ : Poids du ballon + matière grasse (g).

III.2.1.5. Dosage des glucides

La détermination des glucides totaux a fait appel à la méthode phénol-acide sulfurique décrite par Dubois et al. (1956). Lorsqu'ils sont exposés à de l'acide sulfurique concentré, les oses subissent une déshydratation pour former des composés furfuriques. Ces produits réagissent avec le phénol pour donner des complexes de couleur jaune-orangé qui absorbent à 485nm. Dans notre cas, 1g de poudre végétale séchée est mélangé avec 1 mL d'une solution de phénol 5% (P/V) et on y ajoute 5 mL d'acide sulfurique concentré avant de laisser réagir 30 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 485 nm. L'utilisation d'une courbe

d'étalonnage établie avec différentes concentrations de glucose (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 et 0,1 mg/mL) permet de déterminer la concentration en sucres totaux.

III.2.1.6. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau a été réalisée par dessiccation de 2 g d'échantillon dans un creuset en porcelaine placé dans une étuve à une température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant, conformément à la méthode d'Audigie et al. (1978). La teneur en eau est calculée en utilisant la formule suivante :

$$H (\%) = (M1 - M2) / P \times 100$$

Avec : H% : Teneur en eau, M1 : Masse (en g) du creuset en porcelaine avec l'échantillon avant le séchage, M2 : Masse (en g) du creuset avec l'échantillon après le séchage. P : Masse (en g) de la prise d'essai.

III.2.2. Méthodes d'extraction et de dosage des composés phénoliques de cœur d'artichaut et de la pulpe de gousse de caroube

III.2.2.1. Les extractions de polyphénols

L'extraction des polyphénols de cœur d'artichaut et de caroube a été faite par deux solvants différents, l'eau distillée (AqE) et le méthanol (MetE). Pour ce faire, des suspensions aqueuses et méthanoliques de poudre de ces deux végétaux de 10% (P/V) (10g dans 100 mL de solvant) sont laissées sous agitation modérée pendant 14h avant d'être filtrées sur papier Whatman N°1. Le solvant du filtrat est ensuite évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C pour l'eau et à 30°C pour le méthanol (Parekh et Chanda, 2007).

III.2.2.2. Dosage des polyphénols

Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits aqueux et méthanolique de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube dont été déterminées par la méthode au réactif de Folin-

Ciocalteu décrite par Singleton et al. (1999). 1 mL de l'extrait a été mélangé avec 5mL d'eau distillée et 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois auquel on ajoute 8 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 75 g/L. Les tubes ont été agités et incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 2h avant de mesurer l'absorbance à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La concentration des polyphénols dans les échantillons a été déduite à partir d'une courbe d'étalonnage standard de l'acide gallique. La teneur totale en polyphénols des extraits a été exprimée en mg GAE pour 100 g d'extrait.

III.2.2.3. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube ont été déterminées selon la méthode décrite par Woisky et Salatino (1998), qui consiste à mélanger 1 mL d'extrait (1 mg/mL) avec 4 mL d'eau distillée, 0.3 mL de chlorure d'aluminium 10% (p/v) et 0.3 mL de nitrite de sodium 5% (p/v). Les mélanges ont été laissés à température ambiante pendant 5 min, puis 2 mL d'hydroxyde de sodium 1M ont été ajoutés. Chaque mélange réactionnel a ensuite été dilué avec 10 mL d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été déduite par extrapolation à partir d'une courbe d'étalonnage standard de quercétine et les résultats sont exprimés en mg QE pour 100 g d'extrait.

III.2.3. Extraction et analyse du chitosane

III.2.3.1. Préparation de la chitine et obtention du chitosane.

Les déchets de carapaces de crevettes ont été d'abord séparés de la chair et lavés à l'eau du robinet. Ils ont ensuite été séchés à température ambiante jusqu'à poids constant et broyés en poudre.

III.2.3.1.1. Déminéralisation et déprotéinisation de la chitine

La chitine a été obtenue par déminéralisation et déprotéinisation de la poudre de déchets de carapaces de crevette en utilisant le protocole décrit par Youcefi et Riazi (2014). Les carapaces en poudre ont été déminéralisées avec une solution d'HCl à 2 M dans un rapport de 1/15 (p/v). La poudre a été ajoutée lentement dans la solution d'HCl et agitée pendant 12h à température ambiante. L'acide a été ensuite éliminé par filtration et l'échantillon a été lavé continuellement jusqu'à ce que le pH de l'eau soit neutre, et ensuite séché pendant une nuit à 30°C.

L'étape de déprotéinisation a été réalisée en utilisant une solution de NaOH à 3% (P/V) dans un rapport de 1/10 (p/v) entre les déchets de carapaces déminéralisées et le solvant. Le mélange a ensuite été chauffé à 90°C et agité pendant 1 heure. La chitine obtenue a été filtrée et lavée continuellement jusqu'à ce que le pH de l'eau soit neutre, et ensuite séchée pendant une nuit à 50°C.

III.2.3.1.2. Désacétylation de la chitine

L'étape de désacétylation consiste à transformer la chitine en chitosane en enlevant le groupe acétyle de la chaîne polymère de chitine pour produire un groupe amine. Elle est réalisée selon la méthode décrite par Youcefi et Riazi (2014). La chitine a été ajoutée à une solution de NaOH à 50% dans un rapport de 1/20 (P/V) chauffée à une température de 60°C pendant 8 heures avec agitation. Le mélange a ensuite été filtré et le chitosane obtenu a été lavé jusqu'à ce que l'eau atteigne un pH neutre. Il a ensuite été séché pendant une nuit à 50°C, puis broyé en une fine poudre et stocké dans des bouteilles.

III.2.3.2. Analyse du chitosane

III.2.3.2.1. Détermination de la teneur en humidité

La teneur en humidité (TH) du chitosane a été déterminée par la méthode gravimétrique telle que décrite par Olafadehan et al. (2021). Un échantillon de chitosane préalablement pesé

a été séché à 100°C jusqu'à poids constant. La teneur en humidité (%) a été calculée en utilisant l'équation (1)

$$MC (\%) = \left(\frac{W-w}{w} \right) \times 100 \quad (1)$$

où W et w sont les poids de l'échantillon de chitosane avant et après le séchage, respectivement.

III.2.3.2.2. Détermination de la teneur en cendres.

La teneur en cendres du chitosane (TC) a été déterminée selon la méthode décrite par Olafadehan et al. (2021). 1 g de chitosane a été placé dans une coupelle en céramique préalablement pesée et placé dans un four à moufle à une température de 600°C pendant 2 h. La coupelle a été laissée refroidir dans un dessiccateur pendant 30 minutes, puis pesée. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant de cendres. La teneur en cendres (%) a été déterminée en utilisant l'équation (2) :

$$C (\%) = \left[\frac{W_1}{W_c \times \left(\frac{100-MC}{100} \right)} \right] \times 100 \quad (2)$$

Où W1 et Wc sont les poids du résidu et de l'échantillon de chitosane, respectivement.

MC est la teneur en humidité du chitosane (%).

III.2.3.2.3. Détermination de la teneur en protéines

La détermination de la teneur en protéines du chitosane a été réalisée par la méthode de Lowry et al. (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée comme protéine étalon. Le chitosane a été dissous dans une solution d'acide acétique (0.1 M) à une concentration de 1 mg/mL. L'absorbance du mélange a été mesurée par spectrophotométrie à 720 nm. La concentration en protéines du chitosane a été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage.

III.2.3.2.4. Mesure de la viscosité moyenne et du poids moléculaire

La viscosité moyenne-poids moléculaire (M_w) du chitosane extrait et dissous dans un mélange d'acide acétique 0.1M et d'acétate de sodium 0.1M a été déterminé par la méthode décrite par Sugiyanti et al. (2018) en utilisant un viscosimètre de marque Brookfield Digital viscometer SNB-1, USA). La viscosité moyenne et le poids moléculaire (PM) a été calculée en utilisant les paramètres de Mark-Houwink comme suit : $[\eta] = [k.(M_w).\alpha$

Où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque, M_w est le poids moléculaire (PM) moyen en viscosité, k et α sont des constantes ($k = 0.078 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ et $\alpha = 0.76$).

III.2.3.2.5. Détermination du degré désacétylation

Le chitosane extrait a été caractérisé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Bruker Alpha-T) dans l'intervalle de 400 à 4000 cm^{-1} . 10 g de chitosane ont été mélangés avec 100 g de bromure de potassium (KBr), ensuite comprimés pour préparer des disques de sel (10 mm de diamètre). Ces derniers ont été conditionnés dans un dessiccateur placé dans un four à 80°C pendant 16h avant l'analyse pour la lecture du spectre. Les absorbances entre 1655 et 3450 cm^{-1} ont été utilisées pour calculer le degré de désacétylation selon l'équation ci-dessous :

$$100 - \frac{A_{1655 \text{ cm}^{-1}}}{A_{3450 \text{ cm}^{-1}}} \times 100$$

III.2.4. Méthodes in vitro d'exploration des propriétés antioxydantes des extraits phénoliques de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.

III.2.4.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des extraits d'artichaut, du chitosane et de leur association a été déterminée selon la méthode originale de Blois (1958).

Il est à noter que le DPPH (diphényl-picryl-hydrazyl) est un radical libre caractérisé par une couleur violette qui se transforme en jaune lorsqu'il est réduit en diphényl-picryl-hydrazine par un donneur de proton (représenté ici par l'antioxydant). Le produit de réduction du DPPH présente une absorbance maximale à 517 nm, laquelle est proportionnelle à la capacité de l'antioxydant à fournir des électrons et à neutraliser les radicaux libres.

Pour ce faire, les extraits de cœur d'artichaut ou de caroube, le chitosane et l'acide ascorbique comme antioxydant standard ont été testés à différentes concentrations (30, 60, 90 et 250 µg/mL). L'association de l'extrait végétal avec le chitosane a été réalisée en utilisant un mélange de ces deux substances. Ainsi, 1µL d'extrait végétal, de chitosane ou de leur association a été additionné à 1000 µL d'une solution méthanolique mère de DPPH (0,06 mM). L'absorbance des échantillons et du témoin à 517 nm a été lue au spectrophotomètre après une incubation de 30 min dans l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition de DPPH ou activité antiradicalaire des extraits a été calculé en utilisant la formule:

$$I (\%) = (A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}} \times 100$$

Avec: I (%) : pourcentage d'inhibition du radical DPPH

Avec : $A_{\text{témoin}}$: absorbance du témoin (blanc), $A_{\text{échantillon}}$: absorbance de l'échantillon (extrait végétal, chitosane ou acide ascorbique) testé

La concentration de l'extrait assurant 50 % d'inhibition du DPPH (IC₅₀ : mg/mL) a été obtenue à partir de l'algorithme de la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant.

III.2.4.2. Test de blanchiment du β -carotène

Le test du blanchissement du β -carotène a été réalisé selon la méthode de Kelin et Tepe (2008). Il s'agit du pouvoir des métabolites secondaires contenus dans l'extrait végétal ou le chitosane à neutraliser l'oxydation du β -carotène par les peroxydes lipidiques de l'acide linoléique, ce qui entraîne sa décoloration.

On procède à la dissolution de 0.5 mg de β -carotène dans un mélange de 1 mL de chloroforme, 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Ensuite, le chloroforme a été complètement évaporé sous vide. Le mélange obtenu a été dilué avec 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène tout en assurant une agitation vigoureuse afin de former une émulsion stable. Après cela, 2.5 mL de l'émulsion fraîche obtenue ont été ajoutés dans différents tubes à essai contenant 350 μ L de différentes concentrations (30, 60, 90 et 250 μ g/mL) d'extrait végétal, de chitosane ou du mélange des deux dans un rapport de 1, ou encore d'acide ascorbique comme antioxydant standard. Ces tubes ont été ensuite laissés incuber à température ambiante pendant 48h. L'absorbance des mélanges a été mesurée à 490 nm.

Enfin, l'Activité Antioxydante Relative (AAR) a été calculée selon la formule :

$$\text{AAR} = ((A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}) \times 100$$

Avec: $A_{\text{témoin}}$: absorbance du témoin, $A_{\text{échantillon}}$: absorbance de l'échantillon extrait ou de l'acide ascorbique.

III.2.5. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits phéoliques de cœur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.

III.2.5.1. Les souches microbiennes utilisées

Les souches microbiennes utilisées sont au nombre de 8 et comportent 6 bactéries pathogènes ATCC (American Type Culture Collection) et 2 bactéries bénéfiques,

Il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus epidermis* (ATCC 49139) pour les souches pathogènes ; et de *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 (CHR Hansen, Denmark) et *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS (LMBAFS) pour les bactéries bénéfiques.

III.2.5.2. Réactivation des souches microbiennes

Les six souches bactériennes pathogènes de notre expérimentation ont été revivifiées avant leur utilisation à 37°C durant 16h dans un bouillon Muller-Hinton (MHB ; Fluka) ; alors que les 2 bactéries bénéfiques ont été revivifiées dans un milieu MRS à 37°C pendant 24h. La densité des cultures a été ajustée à la turbidité de 0,5 standard McFarland (équivalent à 10⁶ UFC/mL) en utilisant le même milieu de culture (MHB) suivie d'une lecture de l'absorbance à 600 nm.

III.2.5.3. Mesure de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des extraits végétaux, du chitosane ou de leurs combinaisons a été évaluée sur l'ensemble des bactéries étudiées en utilisant la méthode de diffusion sur disque (Perveen al., 2012). Pour ce faire, des disques de papier filtre stérile ont été imbibés de 20 µL d'extraits d'artichaut (aqueux et méthanolique), de chitosane ou de leurs combinaisons (1/1), puis placés sur des boîtes de Petri distinctes contenant chacune une gélose Muller-Hinton,ensemencées par l'une des 8 souches bactériennes séparément (6 pathogènes + 2 bénéfiques). Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37°C. Après 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres.

III.2.5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'agent antimicrobien à laquelle aucune croissance bactérienne visible n'est observée après 24h d'incubation à 37 °C. Dans le cadre de notre recherche, des volumes variables d'extraits

végétaux, de chitosane ou de leur mélange au chitosane, dans un rapport égal à 1, ont été mis dans des tubes à essai afin d'obtenir une progression géométrique de gradient égale à 2 et allant de 0 à 50 mg/mL. Ensuite, 1 mL de chaque dilution a été mélangé avec 10 μ L d'une suspension bactérienne (10^8 UFC/mL) et 19 mL de MHB. Les concentrations finales obtenues correspondent à 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 et 0.01 mg/mL. Tous les tubes ont été incubés pendant 24h à 37 °C. La croissance bactérienne a été examinée par observation visuelle suivie d'une inoculation sur gélose MHB.

III.2.6. Détermination de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur combinaison.

III.2.6.1. Activité anti-inflammatoire in Vitro

III.2.6.1.1. Activité anti-hémolytique de l'extrait phénolique aqueux

La préparation des suspensions érythrocytaires a été effectuée selon la méthode décrite par Gandhidasan et al. (1991) à partir de sang humain prélevé sur des volontaires sains. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 10 min. Après cette étape, le surnageant a été éliminé et le culot de globules rouges a été récupéré, ensuite lavé trois fois avec de l'eau physiologique tout en assurant une centrifugation à 3000 tours par minute pendant 5 minutes à chaque fois, afin d'obtenir un culot érythrocytaire purifié à partir duquel une suspension érythrocytaire de 10% a été préparée en mélangeant 1 volume de culot avec 9 volumes de tampon phosphate salin (PBS).

Le but de cette manipulation, conduite selon la méthode décrite par Govindappa et al. (2011), est d'explorer l'effet des polyphénols, du chitosane ou de leur association sur la stabilisation des hématies vis-à-vis de l'hémolyse induite par la chaleur.

Dans des tubes d'hémolyse, 50µL de suspension érythrocytaire à 10% précédemment préparée et 50µl de chaque extrait à tester à différentes concentrations pour chacun ont été ajoutés (500, 250, 125 et 62.5 µg/mL), suivis d'ajout de 2.95 mL de tampon phosphate salin PBS.

Il importe de noter que le diclofénac sodique a été utilisé comme référence standard (contrôle positif) avec les mêmes concentrations (500, 250, 125 et 62.5 µg/mL). Ces mélanges réactionnels ont été chauffés à 54°C pendant 20 min, puis refroidies à une température ambiante et centrifugées 3 min à 2500 tours/min. La teneur en hémoglobine dans les surnageants a été mesurée par lecture de l'absorbance à 540 nm. Le contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'échantillon à tester par du tampon phosphate salin PBS dans les mêmes proportions.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges a été calculé selon la formule suivante :

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

Où : Ac : Absorbance du contrôle, At : Absorbance de l'extrait.

L'IC50 est inversement proportionnelle au pouvoir anti-inflammatoire d'un composé, car il exprime la quantité d'anti-inflammatoire requise pour diminuer la concentration de l'hémolyse des globules rouges de 50% ; autrement dit, plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité anti-inflammatoire d'un composé est élevée. Dans cette expérimentation, l'IC50 a été déterminée à par régression linéaire (courbe) des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations des différents extraits testés.

III.2.6.1.2. Mise en évidence de l'activité protectrice de l'extrait phénolique aqueux vis-à-vis de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf.

Cette manipulation explore l'effet des différents extraits (extrait d'artichaut, de chitosane et leur mélange) sur les protéines du blanc d'œuf en les protégeant contre le phénomène de

dénaturation. Pour ce faire, un mélange réactionnel de 5 mL comprenant 0.2 mL de blanc d'œuf, 2.8 mL de tampon phosphate salin (PBS, pH=6.4) et 2 mL des différents extraits à tester (utilisés séparément) avec des concentrations variables de : 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 et 25 mg/mL. Le dichlofenac, utilisé dans les mêmes concentrations, sert de standard (contrôle positif) ; alors que le contrôle négatif comporte, à la place de l'extrait à tester, du tampon phosphate salin PBS. Ensuite, les différentes solutions ont été incubés à 37°C dans un incubateur BOD (BIOTECH) pendant 15 min puis chauffés à 70°C pendant 5 min dans un bain marie. Après leur refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 660 nm (spectrophotomètre de marque LAB INDIA, UV 3000).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf a été calculé selon la formule suivante : $\% \text{ d'inhibition} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$

Où : At = absorbance de l'échantillon à tester, Ac = absorbance du contrôle.

L'IC50 a été mise en exergue en utilisant une courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents extraits testés.

III.2.6.2. Activité anti-inflammatoire in vivo

L'activité anti-inflammatoire in Vivo chez des rats Wistar de l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur combinaison été évaluée selon la méthode décrite par Winter et al. (1962).

III.2.6.2.1. Mise en lots des rats

Les rats ont été soumis à un jeûne de 16h avec accès libre à l'eau avant l'étude. La mise en lots des rats a consisté à les répartir en 5 lots de 5 rats chacun. Le lot I, considéré comme "témoin" ou "contrôle négatif", a reçu 10 mL de Tween 80 à 1% /kg de poids vif. Le lot II, utilisé comme groupe de référence est le contrôle positif, a quant à lui reçu une dose de 25 mg

de diclofénac/kg de poids vif, un anti-inflammatoire médicamenteux couramment utilisé. En revanche, les lots III, IV et V (groupes expérimentaux) ont été respectivement administrés avec des doses de 30 mg de chitosane /kg de poids vif, 200 mg d'extrait phénolique d'artichaut /kg de poids vif et la combinaison des deux substances (chitosane 30 mg/kg de poids vif + 200 mg d'extrait phénolique d'artichaut /kg de poids vif).

III.2.6.2.2. Induction de l'inflammation par la carragénine et mesure de l'épaisseur de l'inflammation

Une heure après l'administration orale des différents traitements, un œdème a été induit par injection de 100 µL de carraghénine 1% (P/V) au niveau de la voute plantaire de la patte postérieure droite. L'épaisseur de la patte en mm) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant l'injection (V_o), puis à intervalles réguliers de 60 min pendant 6h suivant l'induction de l'inflammation, comme cela a été décrit par Vasudevan et al. (2006). Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule suivante (Lanhers et al., 1992) :

Pourcentage d'inhibition = $[(V_t - V_o) \text{ témoin} - (V_t - V_o) \text{ traité}] \times 100 / (V_t - V_o) \text{ témoin}$

Avec : V_o : Volume de la patte avant injection de la carragénine ; V_t : Volume de la patte à un intervalle de temps déterminé après injection de la carragénine.

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV.1. Composition chimique des poudres de cœur de cœur d'artichaut (*C. scolymus*) et de pulpe de caroube (*C. siliqua*)

IV.1.1. Teneurs en eau et en cendres

Les teneurs en eau et en cendres du cœur d'artichaut et de la pulpe de caroube sont reportées au tableau 3. Des valeurs de l'ordre de 2.05g/100g et de 7.19g/100g ont été enregistrées pour le cœur d'artichaut (*C. scolymus*) et la pulpe de caroube (*C. Siliqua*), respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux de Ben Salem et al. (2017) qui ont enregistré une teneur en eau de 2.97% dans l'artichaut récolté dans la région de Bizerte située dans le nord de la Tunisie, alors que Avallone et al. (1997) ont relevé une teneur en eau de l'ordre de 7% dans la caroube récoltée à partir de différentes régions d'Italie.

Quant aux teneurs en matières minérales, on en trouve 17.26g/100g et 2.64g/100g dans l'artichaut et dans la pulpe de caroube, respectivement (soit une différence égale à 6.5 fois). Ces teneurs demeurent similaires à celles rapportées par Ben Salem et al. (2017) et Avallone et al. (1997) qui ont relevé des teneurs en cendres de 15.81% et de 3% dans l'artichaut tunisien et la caroube italienne respectivement (soit une différence de 5.27 fois).

IV.1.2. Teneur en protéines

Les résultats obtenus montrent que le cœur d'artichaut est 3 fois plus riche en protéines que la pulpe de caroube et en contient 19.84 g/100g ; alors que la caroube renferme 6.58 g/100g (tableau 3). Selon Sharma et al. (2021), l'artichaut renferme une teneur de 21.6% de protéines, une valeur qui reste proche des résultats de ce travail.

En revanche, concernant la pulpe de caroube, une étude réalisée par El Batal et al. (2016) a révélé que la teneur en protéines varie entre 3.05 et 4.5g/100g dans plusieurs régions du Maroc comme Agadir, Marrakech et Taza.

IV.1.4. Teneur en glucides

À propos des contenus en glucides des différents échantillons de cette étude, les résultats enregistrés laissent observer que la caroube (*C. siliqua*) surclasse l'artichaut (*C. scolymus*) (48.38g Vs 42.70g) (Tableau 3). Les glucides de l'artichaut sont composés de plusieurs sucres à savoir le glucose, le fructose et le saccharose ainsi que des fibres et l'inuline.

Les résultats obtenus corroborent avec ceux de Avallone et al. (1997) qui ont mis en évidence une teneur en glucide de 44% dans l'artichaut de Sicile (Italie). Cependant, les travaux de El Sohaimy (2013) ont fait ressortir un taux de glucides totaux chez l'espèce *C. scolymus* de l'ordre de 76.34%. En revanche, la teneur en glucides de pulpe de caroube trouvée dans ce travail est beaucoup plus inférieure à celle rapportée pour la caroube de Bulgarie par Petkova et al. (2017) qui y ont décelé 85.50%. Selon les mêmes auteurs, les glucides d'artichaut renferment entre 34 et 46% de saccharose, 2 et 5% de glucose, 2 et 5% de fructose et 30 à 36% de fibres alimentaires.

Des résultats similaires ont été rapportés par Dosi et al. (2013) avec un taux de 3.08g protéines/100g d'artichaut de la région de Caserta en Italie. Dans ce contexte, il est bien évident que les résultats de notre expérimentation (Tableau 3) restent supérieurs à ceux publiés par ces deux études. Selon Inserra et al. (2015) la pulpe de caroube se caractérise par une teneur plutôt faible en protéines et en matière grasse.

IV.1.3. Teneur en matière grasse

Les résultats relatifs à la teneur en matière grasse ont montré que l'artichaut en était plus riche, avec 1.89g/100g, que la pulpe de caroube qui n'en renferme que 0.91g/100g. Dans la littérature, le taux de matière grasse enregistré par Dosi et al. (2013) dans l'artichaut italien était bien inférieur (0.18g/100g) à celui de l'artichaut algérien qui en contient presque 10 fois plus.

Pour ce qui est de la pulpe de caroube, il est à noter que la teneur trouvée dans le présent travail est largement inférieure par rapport à celle obtenue par Ayaz et al. (2009) (4.44%).

Tableau 3. Composition chimique du cœur d'artichaut (*C. scolymus*) et de la pulpe de caroube (*C. siliqua*) en g/100g MS.

Teneur en g/100g	Coeur d'artichaut	Pulpe de caroube
Teneur en eau	2.05 ± 0.08 a	7.19 ± 0.12 b
Teneur en cendres	17.26 ± 1.52 a	2.64 ± 0.09 b
Teneur en cellulose brute	42.74 ± 7.29 a	22.18 ± 3.84 b
Teneur en protéines	19.84 ± 3.18 a	6.58 ± 1.26 b
Teneur en matière grasse	1.89 ± 0.04	0.91 ± 0.11
Teneur en glucides	42.70 ± 2.15	48.38 ± 4.71

IV.2. Les composés phénoliques du coeur d'artichaut et de la pulpe de caroube

IV.2.1. Rendement d'extraction à l'eau et au méthanol

L'eau s'est révélée plus efficace que le méthanol dans l'extraction des polyphénols, probablement en raison de sa plus forte constante diélectrique. Les rendements de l'extraction aqueuse et méthanolique des polyphénols de cœur d'artichaut sont de l'ordre de 12.34 et 9.86%, respectivement ; alors que ceux de la pulpe de caroube sont aux alentours de 9.86 et de 3.18%, respectivement (tableau 4).

Mahmoudi et al. (2013) ont mené une étude sur l'extraction des polyphénols de l'artichaut (Nord de l'Algérie) en utilisant différents solvants. Selon leurs résultats, l'acétone est le solvant d'extraction le plus efficace suivi du méthanol et de l'éthanol et enfin de l'eau. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus dans la présente expérience.

Il est à noter que les variations de rendement et l'efficacité de l'extraction de métabolites par un solvant est tributaire de plusieurs paramètres, tels que le diamètre des particules, le volume et le type de solvant utilisé, ainsi que le nombre d'étapes d'extraction. Il est également connu que l'eau est le meilleur solvant naturel qui existe en raison de sa polarité.

Tableau 4. Rendement d'extraction (%) des composés phénoliques à partir du cœur d'artichaut et de pulpe de caroube par l'eau et le méthanol.

Solvant d'extraction	Rendement d'extraction des polyphénols en %	
	Cœur d'artichaut	Pulpe de caroube
Eau	12.34	8.33
Méthanol	9.86	3.18

D'après l'étude de Spirrizzi et al. (2022), les rendements d'extraction éthanolique aux ultrasons de polyphénols obtenus à partir des feuilles de deux variétés de caroube, *Ceratonia selvetica* et *Ceratonia amele*, récoltées dans le Sud de l'Italie étaient de 14.7 et 7 % respectivement. Ces rendements demeurent supérieurs par rapport à ceux enregistrés dans ce travail.

IV.2.2. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de cœur d'artichaut et de la pulpe de caroube

IV.2.2.1. Polyphénols et flavonoïdes de cœur d'artichaut

Les résultats relatifs au dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes contenus dans les différents extraits d'artichaut (aqueux et méthanolique) sont illustrés par la figure 19 ci-après. La teneur en polyphénols de l'extrait de l'artichaut a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établi pour l'acide gallique ($Y=0.19x+0.000$, $R^2=0.983$). Dans la présente étude, des teneurs de 159.42 et 142.38 mg EAG/g ont été obtenue dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'artichaut respectivement, présentant ainsi une différence significative ($P<0.05$).

Selon une étude menée par Mahmoudi et al. (2013) sur le cœur d'artichaut récolté dans la région de Boumerdès (Algérie), les teneurs en polyphénols étaient de 13.11 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique et de 5.23 mg EAG/g pour l'extrait aqueux et restent nettement inférieurs aux teneurs obtenues dans la présente expérience.

Par ailleurs, les recherches menées par Abd El-ghani (2017) sur l'artichaut d'Egypte ont révélé que ce légume contient environ 46.62 ppm de polyphénols totaux. D'autre part, El Sayed et al. (2017) ont obtenu une teneur de 20.55 mg EAG/g pour le cœur d'artichaut récolté dans la même région (Egypte) ; alors que Jimenez-Escrig et al. (2003) ont rapporté une teneur de 50.04 mg EAG/g dans l'artichaut d'Espagne (région de Madrid).

De plus, Mosaed et Al-Subhi (2017) ont également démontré que la teneur en polyphénols totaux de l'artichaut commercialisé dans la région de La Mecque (Arabie Saoudite) était de 14.16 mg/g ; alors que l'étude menée par Wang et al. (2003) a révélé que le cœur d'artichaut contient des taux plus faibles en polyphénols allant de 1.78 à 3.10 %.

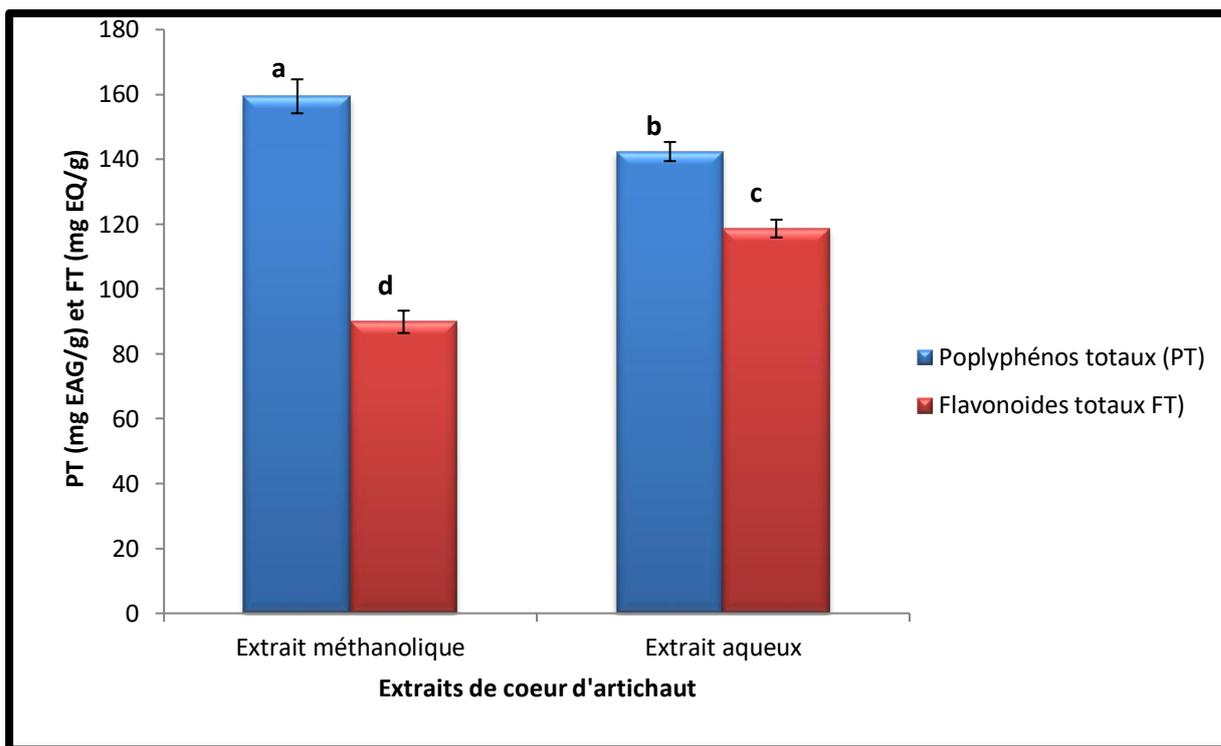


Figure 19. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) et en flavonoïdes (mg EQ/g) dans les extraits méthanolique et aqueux de cœur d'artichaut (*C. scolymus*). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

Selon Naczka et Shahid (2004), l'extraction des polyphénols à partir des plantes peut être affectée par plusieurs facteurs tels que les conditions d'extraction, l'état du matériel végétal (à l'état sec ou à l'état frais), la taille des particules, ainsi que les paramètres relatifs aux températures conseillées pour l'extraction.

En plus de ces conditions, Özcan et Chalchat (2008) qui ont travaillé sur le pouvoir antioxydant du Romarin (*Rosmarinus Officinalis*) ont ajouté d'autres facteurs pouvant directement affecter le rendement d'extraction et parmi lesquels figurent la zone de prélèvement, la saison de récolte, les conditions de séchage de la plante, la maturité de la plante, les maladies éventuelles qui peuvent l'affecter ainsi que la durée de conservation.

Enfin, une étude menée par Benali et al. (2022) sur l'artichaut marocain a révélé que le taux en polyphénols était de 216.35 mg EAG/g et demeure supérieur à nos résultats (142.38 mg EAG/g pour l'extrait aqueux et 159.42 pour l'extrait méthanolique).

Dans ce travail, la teneur en flavonoïdes des extraits de cœur d'artichaut a été obtenue par extrapolation sur une courbe étalon pour la quercétine ($Y = -1,07x + 0,004$, $R^2 = 0,988$). Les extraits méthanoliques et aqueux de cœur d'artichaut de la présente expérimentation ont montré une différence significative ($P < 0.05$) avec des teneurs en flavonoïdes de 89.87 et 118.64 mg EQ/g pour l'extrait méthanolique et aqueux, respectivement (Fig.19).

Dans le même contexte, Benali et al. (2022) ont rapporté un taux en flavonoïdes supérieur aux résultats de notre étude avec une teneur de l'ordre de 210.88 mg EQe/g de MS dans la variété d'artichaut sauvage de *Cynara cardunculus* L. récoltée au Maroc.

Les travaux de Mahmoudi et al. (2013) ont montré que les extraits flavonoïdes méthanolique et aqueux de flavonoïdes de cœur d'artichaut étaient de 2.82 et 2.13 mg EQ/g respectivement ; alors que Mosaed et Al-Subhi (2017) ont enregistré une teneur en flavonoïdes de 9.85 mg EQ/g dans le cœur d'artichaut commercialisé en Arabie Saoudite. Ces teneurs sont inférieures à celles obtenues dans la présente expérimentation (118.64 mg EQ/g pour l'extrait aqueux et 89.87 mg EQ/g pour l'extrait méthanolique).

Des études menées par Vicente et Boscaiu (2018) ont affirmé que les flavonoïdes sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes face aux multiples conditions de stress abiotique tels que les rayons UV, les températures élevées et la sécheresse, la salinité. Ces métabolites protègent également la plante de se protéger contre les agents pathogènes.

IV.2.2.2. Polyphénols et flavonoïdes de la pulpe de la pulpe de caroube

Les résultats relatifs à la composition de la pulpe de caroube en polyphénols et en flavonoïdes sont illustrés par la figure 20. L'examen des proportions en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les deux extraits étudiés laisse observer que l'eau serait plus efficace que le méthanol en matière d'extraction.

Selon Boeing et al. (2014), les procédures d'extraction sont essentielles pour la récupération des polyphénols à partir des matériaux végétaux ; et par conséquent la polarité du solvant utilisé joue un rôle crucial dans l'influence de la solubilité des phénols (Naczki and Shahidi, 2006) ; ce qui peut avoir un impact significatif sur le rendement d'extraction et leur activité (Lasano et al, 2019).

Pour ce qui est des polyphénols totaux, nous avons enregistré une différence significative ($P < 0,05$) avec des teneurs de 24.12 mg EAG/g et 38.23 mg EAG/g, respectivement pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, soit une différence égale à 1.60 fois (Fig.20).

Les polyphénols représentent un vaste groupe d'au moins 10 000 composés différents qui contiennent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles (González-Vallinas et al, 2013 ; Li et al, 2014 ; Brglez Mojzer et al., 2016). De plus, les polyphénols naturels peuvent se présenter sous la forme de molécules simples, telles que les acides phénoliques, mais également sous la forme de composés hautement polymérisés, tels que les tanins (Bravo, 1998) sont généralement impliqués dans la défense contre différents types de stress chez les plantes (Asensi et al, 2011).

Selon les mêmes auteurs, les polyphénols offrent une protection contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, la lumière UV, les agents pathogènes, les parasites et les prédateurs des plantes.

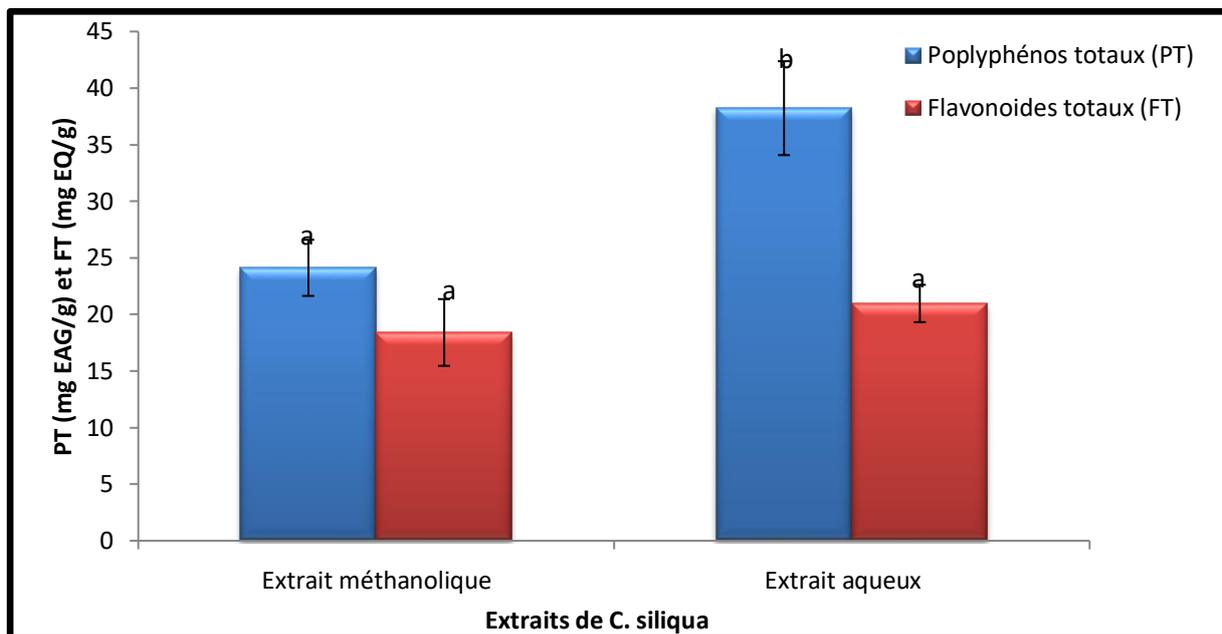


Figure 20. Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) et en flavonoïdes (mg EQ/g) des extraits méthanolique et aqueux de la pulpe de caroube (*C. siliqua*).

Les résultats obtenus dans ce travail sont très largement supérieurs à ceux rapportés par El-Sherif et al. (2011) pour des extraits éthanoliques dont la teneur en polyphénols totaux de la pulpe de caroube d’Egypte destinée à la confiserie était de 1.86 mg EAG/g.

Il en est de même pour le plus faible taux de polyphénols enregistré par El Hajaji et al. (2010) dans des extraits phénoliques d’acétate d’éthyle et de dichlorométhane de pulpe de caroube du Maroc (0.45 à 2.64 mgEAG/g).

Lasano et al. (2019) explique que l’extraction des composés phénoliques peut atteindre son optimum en utilisant des solvants tels que le méthanol et l’éthanol à des pourcentages différents, à savoir 80% et 60%, respectivement.

En ce qui concerne les flavonoïdes totaux, les résultats obtenus ont mis en exergue une teneur de 18.41 mg EQ/g pour l’extrait méthanolique et de 20.97 mg EQ/g pour l’extrait aqueux, soit une différence entre les deux extraits de 1.13 fois (Fig.20). Les principaux flavonoïdes

présents dans la pulpe de caroube sont : la quercétine, la myricétine et le kaempférol qui se trouvent sous forme de dérivés glycosidiques (Papagiannopoulos et al., 2004 ; Rakib et al., 2010; Goulas et Gorgiou, 2019).

Selon Goulas et Gorgiou (2019), la teneur totale en flavonoïdes des extraits de caroube est fortement influencée par le système d'extraction. Ils suggèrent que les solvants les plus appropriés pour la récupération des flavonoïdes de la caroube sont l'acétone acide et le mélange acétone-eau ; et qu'en revanche, les extraits obtenus à partir des solvants purs tels que l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'éthanol contiennent des quantités plus faibles de flavonoïdes, en raison de la prédominance de la forme glycosidique par rapport à la forme aglycone des flavonoïdes dans la caroube.

Les taux des flavonoïdes totaux enregistrés dans cette expérience (18.41 et 20.97 mg EQ/g) sont nettement supérieurs à ceux publiés par El Bouzdoudi et al. (2016) (entre 0.19 et 7.46 mg EQ/g) pour la pulpe de caroube récoltée dans 15 localités marocaines.

Cependant, les teneurs en flavonoïdes enregistrées dans ce travail restent inférieures à celles de Goulas et Gorgiou (2019) qui ont décelé entre 22.7 et 52.8 mg EQ/g dans la pulpe de caroube récoltée dans différentes régions de Chypre et extraits avec un mélange méthanol-eau (80 : 20 v/v et 50 : 50 v/v) et éthanol-eau (80 : 20 v/v et 50 : 50 v/v).

IV.3. Rendements d'extraction et caractéristiques physico-chimiques du chitosane de carapace de crevette

IV.3.1. Rendements d'extraction du chitosane

Les rendements d'extraction du chitosane après chaque traitement chimique des carapaces de crevette sont reportés dans le tableau 5. Il en ressort que le rendement après déminéralisation dépasse celui obtenu après déprotéinisation, suivi du rendement après blanchiment et enfin après désacétylation avec des rendements finaux respectifs de : 34.52, 29.08, 15.23 et 5.80%. Le

chitosane se présente sous forme d'une poudre blanche, incolore et sans goût, comme le montre la figure 21.

Tableau 5. Rendements d'extraction du chitosane (%) obtenus après chaque traitement chimique (déméralisation, déprotéinisation, blanchiment et désacétylation).

Poids initial de carapaces de crevette	Après déminéralisation	Après déprotéinisation	Après blanchiment	Après désacétylation
25 g	1.12 ± 34.52	29.08 ± 3.41	15.23 ± 0.14	5.80 ± 1.09



Figure 21. Aspect du chitosane extrait des carapaces de crevettes

Selon Kurita (2006), la composition des cuticules des crustacés est essentiellement constituée de protéines, de minéraux et de chitine, d'une manière générale. Il est à noter que les

déchets des crustacés sont constitués d'environ 30 à 40 % de protéines, 30 à 50 % de carbonate de calcium et 20 à 30 % de chitine. Ces proportions varient selon les espèces et les saisons.

Dans présente expérimentation, le rendement en chitosane (5.80%) est inférieur par rapport à ceux obtenus d'une part par Youcefi et al. (2017) qui ont relevé un rendement de l'ordre de 10.73% dans les carapaces de la crevette pêchée dans les côtes de Beni Saf (Ain Temouchent, Algérie) et d'autre part par Bolat et al. (2010) qui ont rapporté un rendement en chitosane de l'ordre de 7.25% dans les carapaces de crabe d'eau douce pechée dans le lac d'Egdir (Turquie).

Dans une autre étude, Shahidi et Synowiecki (1991) ont démontré que chez les espèces marines "*Chionoecetes opilio*" (crabe des neiges) et "*Pandalus borealis*" crevette nordique), le taux en chitosane varie entre 17.10 et 32.25 %. Ces taux restent largement supérieurs de 3 à 5.5 fois par rapport au résultat de cette étude (5.8%).

Cependant, le rendement d'extraction en chitosane obtenu dans ce travail corrobore avec celui rapporté par Sugianti et al. (2018) qui ont mis en évidence un rendement en chitosane de 5.90% dans les carapaces de crabes. Les différences constatées dans les rendements d'extraction en chitosane pourraient être dues liées à la composition des exosquelettes des crustacés, lesquels dépendent de l'espèce, de l'âge, du sexe, de la saison et des conditions environnementales (Kurita, 2006).

Selon Mignotte et al. (2012), la matière sèche de départ peut aussi influencer le rendement final en chitosane. Ces auteurs ont rapporté que 45 g de matière sèche (carapace de crevette) peut fournir entre 8 et 10 g (22 %) de chitine.

IV.3.2. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane

Les teneurs en humidité, en cendres, en protéines, le poids moléculaire et le degré désacétylation sont reportées dans le tableau 6.

Dans cette étude nous avons constaté que les teneurs en humidité et en protéines du chitosane étaient faibles avec des valeurs de l'ordre de 4.43% et 0.18%, respectivement. Ces faibles taux peuvent s'expliquer par l'efficacité des étapes de déminéralisation et de déprotéinisation, où les minéraux et les protéines ont été presque totalement éliminés (Tableau 6).

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane des carapaces de crevette.

Caractéristiques physico-chimiques du chitosane				
Humidité (%)	Cendres (%)	Protéines (%)	Degré de Désacétylation (%)	Poids moléculaire (KDa)
4.43 ± 0.57	1.32 ± 0.62	0.18 ± 0.04	75	859.48 ± 21.62

Pour ce qui est des cendres, leur faible teneur dans le chitosane peut être attribuée à la faible teneur en carbonate de calcium présent dans les carapaces de crevettes, comme cela a été rapporté par Youcefi et al. (2017). Selon les travaux de Narudin et al. (2020), la teneur en cendres résiduelles du chitosane affecte sa solubilité et sa viscosité, ainsi qu'une teneur élevée en cendres résiduelles indique une déminéralisation moins efficace des déchets de coquilles, probablement en raison de la faible concentration d'HCl utilisée dans la déminéralisation.

La teneur en protéines est de l'ordre de 0.18%. D'après Youcefi et al. (2017), la chitine se trouve naturellement associée aux protéines dont une partie peut être extraite par des méthodes douces, alors que l'autre partie reste difficilement extractible. La teneur en protéines trouvée dans ce travail est de loin inférieure à celle rapportée par Renuka et al. (2019) qui ont décelé un taux de protéine de 1.99% dans les carapaces de crevette "*Parapeneopsis stylifera*" prélevée en Inde.

Par ailleurs, les résultats de cette étude ont montré que le poids moléculaire du chitosane est de 859,48 KDa et son degré de désacétylation est de 75% (Tableau 6). Le poids moléculaire du chitosane obtenu par Youcefi et al. (2017) était plus élevé que celui obtenu dans la présente étude (1414,33 KDa).

Il importe de noter que le poids moléculaire du chitosane enregistré dans le présent travail (859.48 KDa) est supérieur à ceux rapportés par Sujianti et al. (2018) chez la crevette (557 KDa) et le crabe (690 KDa) d'Indonésie. Selon ces mêmes auteurs, le poids moléculaire du chitosane dépend de la matière première et de la méthode d'extraction.

Le degré de désacétylation du chitosane évalué dans cette étude (75%) est similaire à ceux enregistrés par Olafadehan et al. (2021) chez la crevette (81.79 %) et le crabe (81.94 %). Le degré de désacétylation confère au chitosane une capacité de floculation et de fixation des cations métalliques très élevée (Roussy et al., 2005 ; Youcefi et Riazi, 2014). Le degré de désacétylation (DD) correspond à la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques.

Il importe de noter que les produits commerciaux contenant du chitosane présentent un DD supérieur à 70%. Cette valeur attribuée à ce polymère permet aussi de déterminer sa solubilité dans les solutions acides diluées, comme elle peut influencer ses propriétés biologiques (Chatelet et al., 2001 ; Youcefi et Riazi, 2014).

IV.4. Pouvoir antioxydant des différents extraits phénoliques de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association

IV.4.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

IV.4.1.1. Cas des extraits phénoliques de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association

La figure 22 présente la capacité antioxydante des extraits phénoliques (méthanolique « MetE » et aqueux « AqE ») d'artichaut, du chitosane et de leur association. Il a été observé que la concentration d'inhibition de 50% du radical DPPH était établie selon les associations dans l'ordre croissant suivant : chitosane-MetE ($IC_{50} = 0.642$ mg/mL) > chitosane-AqE ($IC_{50} = 1.143$ mg/mL) > chitosane seul ($IC_{50} = 1.728$ mg/mL) > MetE seul ($IC_{50} = 2.003$ mg/mL) > AqE seul ($IC_{50} = 3.117$ mg/mL).

L'acide ascorbique a démontré une activité de capture de radicaux libre DPPH supérieure à celle du chitosane, des extraits d'artichaut et de leurs mélanges ($IC_{50} = 0.071$ mg/mL). La capacité de piégeage du radical DPPH par la combinaison des extraits phénoliques de cœur d'artichaut et du chitosane a dépassé celle du chitosane ou celle des extraits phénoliques de cœur d'artichaut seuls (fig. 22).

En accord avec les résultats de la présente étude, la capacité du chitosane à neutraliser les radicaux libres a été démontrée. Dans une étude analogue, Si Trung et Bao (2015) ont constaté que l'activité de piégeage du radical DPPH par le chitosane extrait des déchets de coquille de crevette variait de 3.7 à 16.8 % pour des concentrations de 1 à 2 mg/mL ; alors que Rajalakshmi et al. (2016) ont observé que l'activité de piégeage du radical DPPH par le chitosane était supérieure à 60 % pour des concentrations de 1 à 5 mg/mL. Youcefi et Riazi (2014) ont constaté

que le radical DPPH était neutralisé à hauteur de 37.66 à 62.66 % par le chitosane extrait des déchets de coquille de crevette, utilisé à des concentrations de 0.5 à 1 mg/mL.

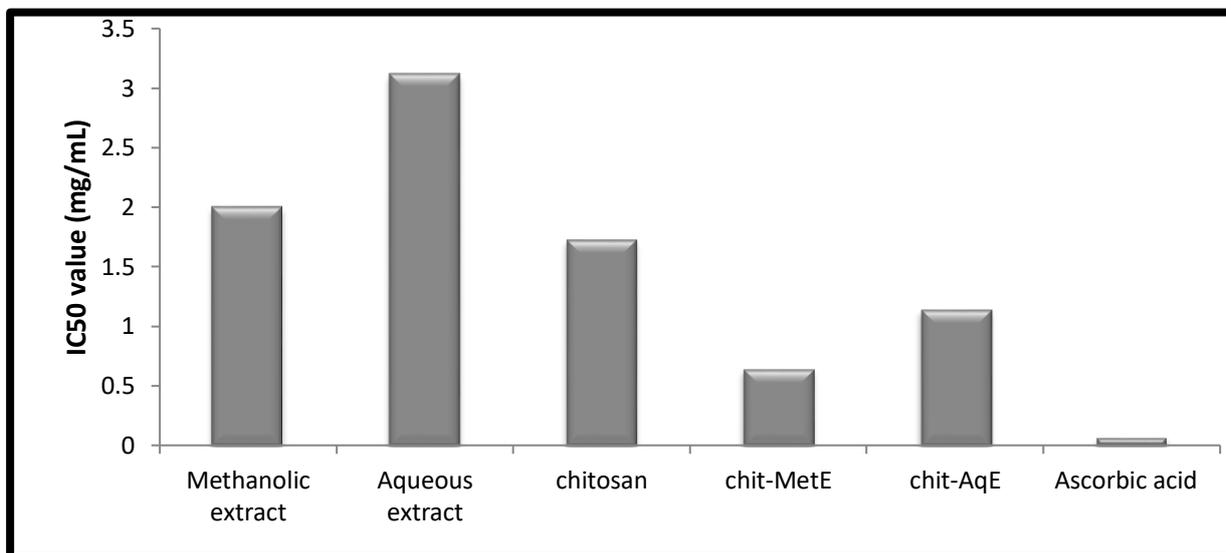


Figure 22. Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH (IC₅₀ en mg/mL) des extraits phénoliques méthanolique et aqueux de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparées à celle du standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de 3 déterminations (n = 3).

Par ailleurs, Prabu et Natarajan (2012) ont constaté que l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH par l'extrait de chitosane obtenu à partir de carapace de *Podophthalmus Vigil* (crabe), utilisé à des concentrations de 0.1 à 10 mg/mL, variait de 18.08 à 55.56 %.

En outre, Park et al. (2004) ont rapporté que le chitosane neutralise différents radicaux libres grâce à l'action de son azote en position C-2. Xia et al. (2011) ont suggéré à ce sujet que l'azote des groupes aminés possède une paire d'électrons qui peut réagir avec un proton libéré par une solution acide pour former des groupes ammonium (NH_3^+). Ainsi, les radicaux libres réagissent avec l'ion hydrogène du NH_3^+ pour former une molécule stable.

Si Trung et Bao (2015) ont observé que l'inhibition de la peroxydation des lipides par le chitosane variait de 1.7 à 15.1 % pour des concentrations allant de 1 à 2 mg/mL. Ces auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante du chitosane contre la peroxydation des lipides pourrait être due à son activité de capture des radicaux libres. De plus, Kurniasih et al. (2018) ont démontré que le chitosane inhibait le processus d'oxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode du ferrothiocyanate (FTC).

Par ailleurs, Mahmoudi et Mahmoudi (2022) ont étudié l'activité de piégeage du radical DPPH par différentes parties de l'artichaut (cœur, tige, étranglement et bractées). Ils ont rapporté des valeurs IC₅₀ plus basses que celles observées dans la présente étude (0.025 à 0.031 mg/mL), et mis en évidence une corrélation positive ($r = 0.66$) entre la teneur totale en composés phénoliques des parties de l'artichaut et l'activité antioxydante observée. Cela explique que l'activité d'extinction du radical DPPH du cœur d'artichaut est due à sa richesse en composés phénoliques.

De plus, Eldin Awad et al. (2020) ont observé une différence significative dans l'activité antioxydante des extraits aqueux et éthanolique d'artichaut, déterminée selon le test de piégeage du radical DPPH (IC₅₀ de 0.247 et 0.130 mg/mL pour les extraits aqueux et éthanolique, respectivement). Les mêmes auteurs ont rapporté que les sous-produits de l'artichaut sont de bonnes sources en composés phénoliques et sont considérés comme de puissants capteurs de radicaux libres.

Il est à signaler que l'activité antioxydante dû à l'association du chitosane aux extraits d'artichaut peut être attribuée à une interaction entre le chitosane et les composés phénoliques présents dans les extraits d'artichaut. Ainsi, Li et al. (2013) ont rapporté que la modification chimique du chitosane avec des coumarines augmentait significativement son activité antioxydante.

Ces chercheurs ont observé que l'inhibition de la peroxydation des lipides, la chélation du fer et le piégeage du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) des dérivés de chitosane synthétisés (une combinaison de chitosane et de coumarines) présentaient une amélioration remarquable par rapport au chitosane seul.

Enfin, l'efficacité thérapeutique du mélange "chitosane-polyphénols" a été étudiée pour le traitement de diverses maladies causées par les peroxydes et a donné de bons et remarquables résultats (Pattnaik et al., 2022).

IV.4.1.2. Cas des extraits de caroube, du chitosane et de leur association

La figure 23 met en évidence le pouvoir antioxydant des extraits de pulpe de caroube, du chitosane et de leur combinaison en s'appuyant sur la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH. Il a été constaté que la concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH était établie selon la combinaison dans l'ordre croissant suivant : Chitosane seul ($\text{IC}_{50} = 1.728 \text{ mg/mL}$) > chitosane + Extrait méthanolique ($\text{IC}_{50} = 3.008 \text{ mg/mL}$) > chitosane + extrait aqueux ($\text{IC}_{50} = 3.895 \text{ mg/mL}$) > Extrait méthanolique ($\text{IC}_{50} = 5.28 \text{ mg/mL}$) > extrait aqueux ($\text{IC}_{50} = 6.625 \text{ mg/mL}$) (Fig. 23). L'antioxydant de référence, l'acide ascorbique, s'est révélé le plus efficace avec la plus faible IC_{50} égale à 0.071 mg/mL .

Les résultats obtenus à travers cette étude ont montré que le pouvoir antioxydant des extraits de gousses de caroube est inférieur à celui publié par Darwish et al. (2021) ($\text{IC}_{50} = 3.78 \text{ mg/mL}$) pour les extraits de pulpe de caroube d'Égypte.

Ces mêmes auteurs ont déduit que les extraits de pulpe de caroube présentent une forte capacité à piéger le radical DPPH. Cette activité est due à la présence de constituants actifs dans les gousses de caroube ayant la capacité de céder un hydrogène à un radical libre afin d'éliminer l'électron impair qui est responsable de la réactivité du radical.

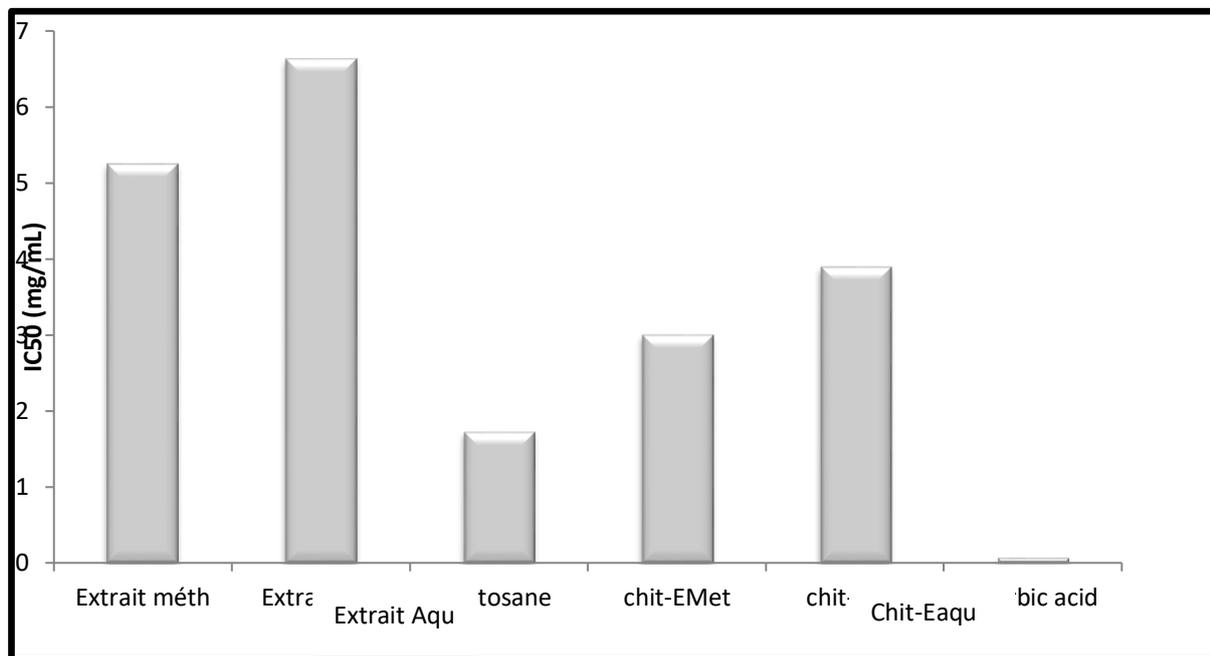


Figure 23. Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH (IC50 en mg/mL) des extraits méthanolique et aqueux de la pulpe de caroube, du chitosane et de leur association en comparaison avec un standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de 3 déterminations (n = 3).

IV.4.2. Inhibition du blanchiment du β -carotène

Le test d'inhibition du blanchiment du β -carotène simule l'oxydation des lipides membranaires et peut être considéré comme un bon modèle pour la peroxydation des lipides basée sur les membranes (Younes et al., 2014).

IV.4.2.1. Inhibition par les extraits de cœur d'artichaut, du chitosane et leur association.

Comme le montre la figure 24, la capacité antioxydante des extraits d'artichaut, du chitosane et de leur association a été déterminée par la méthode de blanchiment du β -carotène. En l'absence d'un antioxydant, les radicaux libres formés lors de l'abstraction d'un atome d'hydrogène de l'acide linoléique attaquent la molécule de β -carotène, ce qui lui fait perdre sa

couleur jaune caractéristique, alors que la présence d'un antioxydant peut réduire le blanchiment du β -carotène.

Dans la présente étude, il a été observé que la combinaison du chitosane avec les extraits phénoliques du cœur d'artichaut présentait la plus forte inhibition du blanchiment du β -carotène. L'inhibition par les associations chitosane/extrait méthanolique et chitosane/extrait aqueux était respectivement de 64.49 % et de 78.58 % et n'a montré aucune différence significative ($P>0.05$) (Fig.24).

En outre, l'extrait méthanolique et le chitosane seuls ont présenté une capacité modérée d'inhibition du blanchiment du β -carotène sans pour autant relever une différence significative ($P>0,05$). Les pourcentages d'inhibition obtenus étaient de 41.15 % et de 48.61 %, respectivement (Fig. 24).

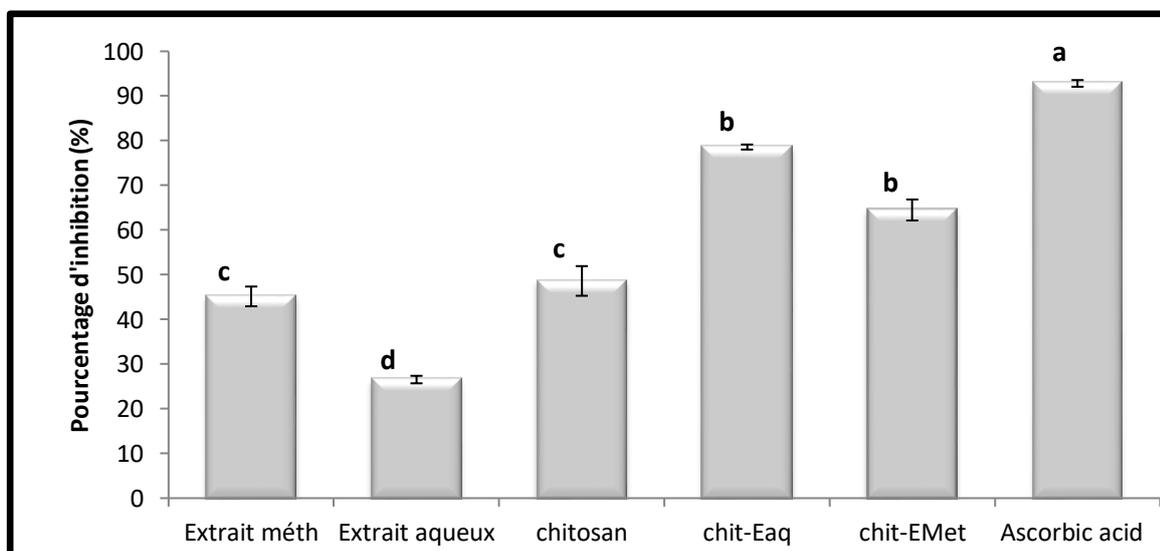


Figure 24. Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits phénoliques méthanoliques et aqueux de cœur d'artichaut, le chitosane, leur association en comparaison avec l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type de 3 déterminations ($n = 3$).

Nos résultats vont de pair avec ceux de Hajji et al. (2015) qui ont enregistré un pourcentage d'inhibition du β -carotène par le chitosane de la crevette commercialisée en Tunisie de l'ordre de 48.6 %.

De plus, l'extrait aqueux d'artichaut avait moins d'effet sur l'inhibition du blanchiment du β -carotène (26.54 %). Néanmoins, aucun extrait, ni le chitosane ni leurs combinaisons ne surpassent la capacité de l'acide ascorbique à inhiber la peroxydation des lipides (92.82 %). Les résultats relatifs à l'effet inhibiteur du blanchiment du β -carotène par l'extrait du cœur d'artichaut obtenus à travers cette étude (45.15%) se rapprochent de ceux de Moussaoui et al. (2020) qui ont décelé un taux d'inhibition du β -carotène par l'extrait des cladodes d'*Opuntia ficus indica* (L.) de l'ordre de 49.64 %, soit une différence d'environ 9%.

Selon les travaux de Abdelmalek et al. (2017), l'activité antioxydante du chitosane a tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration du chitosane. Selon ces auteurs, à des concentrations de 1 et 4 mg/mL de chitosane, l'activité antioxydante du chitosane passe de 38.17 % à 52.56 %, respectivement. D'autre part, Younes et al. (2014) ont rapporté que la capacité antioxydante du chitosane extrait des déchets de crevettes (chitosane-C) était de 33 % à 1 mg/mL ; ainsi le chitosane préparé présentait une activité antioxydante avec un IC50 de 3,3 mg/mL.

Le test du blanchiment du β -carotène apparaît comme un modèle particulièrement efficace pour simuler la peroxydation lipidique au sein des membranes biologiques (Ferreira et al., 2006 ; Moussaoui et al., 2020). Ce test utilise les radicaux peroxydes générés par l'oxydation de l'acide linoléique pour extraire l'hydrogène du chromophore du β -carotène, ce qui entraîne l'atténuation de sa couleur orange caractéristique.

Cette décoloration peut être surveillée à l'aide de la spectrophotométrie (Moussaoui et al., 2020). Néanmoins, la présence d'antioxydants réduit la magnitude de la dégradation et du

blanchiment du β -carotène en neutralisant les radicaux libres du linoléate (Dib et al., 2014 ; Moussaoui et al., 2020).

Selon Tourón et al. (2016), le chitosane a des effets puissants contre la décoloration du β -carotène et qu'il pourrait être utilisé comme antioxydant naturel dans le domaine de la biotechnologie et de l'industrie pharmaceutique.

IV.4.2.2. Inhibition par les extraits phénoliques de pulpe de caroube, le chitosane et leur association

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait de caroube, du chitosane et de leur association en faisant appel au test de blanchiment du β -carotène, en raison de la forte activité biologique de ce dernier, et qui est aussi comme un composé important sur le plan physiologique (Kumazawa et al., 2002). Dans ce travail, il a été constaté que l'association du chitosane avec l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de pulpe caroube avaient le pouvoir inhibiteur du β -carotène le plus élevé avec des pourcentages d'inhibition de 60.07 et 58.18 % ($P > 0,05$), suivi du chitosane seul, l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique de pulpe de caroube avec des valeurs taux respectifs de l'ordre de 48.61, 28.09 et 19.48 % ($P < 0,05$) (Fig. 25).

Les taux d'inhibition du blanchiment du β - carotène enregistrés dans cette étude restent inférieurs à ceux dégagés par Goulas et Georgiou (2019) qui ont relevé des pourcentage d'inhibition du β -carotène de l'ordre de 52.4 et 50.1 % pour l'extrait aqueux et méthanolique obtenus à partir des fruits de caroube récoltés dans la région de Avdimou (chypre). Selon plusieurs études antérieures, les flavonols de la caroube tels que la quercétine, la myricétine et leurs dérivés sont de puissants inhibiteurs de la formation de diènes dans l'émulsion d'acide β -carotène-acide linoléique (Goulas et Georgiou, 2019). Leur activité est attribuée à la présence d'une double liaison entre le C2 et le C3 et d'un hydroxyle libre en position C3 (Burda et Oleszek,

2001) ; par conséquent, une étude chromatographique des extraits de caroube pourrait confirmer cette hypothèse (Goulas et Georgiou, 2019).

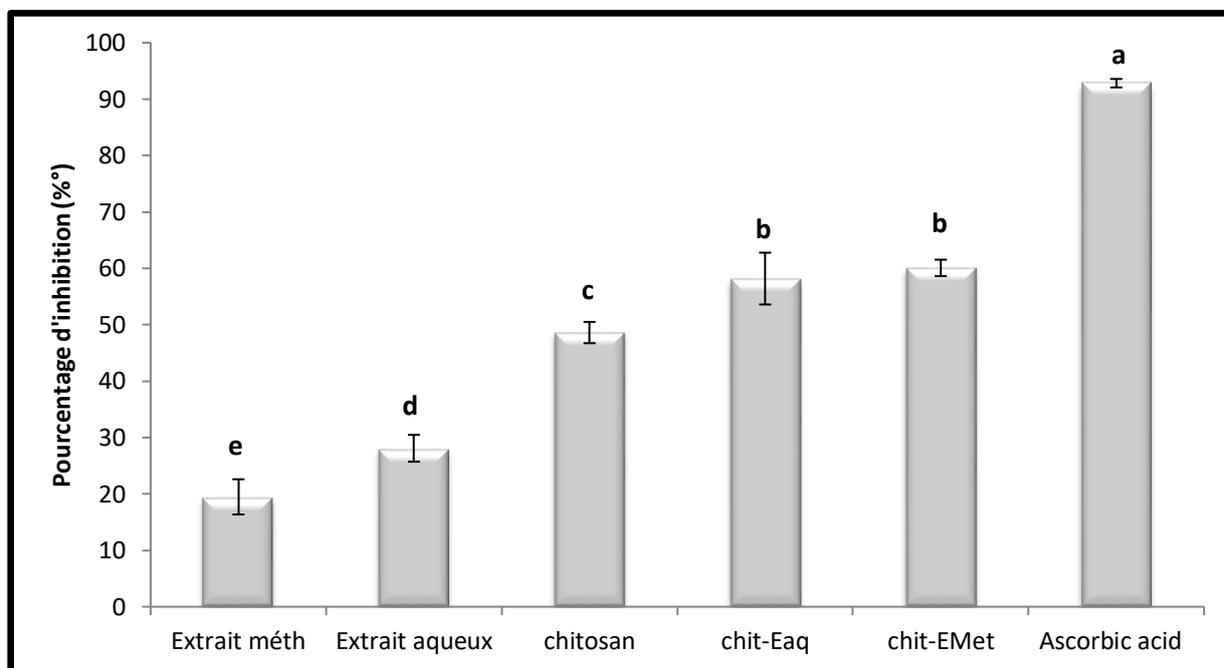


Figure 25. Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits phénoliques méthanolique et aqueux de pulpe de caroube, le chitosane et leur association comparé à celui du standard, l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type de 3 déterminations (n = 3).

IV.5. Activité antibactérienne et concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits phénoliques de coeur d'artichaut et de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.

IV.5.1. Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité des souches

IV.5.1.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques d'artichaut, du chitosane et de leur association a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose sur six souches bactériennes pathogènes : *Staphylococcus Epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Les deux souches bénéfiques testées lors de cette expérimentation sont : *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* et *Lactobacillus Plantarum*. Enfin, l'activité antimicrobienne a été effectuée en faisant appel à la méthode de diffusion en disque sur gélose (Tableau 7).

Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de coeur d'artichaut, le chitosane et leur associations Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 déterminations.

Bacteries testées	Chitosane	Extrait méthanolique	Extrait aqueux	Combinaison chit-MetE	Combinaison chit-AqE
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 49139	14.5 \pm 0.28 ^b	08.33 \pm 0.57 ^{a,b}	6.0 \pm 0 ^a	16.66 \pm 1.15 ^b	10.33 \pm 0.86 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12.5 \pm 0.5 ^b	15.5 \pm 0.16 ^b	8.0 \pm 0.33 ^{a,b}	19.16 \pm 0.28 ^c	20.00 \pm 0 ^c
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	17.0 \pm 0.57 ^c	19.5 \pm 0.57 ^c	14.5 \pm 0.16 ^b	37.5 \pm 0.33 ^e	29.5 \pm 0.66 ^d
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	32.5 \pm 0.5 ^e	18.0 \pm 0.57 ^c	NE	39.0 \pm 0.86 ^f	12.5 \pm 0.33 ^b
<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	10.0 \pm 0.16 ^b	6.0 \pm 0.57 ^a	9.5 \pm 0.5 ^{a,b}	18.0 \pm 0.33 ^c	13.5 \pm 0.16 ^b
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	15.5 \pm 0.28 ^b	14.0 \pm 0.16 ^b	10.0 \pm 0.28 ^b	22.5 \pm 0.5 ^c	20.5 \pm 0.66 ^c
<i>Bifidobacterium. animalis</i> subsp <i>lactis</i>	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus Plantarum</i>	00	00	00	00	00

Comme le montre le tableau 7, les souches bactériennes pathogènes ont été inhibées à des degrés différents par l'extrait d'artichaut (aqueux et méthanolique), le chitosane et leur association ($P < 0.05$). L'extrait méthanolique du cœur d'artichaut s'est avéré être plus actif dans l'inhibition des souches pathogènes que l'extrait aqueux. Les diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes par l'extrait méthanolique variaient de 6 à 19.5 mm, comparativement à ceux affichés avec l'extrait aqueux (6 à 14.5 mm).

La différence entre l'inhibition par les deux extraits pourrait être liée à la plus forte teneur et à la nature des polyphénols présents dans l'extrait méthanolique. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Demir et Agaoglu (2021) qui ont observé que les extraits d'artichaut exerçaient un effet antimicrobien très élevé sur la croissance des bactéries pathogènes alimentaires. Selon ces mêmes auteurs, l'effet inhibiteur des extraits d'artichaut pourrait être attribué à leur richesse en molécules bioactives telles que les polyphénols et les flavonoïdes.

Ces molécules agissent probablement en modifiant la perméabilité des membranes cellulaires et la rigidité de la paroi cellulaire. En conséquence, les constituants cellulaires essentiels peuvent échapper à la détection. Les composés phénoliques et les flavonoïdes peuvent se lier aux protéines solubles et aux enzymes microbiennes pour former différents complexes, induisant ainsi des dommages irréversibles et inhibant les fonctions cellulaires de ces microorganismes (Xie et al., 2017 ; Bouarab-Chibane et al., 2019).

Pour ce qui est du chitosane, ce dernier a montré une activité antimicrobienne importante vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* avec des diamètres de zones d'inhibition respectives de l'ordre de 4.5, 32.5 et 17 mm ; alors que ceux

enregistrés pour les souches Gram-négatives *E. coli* et *Salmonella typhimurium* étaient de 10 et 15.5 mm, respectivement.

Cette observation est en accord avec les recherches antérieures de Prabu et Natarajan (2012) et de Al Qahtani et al. (2020), qui ont rapporté que le chitosane agit comme un agent antimicrobien contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Dans ce contexte, plusieurs mécanismes d'action impliqués dans l'effet antimicrobien du chitosane ont été rapportés.

Selon Prabu et Natarajan (2012), l'interaction électrostatique entre les charges positives des groupes aminés en position C-2 du chitosane et les composants chargés négativement des microorganismes tels que les lipopolysaccharides et les protéines entraîne des dommages significatifs à la structure de la membrane externe des cellules microbiennes. Cela entraîne la perte des constituants cellulaires et par conséquent la mort des cellules. De plus, le chitosane peut se lier à des nutriments essentiels, réduisant leur biodisponibilité et leur utilisation par les microorganismes (Jia et al., 2001).

Dans cette étude, il a été constaté que la combinaison du chitosane avec l'extrait d'artichaut augmentait les diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes pathogènes. Les diamètres des zones d'inhibition variaient de 10.33 à 39 mm lorsque le chitosane était utilisé en combinaison avec les extraits méthanolique ou aqueux. Cela indique que le chitosane et les composés phénoliques ont une action synergique sur l'inhibition de la croissance bactérienne.

Il est à signaler que la présente étude n'a montré aucun effet des différents extraits du cœur d'artichaut et du chitosane ou encore de leur association sur les souches bactériennes bénéfiques, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* et *Lactobacillus platarum*.

IV.5.1.2. Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de pulpe de caroube et de son association avec le chitosane

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques de la pulpe de caroube, du chitosane et de leur association (caroube/chitosane) a été estimée sur les mêmes six souches bactériennes pathogènes et deux souches bénéfiques précédentes.

Comme l'indique le tableau 8, l'inhibition des différentes bactéries pathogènes par l'extrait phénolique de pulpe de caroube (méthanolique et aqueux), le chitosane et leur association (extrait phénolique/chitosane) a été observée à différents niveaux ($P < 0.05$). Le chitosane s'est avéré être plus actif dans l'inhibition de la croissance de la souches *Staphylococcus aureus* (32.5 mm), suivi de l'association chitosane/extrait méthanolique de pulpe de caroube sur la même souche (*S. aureus*) (18.5 mm) ; alors que le chitosane seul inhibe fortement *Listeria monocytogenes* (32.5 mm) et *Salmonella typhimurium* (29.5 mm). *E. coli* a été plus sensible à l'extrait aqueux de pulpe de caroube (14.5 mm).

La résistance bactérienne aux agents antibactériens est devenue un sérieux problème mondial. À titre d'exemple, les infections bactériennes sont responsables de 90% des infections dans les services de santé et dont 70% sont dûes à la résistance des bactéries à au moins un antibiotique (Umberto, 2020). Les principaux composés phytochimiques détectés dans la caroube sont les polyphénols qui comprennent des tanins condensés et hydrolysables, des acides phénoliques, des flavonoïdes et des glycosides flavonoïdes ayant un pouvoir antibactérien et des activités cytotoxiques avérées (Taleb-Contini et al, 2003).

Les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à ceux enregistrés par Tounsi et al. (2020) qui ont conclu que la mélasse de caroube inhibait fortement *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *S. typhimurium*.

Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de la pulpe de caroube, le chitosane et leur association. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM.

Bactéries testées	Chitosane	Ext méthanolique	Ext aqueux	Combinaison chit-MetE	Combinaison chit-AqE
<i>Staphylococcus epidermis</i>	14.5 \pm 0.28 ^{c,d}	8.33 \pm 0.11 ^b	15.00 \pm 00 ^e	13.5 \pm 0.16 ^{b,c}	12.00 \pm 0.57 ^c
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	12.5 \pm 0.5 ^c	11.5 \pm 0.16 ^c	09.33 \pm 0.16 ^b	14.0 \pm 0.57 ^{b,c}	14.5 \pm 0.57 ^{b,c}
<i>Listeria monocytogenes</i>	17.0 \pm 0.57 ^{d,e}	00	05.5 \pm 0.28 ^a	05.33 \pm 0.16 ^a	08.00 \pm 0.57 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	32.5 \pm 0.5 ^f	10.33 \pm 0.28 ^{b,c}	12.33 \pm 0.16 ^c	18.5 \pm 0.5 ^{c,d}	12.00 \pm 0.33 ^c
<i>Escherichia coli</i>	10.0 \pm 0.16 ^c	00	14.5 \pm 0.57 ^d	03.5 \pm 0.28 ^a	02.33 \pm 0.16 ^a
<i>Salmonella typhimurium</i>	15.5 \pm 0.28 ^{d,e}	00	00	01.00 \pm 00 ^a	03.5 \pm 0.5 ^a
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i>	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus plantarum</i>	00	00	00	00	00

Selon Dhaouadi et al. (2014), le sirop de caroube traditionnellement préparé à partir de gousses de caroube tunisiennes a également montré une inhibition importante de la croissance de huit souches bactériennes différentes : *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Salmonella sp.* Les mêmes auteurs ont attribué ce puissant effet antimicrobien à la teneur élevée en polyphénols dans l'extrait de sirop de caroube, principalement l'acide gallique et le gallate d'épigallocatechine.

Le chitosane est également considéré comme étant un agent antifongique et antibactérien, comme il peut interagir avec les cellules, les enzymes ou les matrices polymères chargées négativement (Sahara, 2011).

Il est à noter que le chitosane a montré une efficacité significative ($P < 0.05$) sur la plupart des bactéries pathogènes, soit en agissant seul ou bien en association avec l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de polyphénols. Les résultats relatifs à l'effet antimicrobien du chitosane mis en exergue dans ce travail demeurent similaires à ceux obtenus par Putra et al. (2023) qui ont enregistré des diamètres de zones d'inhibition par le chitosane allant de 10.11 mm à 12.15 mm pour *E. coli* (10 mm pour la présente étude) ; alors que les zones d'inhibition relatives à *S. aureus* étaient comprises entre 10.18 mm et 11.70 mm et restent inférieures à celles de la présente étude (32.5 mm).

L'activité antibactérienne du chitosane dépend du degré de désacétylation, du poids moléculaire, de la concentration utilisée, du solvant utilisé et des espèces de microorganismes ciblés (Putra et al., 2023). La charge positive du groupe NH_3^+ dans le chitosane peut interagir avec la charge négative à la surface des cellules bactériennes (Helander et al., 2001). Les dommages causés au niveau de la paroi cellulaire entraînent un affaiblissement de la résistance de la paroi cellulaire présentant ainsi une forme anormale avec des pores dilatés (Putra et al.,

2023). Selon les mêmes auteurs, cela empêche la paroi cellulaire de réguler l'échange de substances depuis et vers la cellule, puis la membrane cellulaire sera endommagée de sorte que l'activité métabolique sera inhibée et la cellule bactérienne finira par mourir.

De plus, il a été remarqué que la combinaison du chitosane avec les extraits méthanolique et aqueux présentait un effet inhibiteur sur les souches pathogènes avec des diamètres allant de 1mm à 18.5mm ($P < 0.05$). Cependant, cet effet demeure inférieur par rapport à l'utilisation de ces composés d'une manière individuelle (Chitosane seul, extrait méthanolique seul et extrait aqueux seul)

IV.5.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits phénoliques et de leur association avec le chitosane

IV.5.2.1. CMI des extraits phénoliques du cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du chitosane et des différents extraits de cœur d'artichaut sur les souches bactériennes pathogènes ont été déterminées. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 9.

Il a été observé que les souches bactériennes testées étaient plus sensibles au chitosane et aux extraits d'artichaut lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison plutôt que seuls. Ainsi, il a été constaté qu'une faible concentration de chitosane combiné à l'extrait méthanolique de cœur d'artichaut (0,09 mg/mL) était suffisante pour inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (tableau 9). Cependant, lorsque le chitosane et les extraits d'artichaut sont utilisés seuls, des concentrations élevées sont nécessaires pour inhiber la croissance des souches pathogènes.

Les valeurs de CMI observées variaient entre 0.39 et 6.25 mg/mL pour le chitosane utilisé seul ; et entre 0.78 et 3.12 mg/mL pour l'extrait méthanolique de cœur d'artichaut et entre 1.56 et 6.25 mg/mL pour l'extrait aqueux de cœur d'artichaut (tableau 9).

Selon Pattnaik et al. (2022), l'utilisation du chitosane comme antioxydant est limitée en raison de sa faible solubilité et de l'absence de sa capacité de céder l'hydrogène. Par conséquent, le chitosane a été conjugué avec des polyphénols pour surmonter les limites de son utilisation seule, tout en augmentant les effets synergiques potentiels de leur association pour des applications thérapeutiques.

Tableau 9. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/mL) des souches bactériennes pathogènes et bénéfiques par les extraits phénoliques de cœur d'artichaut, le chitosane et leur association.

Souches bactériennes	Chitosane	Methanolic extract	Aqueous extract	Combinaison chit-MetE	Combinaison chit-AqE
<i>Staphylococcus epidermis</i>	3.12	3.12	6.25	0.78	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25	0.78	6.25	0.39	0.78
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.56	0.78	1.56	0.19	0.09
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.39	1.56	-	0.09	0.39
<i>Escherichia coli</i>	3.12	3.12	3.12	0.09	0.39
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.78	1.56	1.56	0.09	0.19

En outre, Lišková et al. (2015) ont observé que les hydrogels de chitosane enrichis en polyphénols présentaient une activité antibactérienne élevée. Plusieurs études ont démontré l'efficacité combinatoire des conjugués à base de chitosane formés à l'aide de polyphénols tels que la curcumine, l'acide gallique, la catéchine et la quercétine (Queiroz et al., 2019).

Pattnaik et al. (2022) ont rapporté que l'efficacité thérapeutique des chitosanes-polyphénols est attribuée à la présence d'un groupe ammonium actif dans le chitosane et aux groupes hydroxyles phénoliques des polyphénols.

IV.5.2.2. CMI des extraits de pulpe de caroube, du chitosane et de leur association.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du chitosane et des différents extraits de pulpe de caroube (méthanolique et aqueux) sur les souches bactériennes pathogènes testées ont été évaluées. Les valeurs relevées sont reportées dans le tableau 10.

Il a été constaté que les souches bactériennes testées étaient plus sensibles au chitosane lorsqu'il était utilisé seul plutôt qu'il soit en association avec l'extrait méthanolique ou l'extrait aqueux de pulpe de caroube, présentant ainsi une concentration minimale d'inhibition de l'ordre de 0.39 mg/mL pour *Staphylococcus aureus* suivie de *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Esherishia coli*, *Staphylococcus epidermis* et enfin de *Pseudomonas aeruginosa* avec des CMI respectives de 0.78, 1.56, 3.12 et 6.25 mg/mL (Tableau 10).

Pour ce qui est de l'association du chitosane avec l'extrait méthanolique de pulpe de caroube, il été observé que la meilleure CMI était de 3.12mg/mL pour *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Il en est de même pour l'association du chitosane avec l'extrait aqueux pour les souches *Staphylococcus epidermis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI de 3.12mg/mL. Enfin, une concentration minimale d'inhibition de

3.12mg/mL a été relevée pour l'extrait aqueux de caroube seul pour la souche pathogène *Escherichia Coli*.

La littérature rapporte que l'activité antimicrobienne du chitosane représentée par sa CMI contre un grand nombre de microorganismes était comprise entre 0.1 et 1% (Sagoo et al., 2002 ; Kanatt et al., 2008). Selon Wang (1992), une action bactéricide du chitosane sur *E. coli* a été démontrée avec le chitosane à des concentrations comprises entre 0.5 et 1% après 48 h d'effet, et pour obtenir le même effet à 24 h, une concentration plus élevée doit être administrée (1% de chitosane).

Tableau 10. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/mL) des souches bactériennes pathogènes et bénéfiques avec les extraits de pulpe de caroube, le chitosane et leur association.

Souches bactériennes	Chitosane	Ext méthanolique	Ext aqueux	Combinaison chit-MetE	Combinaison chit-AqE
<i>Staphylococcus epidermis</i>	3.12	12.5	6.25	3.12	3.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25	6.25	6.25	3.12	3.12
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.56	-	12.5	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.39	12.5	12.5	3.12	6.25
<i>Escherichia coli</i>	3.12	-	3.12	12.5	12.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.78	-	-	-	12.5

En outre, Tsai et Su (1999) ont démontré que des solutions de chitine et de chitosane de poids moléculaire élevé et d'un degré de désacétylation élevé avaient un effet létal sur *E. coli* et *Shigella dysenteriae* à des concentrations comprises entre 50 et 500 ppm.

L'activité antimicrobienne de l'extrait de pulpe de caroube (méthanolique et aqueux) et de son effet synergique avec le chitosane à serait liée à sa richesse en flavonoïdes et en polyphénols qui sont présents dans la plupart des plantes vasculaires (Güven et al., 2006).

Les polyphénols en général e les flavonoides en particulier font encore de nos jours l'objet de recherches et présentent en raison des bienfaits en pharmacologie, en raison de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotectrices, antivirales, antimicrobiennes et anticancéreuses (Livermore, 2002 ; Jung et al, 2006).

IV.6. Activité anti-inflammatoire in vitro et in vivo de l'extrait de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association

Cette expérience a été réalisée en utilisant les extraits phénoliques du cœur d'artichaut seulement, le chitosane et l'association des deux comme échantillons anti-inflammatoires ; et ceci a été motivé par les effets biologiques plus prononcés observés avec ces extraits d'artichaut par rapport à ceux de la pupe de caroube.

L'inflammation joue un rôle important dans l'évolution de plusieurs maladies, et par conséquent les composés ayant des effets anti-inflammatoires sont utilisés pour le traitement des différentes maladies liées à l'inflammation (Virgilio, 2004).

Selon Bawankule et al. (2014), les recherches sur les plantes médicinales utilisées comme analgésiques doivent être considérées comme une nouvelle thérapie dans les maladies inflammatoires. Il est intéressant de noter que l'utilisation des plantes est répandue en médecine traditionnelle en raison du nombre important de composés qu'elles renferment et qui pourraient

servir pour le développement de nouveaux antioxydants et agents anti-inflammatoires (Garcia-La fuente et al., 2009).

IV.6.1. Activité anti-inflammatoire in vitro

IV.6.1.1. Activité anti-hémolytique

Selon Gershfeld et Murayama (1988), lorsque le sang des mammifères est chauffé au-dessus de la température corporelle normale, une hémolyse spontanée des globules rouges se produit. Ainsi, même les petites augmentations de température associées à la pyrexie induisent une hémolyse des érythrocytes humains (Karle, 1968 ; 1969).

Dans cette expérience, il s'agit de tester l'effet protecteur des extraits phénoliques et du chitosane vis-à-vis de l'hémolyse thermo-induite des globules rouges. Pour ce faire, des échantillons de suspension de globules rouges humains (traités avec une solution tampon phosphate saline PBS) sont chauffés à 54°C pendant 20 min en présence de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut, de chitosane ou de l'association des deux.

Selon les différentes concentrations des substances testées (diclofenac, extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut, chitosane et leur association), le pouvoir d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges est compris entre 21.27% et 71.72%.

Il a été constaté qu'à la concentration de 500 µg /mL, le chitosane présente le meilleur effet anti-hémolytique avec un pouvoir d'inhibition de l'ordre de 71.72%, suivi des effets de l'association extrait phénolique aqueux d'artichaut/chitosane, diclofenac et l'extrait d'artichaut avec 69.04%, 66.11% et 55.15% de pouvoir d'inhibition, respectivement (Tableau 11).

À une concentration de 250 µg /mL, cette inhibition de l'hémolyse des globules rouges a été de 55.15%, 50.30%, 49.80% et 41.65% pour le chitosane seul, l'association artichaut/chitosane, diclofenac et l'extrait d'artichaut seul, respectivement.

Tableau 11. Effet anti-hémolytique (en %) de différentes concentrations (500, 250, 125 et 62.5 µg /mL) de diclofenac (standard), de l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association.

Pouvoir d'inhibition de l'hémolyse des globules rouges en %				
Concentrations testées (µg /mL)	Diclofenac	E. Artichaut	Chitosane	Asso Art/Chit
500	66.11	55.15	71.72	69.04
250	49.80	41.65	55.15	50.30
125	33.24	25.09	45.35	36.30
62.5	22.42	21.40	35.41	21.27
IC50	307.90	413.48	210.27	290.91

Quant à l'effet inhibiteur de l'hémolyse à la concentration de 125 µg /mL et à 62.5 µg /mL, le chitosane a gardé son avanve anti-hémolytique bien evidente par rapport aux autres substances testées avec un pouvoir d'inhibition de l'ordre de 45.35% et 35.41%, respectivement (Tableau 11). Les concentrations inhibitrices de 50% de l'hémolyse des globules rouges par l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparée à celui du diclofenac comme anti-inflamatoire standard sont reportées à la figure 26.

le chitosane seul présente la valeur IC50 la plus basse, soit 210.27 µg/mL suivie de l'association artichaut/chitosane, le diclofenac de sodium (anti-inflammatoire standard) et enfin de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut seul avec des valeurs IC50 de 290.91µg/mL, 307.90

µg/mL et 413.48 µg/mL, respectivement ; soit des différences de 27.71%, 31.71% et de 49.14% par rapport à la valeur du chitosane seul qui demeure le composé ayant la meilleure activité anti-inflammatoire.

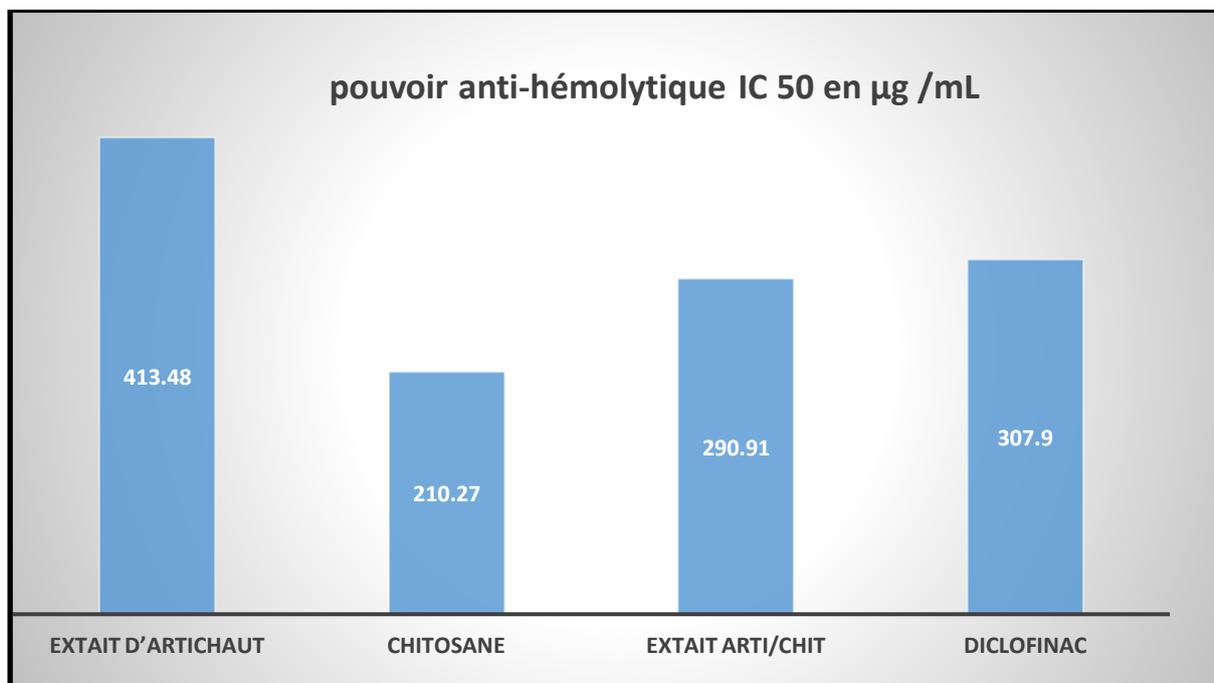


Figure 26. Les concentrations inhibitrices de 50% de l'hémolyse des globules rouges par l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, le chitosane et de leur association comparée à celui du diclofenac comme anti-inflammatoire standard. Les concentrations indiquées sont en µg/mL.

Les érythrocytes sont des cellules très sensibles au stress oxydatif à cause de leur richesse en composés lipidiques membranaires et en acides gras polyinsaturés vulnérables à l'oxydation. Cette réaction induit la production des substances réactives à l'oxygène (ROS) par les cellules inflammatoires activées (Nabavi et al., 2013 ; Liao et al., 2016). De plus, la présence d'hémoglobine en grande quantité expose également les globules rouges à des niveaux élevés d'auto-oxydation (Chansiw et al., 2018).

Selon Tuorkey et al. (2022), à une concentration de 540 µg/mL, le chitosne induit une inhibition de 50% de l'hémolyse érythrocytaire induite par une solution hypotonique. Cette valeur est largement supérieure à celle enregistrée dans la présente étude (210.27 µg/mL), soit une différence de 2.56 fois. Pour ce qui est de l'effet anti-hémolytique de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut, l'IC₅₀ relevée était de l'ordre de 413.48 µg/mL et laisse conclure que cet extrait présente le plus faible effet anti-hémolytique.

Cette valeur dépasse largement celle enregistrée par Mandim et al. (2021) qui était de 154 µg/mL pour l'espèce *Cynara cardunculus* L.

IV.6.1.2. Pouvoir inhibiteur de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf

Dans la présente étude, la dénaturation des protéines du blanc d'œuf a été retenue pour évaluer in vitro les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut (*C. scolymus*), du chitosane et de leur association en comparaison à un anti-inflammatoire de référence (standard), le diclofenac de sodium.

La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes avérées des maladies inflammatoires et arthritiques (Sangita et al, 2012) car la production d'autoantigènes dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation des protéines in vivo (Umapathy et al., 2010).

Le tableau 12 présente les résultats relatifs au pouvoir d'inhibition de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf en % par l'extrait phénolique de cœur d'artichaut, le chitosane ou l'association des deux en comparaison avec un anti-inflammatoire de référence (standard), le dichlofenac.

Sur le plan des concentrations inhibitrices de 50% de la dénaturation thermo-induite des protéines du blanc d'œuf (IC₅₀), il a été constaté que le diclofenac est doté du meilleur effet inhibiteur de cette dénaturation des protéines avec la plus faible IC₅₀ (9.35µg/mL), suivi de l'association extrait phénolique d'artichaut/chitosane, du chitosane seul et enfin de l'extrait

phénolique d'artichaut seul (*C. scolymus*) avec des IC50 de 15.78µg/mL, 20.50µg/mL et 33.58µg/mL, respectivement (fig.27).

Tableau 12. Taux d'inhibition de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf par différentes concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5 et 25 µg /mL) d'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut (*C. scolymus*), du chitosane, et par leur association en comparaison avec celui du diclofenac comme anti-inflammatoire standard utilisé aux mêmes concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5 et 25 µg /mL).

Pouvoir d'inhibition de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf en %				
Concentrations testées en µg /mL	Diclofenac	E. Artichaut	Chitosane	Asso Art/Chit
1,56	40.11	11.86	18.64	24.29
3,12	42.93	12.42	25.98	31.63
6,25	49.15	13.55	29.95	35.59
12,5	54,23	30,5	37,15	37,85
25	65.53	37.85	18.64	46.67
IC50 en µg /mL	9.35	33.58	20.50	15.78

Les résultats de cette étude vont de pair avec les travaux de Khushboo et al. (2019) qui ont conclu que le diclofenac présente un meilleur effet inhibiteur de la dénaturation par rapport au chitosane. L'IC50 décelé était de 53.57 µg/mL pour le diclofenac contre 97.72 µg/mL pour le chitosane extrait à partir de l'exosquelette de *Sartoriana spinigera* .

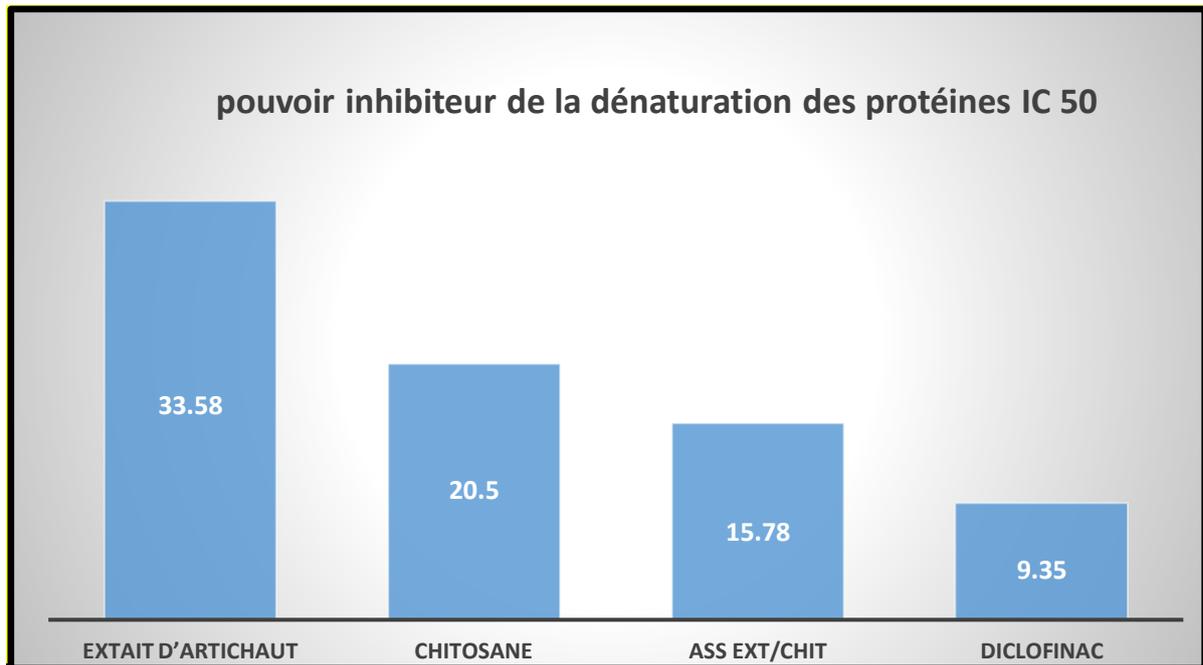


Figure 27. Effet inhibiteur de la dénaturation des protéines du blanc d'œuf par l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparée à celui du diclofenac comme anti-inflammatoire standard.

IV.6.2. Activité anti-inflammatoire in vivo

Tout comme dans l'expérience in Vitro, dans cette expérience in Vivo, seuls l'extrait aqueux de cœur d'artichaut, le chitosane et leur association ont été testés comme anti-inflammatoires en raison de leurs meilleures propriétés biologiques observées précédemment dans le reste du protocole de ce travail.

Les taux d'inhibition de l'inflammation provoquée par la carraghénine dans les différents lots de rats Wistar traités par le diclofenac comme anti-inflammatoire de référence (standard), ainsi que par les extraits phénoliques de cœur d'artichaut, le chitosane et par leur association (extrait/chitosane) se situent entre 16.79 et 48.41% après la première heure d'injection de la carraghénine (H1), entre 20.23 et 73.43% après la deuxième heure (H2), entre 45.17 et 75.65 %

après la troisième heure (H3), entre 59.76 et 78.78 % après la quatrième heure, entre 52.48 et 94.85 % après la cinquième heure (H5) et entre 51.11 et 84.73 % après la sixième heure d'administration de carraghénine H6) (Tableau 13).

Après une heure d'injection de l'agent inflammatoire, la carraghénine, il a été observé que l'association de l'extrait aqueux de cœur d'artichaut avec le chitosane a présenté le taux le plus élevé d'effet anti-inflammatoire avec un pourcentage de 48.41 % et une diminution significative du diamètre de la patte de rat de l'ordre de 4.21 mm par rapport au témoin, suivi du chitosane seul, du diclofenac (comme anti-inflammatoire de référence) et de l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut seul avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 34.03, 33.60 et 16.79 % et des diamètres pattes correspondants de 4.30 mm, 4.35 mm et 4.59 mm, respectivement

Deux heures après l'injection de carraghénine, le diclofenac a enregistré le taux d'inhibition le plus important (73.43%) suivi de celui de l'association extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut/chitosane (66.43 %), du chitosane seul (63.06 %) et enfin de l'extrait aqueux de cœur d'artichaut seul (20.33%). Ces taux d'inhibition sont positivement corrélés avec une diminution hautement significative des diamètres des pattes des rats traités avec le diclofenac (4.02 mm), avec l'association extrait phénolique aqueux/chitosane (4.09 mm), ou encore avec le chitosane seul (4.14 mm) par rapport au témoin (4.87 mm) (Fig. 28).

Après 4 heures d'effet de la carraghénine, l'association de l'extrait phénolique d'artichaut/chitosane a montré un pourcentage d'inhibition de l'inflammation de l'ordre de 78.78%, dépassant à ce stade ceux du Diclofenac (76.05%), du chitosane (75.73%) et de l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut (59.76%).

Tableau 13. Taux d'inhibition de l'inflammation (en %) provoquée par la carraghénine dans les différents lots de rats wistar traités par le diclofenac, l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, le chitosane et leur association (extrait/chitosane) durant 6 heures post-injection de carraghénine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 déterminations.

Anti-inflam. Heures post injection	Diclofenac	Extrait phénolique aqueux	Chitosane	Extrait phénolique + chitosane
H1	33.6 \pm 37.61	16.79 \pm 1 3.05	34.03 \pm 31.47	48.41 \pm 21.87
H2	73.43 \pm 10.24	20.23 \pm 9.93	63.06 \pm 7.93	66.43 \pm 12.96
H3	75.65 \pm 13.38	45.17 \pm 24.71	66.85 \pm 29.36	68.88 \pm 27.31
H4	76.05 \pm 22.93	59.76 \pm 19.74	75.73 \pm 13.64	78.78 \pm 29.46
H5	94.85 \pm 22.93	52.48 \pm 15.92	68.8 \pm 26.25	85.96 \pm 17.05
H6	84.73 \pm 17.1	51.11 \pm 20.9	63.67 \pm 17.14	83.66 \pm 21.21

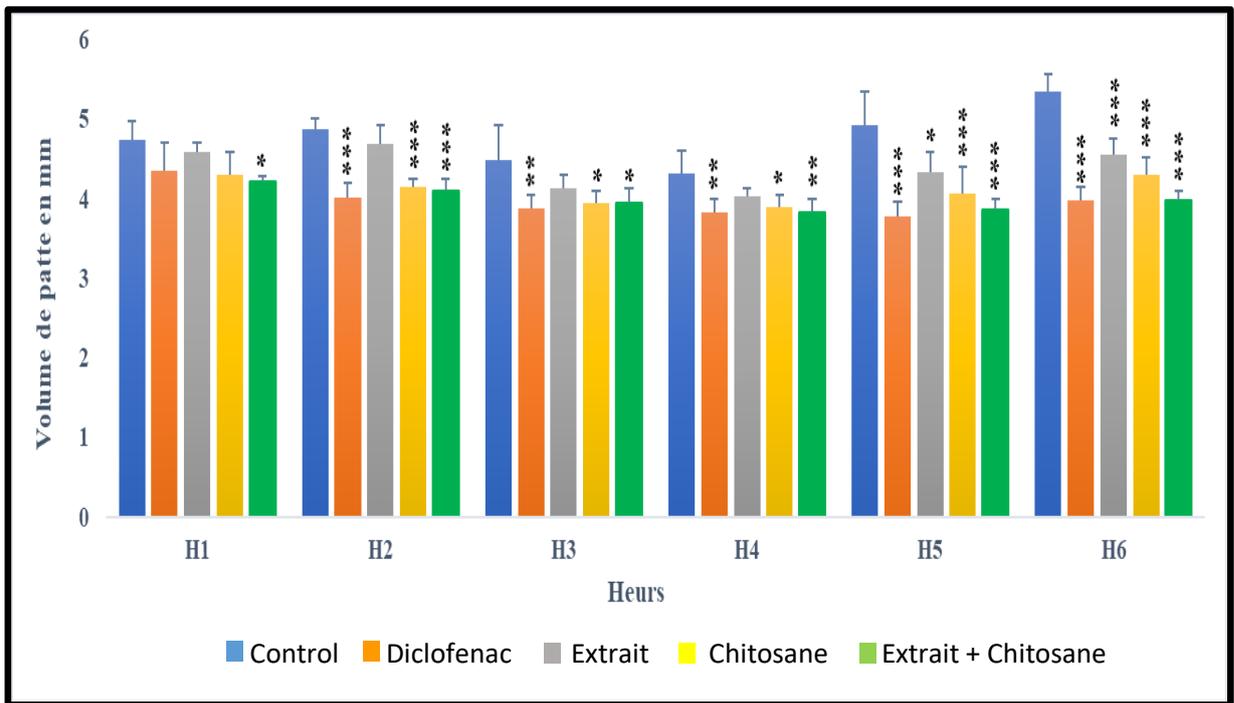


Figure 28. Effet de l'extrait phénolique aqueux de coeur d'artichaut, du chitosane et de leur association comparé à celui du dichlofenac comme anti-inflamatoire standard sur l'épaisseur des oedèmes de pattes des rats Wistar 6h après avoir reçu de la carraghénine 1%. (* : $P < 0,05$ significatif, ** : $P < 0,01$ très significatif, *** : $P < 0,001$ hautement significatif).

Pour ce qui est des diamètres des pattes des rats, il en ressort qu'en général, l'association de l'extrait phénolique de coeur d'artichaut avec le chitosane présente une réduction très significative du volume des pattes par rapport au témoin avec une valeur de 3.82 mm ; alors que l'extrait phénolique de coeur d'artichaut seul a enregistré une différence non significative de diamètre de patte de l'ordre de 4,02 mm (fig.28).

Les taux d'inhibition ainsi que les diamètres des pattes des rats évoluent après l'injection de carraghéine. C'est ainsi que les valeurs relevées 5 heures après l'injection du carraghéine, ont révélé que l'effet du diclofenac (94.85%- 3.77 mm) dépasse largement ceux de l'association de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut avec le chitosane (85.96% -3.86 mm), du chitosane

seul (68.8% - 4.06 mm) et de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut seul (52.48% - 4.34 mm) (fig. 28).

Enfin, il est à noter que 6 heures après l'induction de l'œdème par la carraghénine, il a été constaté que l'association extrait phénolique d'artichaut/chitosane a un effet quasi identique à celui du dichlofénac (84.73 vs 83.66 %) qui reste très légèrement supérieur (de moins de 1%) dans l'effet de régression de l'œdème induit.

Les résultats obtenus dans le présent travail vont de pair avec ceux de Ben Salem et al. (2017) qui sont arrivés à la conclusion que l'extrait d'artichaut récolté en Tunisie présente effectivement un effet anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition dépassant les 70% après 5 heures d'injection de carraghénine et un diamètre des pattes des rats de 1.12 mm contre 3.02 mm pour les rats du témoin positif (rats carraghénine + et non traités par l'extrait d'artichaut).

Selon les mêmes auteurs, l'injection de carraghénine dans les pattes des rats provoque un œdème qui commence par la phase vasculaire de l'inflammation. Cette dernière génère par conséquent une augmentation de la taille de l'œdème avec le temps. Il importe de signaler que l'espèce végétale *Cynara scolymus* est l'une des plantes médicinales qui présente un effet potentiellement bénéfique attribué à sa richesse en composés polyphénoliques (Salem et al., 2015).

Selon les travaux de Schapoval et al. (1998), le verbascoside (un composé polyphénolique de l'artichaut) présente des activités anti-œdémogènes provoqués par la carraghénine chez des animaux modèles.

D'autres travaux de recherche ont également montré que l'activité anti-inflammatoire du verbascoside a été évaluée par un test in vitro réalisé sur des cultures cellulaires de kératinocytes primaires humains (Middleton, 1998), et cette molécule a pu réduire la libération des marqueurs

pro-inflammatoires tels que les chimiokines (Ben Salem et al., 2017). Une autre molécule de la famille des flavonoïdes « L'apigénine-7-glucoside » s'est avérée bloquer la libération de plusieurs enzymes impliquées dans l'inflammation, à savoir les lipoxygénases et les cyclooxygénases (Baumann et al, 1980 ; Dos Santos et al, 2006).

Quant à l'effet du chitosane, les résultats de cette étude sont en accord ceux de Saeedan et al. (2014) qui ont étudié l'effet anti-inflammatoire du chitosane chez des rats Wistar et ont déduit que le chitosane réduit de 40% l'inflammation induite par la carraghénine 6 heures après son injection.

Plusieurs chercheurs ont conclu que le chitosane présente divers effets biologiques bénéfiques, en particulier des activités antimicrobiennes, immunitaires (Chakrabarti et al., 2014) et antitumorales (Yang & Zaharoff, 2013). D'autre part, certaines études ont démontré que le chitosane ainsi que la chitine jouent un rôle de régulateur de l'activité inflammatoire dans les macrophages (Shun-Hsien et al., 2019).

De plus, le chitosane extrait des carapaces de crevettes est une source marine potentielle avec diverses activités biologiques (Mittal et al., 2022). Selon Dwi Kurnia et Endang (2022), le chitosane a un effet analgésique suite à son application à deux concentrations différentes (50mg et 100mg/L/200g de poids corporel) sur des rats *Sprague Dawley* en diminuant la douleur de 31.29 et 35.29 %, respectivement et demeure plus efficace que le diclofenac sodique (20.73%).

En épilogue, il est à signaler que l'association de l'extrait phénolique de cœur d'artichaut et du chitosane génère des effets anti-inflammatoires comparables à ceux procurés par le médicament de référence, le dichlofenac.

Cela constitue une alternative dans la substitution des AINS (Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens) par des substances anti-inflammatoires naturelles ayant probablement moins d'effets secondaires indésirables.

Conclusion

Conclusion

Les propriétés biologiques du chitosane et des composés phénoliques sont bien connues. Cependant, quand ils sont utilisés individuellement, leurs effets bénéfiques recherchés peuvent être limités. C'est pourquoi leur association a été envisagée dans ce travail pour explorer et exploiter la synergie de leurs effets biologiques à retombées sanitaires.

Dans la présente étude, les propriétés biologiques du chitosane associé ou non à des extraits phénoliques de *ceratonia celiqua* ou de *cynara scolymus* ont été étudiées.

Le chitosane a été extrait à partir de carapaces de crevettes par méthode chimique avec un rendement d'extraction de 5.80 ± 1.09 %.

L'analyse de la composition chimique du chitosane de carapace de crevette préparé a montré qu'il contient 4.43 ± 0.57 d'eau, 1.32 ± 0.62 de cendres et 0.18 ± 0.04 % de protéines. Son poids moléculaire et son degré de désacétylation sont 859.48 ± 21.62 KDa et 75%, respectivement.

Deux solvants (l'eau et le méthanol) ont été utilisés pour la préparation des extraits phénoliques de cœur d'artichaut (*Cynara scolymus*) et de pulpe de caroube (*Ceratonia celiqua*). Les rendements d'extraction obtenus respectivement par l'eau et le méthanol pour l'artichaut sont 12.34 ± 0.75 et 9.86 ± 1.08 ; alors que pour la pulpe de caroube ils sont de 3.18 ± 0.26 et 8.33 ± 1.35 .

Les résultats de cette ont montré la présence de quantités appréciables de polyphénols de flavonoïdes dans les différents extraits préparés. De même, il a été observé que la combinaison du chitosane aux extraits phénoliques de cœur d'artichaut (*C. scolymus*) avait un effet significatif ($P < 0.05$) sur la réduction du radical libre DPPH et la prévention de la dégradation

du β -carotène par rapport au chitosane seul, aux extraits de cœur d'artichaut seuls ou ceux de la pulpe de caroube (*Ceratonia siliqua*) seuls. Ce constat est le même pour l'association du chitosane aux extraits de la pulpe de caroube dont la synergie est moins forte que celle du chitosane associé aux extraits phénoliques de cœur d'artichaut.

En outre, les combinaisons du chitosane aux extraits phénoliques de cœur d'artichaut inhibent la croissance des cinq bactéries pathogènes d'une manière significative ($P < 0.05$). Les souches pathogènes testées ont également été relativement sensibles aux extraits phénoliques aqueux et méthanolique de la pulpe de caroube, mais à un degré moindre par rapport au chitosane ou à son association avec les extraits phénoliques de cœur d'artichaut. Dans les deux cas, il a été observé une synergie dans cette activité antimicrobienne entre le chitosane et les extraits phénoliques de l'artichaut ou de la pulpe de caroube.

En revanche, les souches bénéfiques (*Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* et *Lactobacillus plantarum*) n'ont pas été sensibles au chitosane et aux extraits phénoliques.

L'activité antiinflammatoire du chitosane, de l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut et de leur association a été déterminée *in vitro* et *in vivo*. L'association des polyphénols d'artichaut et du chitosane a été plus efficace dans l'inhibition de l'inflammation induite par la carraghénine chez le rat Wistar (taux d'inhibition de l'ordre de 83.66 ± 21.21 %) par rapport à l'utilisation séparée du chitosane seul (taux d'inhibition = 63.67 ± 17.14) ou de l'extrait phénolique d'artichaut seul (taux d'inhibition = 51.11 ± 20.90). Ceci met en évidence l'importance de l'action synergique du chitosane et des polyphénols dans l'inhibition de l'inflammation.

La même observation a été faite *in vitro* lorsqu'il s'agissait de l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges thermo-induite. Cette hémolyse a été inhibée à un taux compris

entre 21.27 et 71.72 % selon la substance utilisée ; et c'est le chitosane seul qui a été le plus efficace (taux d'inhibition de 71.72 %) dans cette action, plus efficace que son association avec l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut.

En revanche, il s'est avéré que c'est l'action synergique de l'association du chitosane avec l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut qui a été la plus efficace dans l'inhibition de la dénaturation thermo-induite des protéines du blanc d'oeuf.

Les oedèmes induits par la carraghénine chez le rat Wistar ont été significativement réduits à un taux de plus de 83% par l'action synergique du chitosane associé à l'extrait phénolique aqueux de cœur d'artichaut ; alors que des réductions de l'inflammation de 63.67 et 51.11 % ont été respectivement enregistrées avec le chitosane et l'extrait phénolique de cœur d'artichaut quand ils sont utilisés séparément.

Sur le plan des perspectives, les résultats obtenus dans cette étude suscitent de l'intérêt quant à l'exploration des synergies possibles entre des substances naturelles bon marché ou parfois inexploitées en vue d'élaborer des compléments alimentaires et des conservateurs exempts d'additifs à effet cumulatif néfaste pour la santé de l'homme.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abd El-Ghani Z.M. (2017). Evaluation of Antibacterial Activity, Gas Chromatography Analysis and Antioxidant Efficacy of Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, Vol. 8, issue 11, pp :265-280, 2017. DOI: [10.21608/JACB.2017.38907](https://doi.org/10.21608/JACB.2017.38907)
2. Abdelmalek B.E., Assaâd S., Haddar, A., Bougatef A., and Ayadi M.A. (2017). β -chitin and chitosan from squid gladius : Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A) : 953-962. 2017. Doi : [10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107).
3. Akakuru OU, Louis H. Amos PI., Akakuru OC., Nosike EI., Ogulewe EF. (2018). The Chemistry of Chitin and Chitosan Justifying their Nanomedical Utilities. *Biochemistry and Pharmacology* 2018. 7 : 1. DOI: [10.4172/2167-0501.1000241](https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000241)
4. Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Salameh N.M. (2013). Complementary and alternative medicine (CAM) use among hypertensive patients in Palestine. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2013, 19, 256–263, 2013. DOI: [10.1016/j.ctcp.2013.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2013.09.001)
5. Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., and Muniglia, L. (2014). Laccase-catalyzed functionalization of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, 161, 279-287. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.03.076](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.076)
6. Al Qahtani F., Aleanizy F., El Tahir E, Alhabib H, Alsaif R., Shazly G, AlQahtani H, Alsarra I., Mahdavi J. (2020) Antibacterial activity of chitosan nanoparticles against pathogenic *N. gonorrhoea*. *International Journal of Nanomedicine* 15, 7877–7887. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272736>.
7. AOAC. (1995). Official methods of analysis 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.

- 8.** Araiza R.N.R., Rochas C., David L., Domard A. (2008). Interrupted Wet-Spinning Process for Chitosan Hollow Fiber Elaboration. *Macromolecular Symposia* 2008 ; 266 :1–5.
doi: 10.1002/masy.200850601.
- 9.** Asensi M., Ortega A., Mena S., Feddi F., Estrela J.M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011, 48, 197–216, 2011.
DOI: [10.3109/10408363.2011.631268](https://doi.org/10.3109/10408363.2011.631268)
- 10.** Audigié C. I., Figarella J. et Zonszain F. (1978): Manipulation d'analyses biochimique, Doin Editeurs, Paris, France, 240 p
- 11.** Avallone R, Plessi M, Baraldi M, and Monzani A. (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* 10, 166–172, 1997.
<https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0528>
- 12.** Ayaz F.A., Torun H., Robert H. Glew Z.D. Luther B.T, Chuang J.M., M. Presley M., Andrew R. (2009). Nutrient Content of Carob Pod (*Ceratonia siliqua L.*) Flour Prepared Commercially and Domestically, *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009, 64:286–292.
DOI: [10.1007/s11130-009-0130-3](https://doi.org/10.1007/s11130-009-0130-3)
- 13.** Baumann J., Von Bruchhausen F., and Wurm G. (1980). Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation, *Prostaglandins*, vol. 20, no. 4, pp. 627–639, 1980. DOI: [10.1016/0090-6980\(80\)90103-3](https://doi.org/10.1016/0090-6980(80)90103-3)
- 14.** Bawankule DU., Trivedi P., Pal A., Shanker K. , Singh M., Sharma P., Khan F., Maurya AK. Verma RK., Gupta MM. (2014) “Protective mechanism of lignans from *Phyllanthus amarus* against galactosamine/ lipopolysaccharide-induced hepatitis : an in-vivo and in-silico studies,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 8, pp. 1045–1055, 2014.
<https://doi.org/10.2174/1875399X02013010097>
- 15.** Baytop T. (1984). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present).*; No: 3255; Istanbul University Press: Istanbul, Turkey, 1984; p. 359.

- 16.** Benali A., Haremarugira S., Bitar A., El Maadoudi E.H., Kabbour M.R., Noutfia Y. (2022). Composition en antioxydants et activité coagulante des artichauts sauvage et cultivé au Maroc (*Cynara cardunculus* L.). African Mediterranean Agricultural Journal, Al Awamia (134). p. 200-216, 2022.
- 17.** Benbettaïeb, N. ; Tanner, C.; Cayot, P.; Karbowiak, T.; Debeaufort, F. (2018). Impact of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings. *Food Chem.* 2018, 242, 369–377. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.065.
- 18.** Ben Dhiab M., Jdidi M., Nouma Y., Ben Mansour N., Belhadj M., Souguir M.K. (2014). Accidental hanging : a report for four cases and review of the literature. *Journal of Clinical Pathology and Forensic Medicine*, vol. 5(1), february 2014, pp : 5-1. DOI:10.5897/JCPFM2013.0043
- 19.** Ben Salem M., Affes H., Athmouni K., Ksouda K., Dhouibi R., Sahnoun Z., Hammami S., and Zeghal K.M.. (2017). Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. doi: 10.1155/2017/4951937.
- 20.** Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- 21.** Boeing J.S., Barizão E.O., Silva B.C., Montanher P.F., De Cinque Almeida V., Visentainer J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal* 8(1):1–9, 2014. DOI: [10.1186/s13065-014-0048-1](https://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1)
- 22.** Bolat Y., Bilgin s., Günlü A., Izci L., Koca S.B. , Çetinkaya S., Koca H.U. (2010). Chitin-Chitosan Yield of Freshwater Crab (*Potamon potamios*, Olivier 1804) Shell. *Pakistan Veterinary Journal*, 30 (4): 227-231, 2010.

- 23.** Bornet, A. and Teissedre, P.-L. 2005. Applications and interest of chitin, chitosan and their derivatives in enology. *OENO One*. 39, 4 (Dec. 2005), 199–207. DOI:<https://doi.org/10.20870/oenone.2005.39.4.890>
- 24.** Bouarab-Chibane L., Forquet V., Lantéi P., Clément Y., Léonard-Akkari L., Oulahal N., Degraeve P., Bordes C. (2019). Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship). *Models*. 18;10(829): 1-23, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>.
- 25.** Brasselet C., Pierre G., Dubessay P., Dols-Lafargue M., Coulon J., Maupeu J., Vallet-Courbin A., de Baynast H., Doco T., Michaud P., Delattre C. (2019). Modifications of chitosan for the generation of functional derivatives, 2019. *Applied Sciences*, 2019, 9 (7) 1321; <https://doi.org/10.3390/app9071321>
- 26.** Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance (1998). *Nutrition Reviews*, Vol. 56, No. 11, 1998. DOI: [10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x)
- 27.** Brglez Mojzer E., Knez Hrnčič M., Škerget M., Knez Ž, Bren U. (2016). Polyphenols : Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 2016, Jul 11;21(7):901, 2016. doi: [10.3390/molecules21070901](https://doi.org/10.3390/molecules21070901).
- 28.** Brillouet J.M., Romieu C., Schoefs B., Solymosi K., Cheynier V., Fulcrand H., Verdeil J.L., Conejero G., (2013). The Tannosome Is an Organelle Forming Condensed Tannins in the Chlorophyllous Organs of Tracheophyta. *Annals of Botany*, 112, 1003-1014, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mct168>.
- 29.** Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie-plantes médicinales*, 4ème édition Lavoisier, collection Tec et Doc, Revue et augmentée, p. 366, 2009.
- 30.** Bucciattini, M., Leri, M., Nardiello, P., Casamenti, F., Stefani, M., (2021). Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Antioxidants*, 10, 1044, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10071044>.

- 31.** Burda, S.; Oleszek, W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 2774–2779. doi: 10.1021/jf001413m
- 32.** Bustos, R.O. and Healy, M.G. (1994) Microbial Deproteinization of Waste Prawn Shell. *Institution of Chemical Engineers Symposium Series, Institution of Chemical Engineers, 1994, Rugby, 13-15.*
- 33.** Calixto FS, Perez-Jiménez J., (2018). Non-extractable Polyphenols and Caroténoids, Importance in “Human Nutrition and Health”. *Food Chemistry, Fonction and Analysis n°05, Book, 382 pages.*
- 34.** Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science* 2004 Mar 12; 74 (17): 2157–2184. DOI: [10.1016/j.lfs.2003.09.047](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047)
- 35.** Causse C. (2005). *Les secrets de santé des antioxydants*, Livre, Editions Alpen, 94p.
- 36.** Chakrabarti D., Talukdar A. Pal M.R. (2014). Immunomodulation of macrophages by methylglyoxal conjugated with chitosan nanoparticles against Sarcoma-180 tumor in mice, *Cell Immunology* 287(1) (2014) 27-35. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.11.006.
- 37.** Chansiw N, Paradee N, Chotinantakul K, Srichairattanakool S. (2018). Antihemolytic, antibacterial and anti-cancer activities of methanolic extracts from leaves and stems of *Polygonum odoratum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 8(12) :580, 2018. DOI: 10.4103/2221-1691.248094
- 38.** Chatelet, C., Damour, O. & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films., *Biomater* (22): 261-268, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00183-6)
- 39.** Chen X., Lan W., Xie J. (2024). Natural phenolic compounds : Antimicrobial properties, antimicrobial mechanisms, and potential utilization in the preservation of aquatic products. *Food Chemistry* Volume 440, 15 May 2024, 138198. DOI: [10.1016/j.foodchem.2023.138198](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138198)

- 40.** Ciancolini A., Alignan M., Pagnota MA., Miquel J., Vilarem G., Crino P. (2003). Morphological characterization, biomass and pharmaceutical compounds in Italian globe artichoke genotypes. *Industrial Crops and Products*, Volume 49, August 2013, Pages 326-333. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.05.015
- 41.** Collin S., Crouzet J. (2011). *Polyphénols et Procédés*, Livre, Editions Lavoisier, collection Tec et Doc, 333 pages.
- 42.** Coppo E, Marchese A., (2014). Antibacterial Activity of Polyphenol, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol 15, N°04, p.386, 2014. DOI: [10.2174/138920101504140825121142](https://doi.org/10.2174/138920101504140825121142)
- 43.** Crini, G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters* 17, 1623–1643 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
- 44.** Croisier, F. and Jérôme C. (2013) Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal*, 49, 780-792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- 45.** Cuero R.G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan. *Experientia Supplementum* 01 Jan 1999, 87:315-333. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8757-1_23
- 46.** Dahmani W., Elaoui N., Abousalim A., Akissi ZLE. , Legssyer A., Ziyat A., and Sahpaz S. (2023). Exploring Carob (*Ceratonia siliqua* L.): A Comprehensive Assessment of Its Characteristics, Ethnomedicinal Uses, Phytochemical Aspects, and Pharmacological Activities. *Plants*, 12, 3303, 2023. doi.org/10.3390/plants12183303.
- 47.** Darwish WS, El Sayed Khadr A, Kamel M.A.E.N., Abd Eldaim M.A., El Sayed I.E.T., Abdel-Bary H.M., Ullah S., Ghareeb D.A. (2021). Phytochemical Characterization and Evaluation of Biological Activities of Egyptian Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) Aqueous Extract: In Vitro Study. *Plants*, 10, 2626, 2021. doi.org/10.3390/plants10122626
- 48.** Davydova, V.N., Kalitnik, A.A., Markov, P.A. Volod'ko A.V., Popov S.V., Ermak I.M. (2016). Cytokine-inducing and anti-inflammatory activity of chitosan and its low-molecular

derivative. *Applied Biochemistry and Microbiology* **52**, 476–482 (2016).
<https://doi.org/10.1134/S0003683816050070>

49. De Araujo F, De-Paulo Farias D, Neri-Numa I A, Pastore G M., (2021). Polyphenols and their applications: An Approach in Food Chemistry and Innovation Potential, *Food Chemistry* vol. 338 (2021) 127535, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.07.014>

50. Demir T and Agaoglu S. (2021). Antioxidant, antimicrobial and metmyoglobin reducing activity of artichoke (*Cynara scolymus*) powder extract-added minced meat during frozen storage. *Molecules*; 26(18):5494, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26185494>.

51. Dhaoudji K., Belkhir M., Akinochi I., Raboudi F., Pamies D., Barrajon E., Estevan C., Fattouch S. (2014). Sucrose supplementation during traditional carob syrup processing affected its chemical characteristics and biological activities. *Food Science and Technology*. Volume 57, Issue 1, June 2014, Pages 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.025>

52. Dib, H., Belarbi, M., Beghdad, M. C., & Seladji, M. (2014). Antioxidant activity of *Opuntia ficus-indica* flowers phenolic extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5, 4574-82, 2014. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(10).4574-82.

53. Dos Santos M. D., Almeida M. C., Lopes N. P., and De Souza G. E. P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 11, pp. 2236– 2240, 2006. DOI: [10.1248/bpb.29.2236](https://doi.org/10.1248/bpb.29.2236)

54. Dosi R., Daniele A., Guida V., Ferrara L., Severino V., Di Maro A. (2013). Nutritional and metabolic profiling of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L. 'Capuanella' heads) in province of Caserta, Italy, *Australian Journal of Crop Science*, 7(12):1927-1934, 2013. https://www.cropj.com/dimaro_7_12_2013_1927_1934.pdf

55. Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, Vol 28/Issue 3, 1956. <https://pubs.acs.org> > doi

- 56.** Dwi Kurnia Putri, Endang Darmawan, (2022). Analgesic Activity of Chitosan in Arthritis Rats Induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA), *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, Vol.19 No. 01: 132-141, 2022. DOI: [10.30595/pharmacy.v19i1.13842](https://doi.org/10.30595/pharmacy.v19i1.13842)
- 57.** El Batal H, Hasib A, Dehbi F, Zaki N, Ouattmane A, Boulli A. (2016). Assessment of nutritional composition of Carob pulp (*Ceratonia Siliqua* L.) collected from various locations in Morocco, *Journal of Materials and Environmental Sciences* 7 (9), 2016. <http://www.jmaterenvironsci.com>
- 58.** El Bouzdoudi B., Nejjar El Ansari Z., Mangalagiu I., Mantu . D, Badoc A., Lamarti A. (2016). Determination of Polyphenol Content in Carob Pulp from Wild and Domesticated Moroccan Trees. *American Journal of Plant Sciences*, 2016, 7, 1937-1951. DOI: [10.4236/ajps.2016.714177](https://doi.org/10.4236/ajps.2016.714177)
- 59.** Eldin Awad M E, El-Sohaimy SA, Ghareeb DA, Aboulenein A.M, Saleh S R, Abd El-Aziz NM (2020). Phytochemical analysis and toxicity assessment of artichoke by-product extract. *Pakistan journal of biological sciences*, 23 (1): 81-91, 2020. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.81.91>.
- 60.** El Hajaji H., Lachkar N., Alaoui K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., El Bali B., Lachkar M. (2010). Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco, *Records of Natural Products* 4:4 (2010) 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.053>
- 61.** El Sayed A. M., Hussein R., Abdel Motaal A., Fouad M.A., Aziz M.A., El sayed A., (2017). Artichoke edible parts are hepatoprotective as commercial leaf preparation. *Revista Brasileira de Farmacognosia* Vol 28, issue 2, pp: 165-178. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.002>
- 62.** El-Sherif G., El-sherif M.A, Tolba, K.H. (2011). Extraction and Identification of Natural Antioxidants from Liquorices (*Glycyrrhiza glabra*) and Carob (*Ceratonia siliqua*) and its Application in El-Mewled El-Nabawy Sweets (Sesames and Folia), *Nature and Science*, 2011; 9(11), pp 108-115, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.002>

- 63.** El Sohaimy S. A, 2013. The effect of cooking on the chemical Composition of Artichoke (*Cynara scolymus* L.), African Journal of Food Science and Technology, Vol. 4(8) pp. 182-187, 2013. Available online @<http://www.interestjournals.org/AJFST>
- 64.** Ferrazzano G.F. , Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G., Pollio A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 2011 Feb 11;16(2):1486-507, 2011. doi: 10.3390/molecules16021486.
- 65.** Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37, 2006. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.010
- 66.** Galland S., (2010). Polyphénols : Synthèse Organique et Propriétés Physicochimiques, Livre, Editeur : Univ Européenne, 292p.
- 67.** Gallo G., Kotze P.G., Spinelli A. (2018). Surgery in ulcerative colitis: When? How? Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. Volumes 32–33, February–April 2018, Pages 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2018.05.017>
- 68.** Gandhidasan R, Thamaraichelvan.A,Baburaj.S. (1991). Anti inflammatory action of *Lanea coromandelica* by HRBC membrane stabilization. *Fitoterapia*.1991; Vol I LXII; No1; pp.81-83.
- 69.** García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* 58,537-552.
- 70.** Gershfeld N.L., and Murayama M. (1988). Thermal Instability of Red Blood Cell Membrane Bilayers: Temperature Dependence of Hemolysis. *J. Membrane Biology* 101, 67-72.
DOI: [10.1007/BF01872821](https://doi.org/10.1007/BF01872821)
- 71.** Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N., (2011). Flavonoids and Phenolic Acids : Role and Biochemical Activity in Plants and Human, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(31),

pp. 6697-6703. Available online at. <http://www.academicjournals.org/JMPR> ISSN 1996-0875
©2011 Academic Journals.

72. González-Vallinas, M.; González-Castejón, M.; Rodríguez-Casado, A.; Ramírez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy; a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews* 2013, 71, 585–599.

73. Goulas V., Georgiou E. (2019). Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential: Extraction Optimization and Application in Food Models. *Foods* 2020, 9, 20; doi:10.3390/foods9010020.

74. Govindappa M., Naga Sravya S., Poojashri M. N. , Sadananda T. S., Chandrappa C. P. , Gustavo Santoyo, Sharanappa P. and Anil Kumar N. V. (2011). Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(24), pp. 5718-5729, 30 October 2011

75. Gravot A., (2009). Support de cours sur le métabolisme secondaire (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV) ; Université de Rennes 1 – L2 UE PHR.

76. Grosso G., Mateo A., Rangelov N., Buzeti T., Birt C. (2020). Nutrition in the context of the Sustainable Development Goals. *European Journal of Public Health*. 2020 Mar 1;30 (Suppl_1): i1 9-i23. doi: 10.1093/eurpub/ckaa034

77. Guminska M, Ignacak J, Wojcik E (1996) In vitro inhibitory effect of chitosan and its degradation products on energy metabolism in Ehrlich ascites tumour cells (EAT). *Polish Journal of Pharmacology* 48:495–501. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9112691/>

78. Gutiérrez-Del-Río I., Fernández J., Lombó F. (2018). Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018 Sep., 52(3) :309-315 doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024.

- 79.** Güven, K., Yücel, E., Çetintas, F. (2006). Antimicrobial activities of fruits of *Crataegus* and *Pyrus* species. *Pharmaceutical Biology*, 44 :798.
<https://doi.org/10.1080/13880200600591253>
- 80.** Gzyra-Jagiela K., Peczek B., Wisewska-Wrona M., Gutowska N. (2019). Physicochemical Properties of Chitosan and its Degradation Products in « Chitin and chitosan : properties and applications. » Book Editors Van der Broek L.A.M. and Boeriu C.G. pp :61-80. © 2020 John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119450467.ch3>
- 81.** Hadwiger L.A., Fritensky B., Riggleman R.C. (1984). Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields. In book « Chitin, chitosan, and related enzymes, Elsevier (1984), Academic press, pp. 291-302, DOI : 10.1016/B978-0-12-780950-2.50024-1.
- 82.** Hajji S., Younes I., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M. (2015). Characterization and In Vitro Evaluation of Cytotoxicity, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Chitosans Extracted from Three Different Marine Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(1), 18-35.
- 83.** Hasegawa, T., Gu, Y.H., Takahashi, T., Hasegawa, T. and Yamamoto, I. (2001) Enhancement of Hyperthermic Effects Using Rapid Heating. In: Kosaka, M., Sugahara, T., Schmidt, K.L., et al., Eds., *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain*, Springer Verlag, Tokyo, 439-444. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67035-3_49
- 84.** Helander IM, Numiaho EL, Ahvenainen R, Rohoades J, Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International J. of Food Microbiol.*, 71: 235-244.
- 85.** Hennebelle, T., Sahpaz, S. & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *De La Recherche A La Pratique* 2, pp : 3–6. <https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8>.
- 86.** Hopkins W.G. (2003). *Introduction to plant physiology*. Second Edition De Boeck & Larcier, 2003, Université Bruxelles, 532 pages, P.279. <https://fr.dreamstime.com/illustration->

stock-structure-phénol-formule-d-isolement-fond blanc-illustration-vecteur-image93735577,
consulté le 09/03/2021

87. Hu W., Sarengaowa S., Yuge Guan Y., and Feng K. Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables (2022). Frontiers in Microbiol. 2022; 13: 906069

88. Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B., Rahu N (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2016, 2016. Article ID 7432797, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.

89. Inserra L, Luciano G, Bella M, Scerra M, Cilione C , Basile P , Lanza M, Priolo A. (2015). Effect of including carob pulp in the diet of fattening pigs on the fatty acid composition and oxidative stability of pork, Meat Science 100 (2015) 256–261.

90. Jardine S., Sayed S. (2017). Valorisation of chitinous biomass for antimicrobial applications (2017) Journal of Pure and Applied Chemistry, 2017. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0707>

91. Jarrige R., Dulphy JP, Faverdin P., Baumont R., Demarquilly C. (1995). in Jarrige R., Ruck-Bush Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (Editors), Nutrition des ruminants domestiques-ingestion et digestion. INRA Editions, 123- 18 1

92. Jayakumar R., Prabaharan M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances 2011 May-Jun ;29(3): 322-37. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005

93. Jia Z, Shen D, Xu W (2021). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. Carbohydrates research, 333 : 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4).

- 94.** Jimenez-Escrig A., Dragsted L. O., Daneshvar B., Pulido R., Saura-Calixto F. (2003). In vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Effect on Biomarkers of Antioxidants in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.51, issue 18: 5540-5545. DOI: [10.1021/jf030047e](https://doi.org/10.1021/jf030047e)
- 95.** Jung, H.A.; Su, B.N.; Keller, W.J.; Mehta, R.G.; Kinghorn, D. (2006). Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2077–2082.
- 96.** Kaewprachu P, Benamara C, Oulahal N, Gharsallaoui A, Joly C, Tongdeesoontorn W, Degraeve P. (2018). Gelatin films with nisin and catechin for minced pork preservation, *Food Packaging and Shelf Life*, 18, pp. 173-183, [10.1016/J.FPSL.2018.10.011](https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2018.10.011), article / Google scholar.
- 97.** Kamboj A, Saluja A K, Kumar M, Atri P. (2012). Antiviral activity of plant polyphenols. *Journal of Pharmacy Research*, 5(5), 2402-2412 2402-2412 Review, Available online through <http://jprsolutions.info>.
- 98.** Kanatt, S.R., Chander R., and Sharma A. (2008). Chitosan and mint mixture: a new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 845–852.
- 99.** Karle, H. (1968). Elevated body temperature and the survival of red blood cells. *Acta Medica Scandinavica* 183:587-592.
- 100.** Karle H. (1969). Effect on red cells of a small rise in temperature: in vitro studies. *British Journal Haematology* 16:409-419.
- 101.** Kasaai M.R. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009 Mar 11 ; 57(5):1667-76. doi: [10.1021/jf803001m](https://doi.org/10.1021/jf803001m).
- 102.** Kelin K, Tepe B (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Journal of Bioresearch Technology*. 99: 4096- 4104

- 103.** Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL. (2002). Activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Journal of Immunology* 169:1535–1541. <http://www.jimmunol.org/content/169/3/1535.long> [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]. DOI: [10.4049/jimmunol.169.3.1535](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1535)
- 104.** Khushboo T., Upasana M., Suhasini B. Investigation of inhibition of protein denaturation assay by chitosan extracted from exoskeleton of *Sartoriana spinigera* (Wood-Mason, 1871) (2019).. *An International Biannual Refereed Journal of Life Sciences*, Vol. 14(1), March, 2019, pp. 13-16.
- 105.** Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M.S., Nakayama N., 2002. Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 373–377. DOI: [10.1021/jf010938r](https://doi.org/10.1021/jf010938r)
- 106.** Kurita K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203–226. doi:10.1007/s10126-005-0097-5.
- 107.** Kurniasih M., Purwati, Cahyati T., Ratna Stia Dewi R.S. (2018). Carboxymethyl chitosan as an antifungal agent on gauze. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 119, November 2018, Pages 166-171. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.07.038](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.038)
- 108.** Lamblin F, Hano C, Fliniaux O, Mesnard F, Fliniaux M A., Lainé E. (2008). Intérêt des Lignanes dans la Prévention et le Traitement de Cancers, *Médecine/sciences* ; vol. 24, N°5, pp 511-9, DOI:10.1051/MEDSCI/2008245511
- 109.** Lanhers MC., Fleurentin J., Mortier F., Vinche A., Younos C. (1992). Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens* *Planta Medicine* 1992 Apr ; 58(2): 117-23. DOI : [10.1055/s-2006-961411](https://doi.org/10.1055/s-2006-961411).
- 110.** Lasano NF, Ramli NS, Hamid AH, Karim R, Pak Dek MS, Shukri R, 2019. Effects of different extraction solvents on polyphenols and antioxidant capacity of peel, pulp and seed

kernel of kuini (*Mangifera odorata*). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, N°3, pp : 277-286. Springer. DOI :10.1007/s13596-019-00383-z

111. Lattanzio V., Cardinali A., Ruta C., Fortunato I.M., Lattanzio M.T., Linsalata V., Cicco N. (2009). Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environmental and Experimental Biology*, Volume 65, Issue 1, January 2009, Pages 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.09.002>

112. Li Q, Wei L, Zhang J, Gu G, Guo Z (2013). Significantly enhanced antioxidant activity of chitosan through chemical modification with coumarins. *Polymer chemistry*, 12:1-9. <https://doi.org/10.1039/C8PY01790E>.

113. Li, A.-N.; Li, S.; Zhang, Y.-J.; Xu, X.-R.; Chen, Y.-M.; Li, H.-B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 2014, 6, 6020–6047. doi: [10.3390/nu6126020](https://doi.org/10.3390/nu6126020)

114. Liao W, Chen L, Ma X, Jiao R, Li X, Wang Y (2016) Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *European Journal Medicinal Chemistry* 114:24–32. doi: [10.1016/j.ejmech.2016.02.045](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.045)

115. Lišková, J, Douglas T.E.L, Beranová J, Skwarczyńska A, Božič M, Samal, S K, Modrzejewska Z, Gorgieva S, Kokol V, Bačáková L (2015). Chitosan Hydrogels Enriched with Polyphenols: Antibacterial Activity, Cell Adhesion and Growth and Mineralization. *Carbohydrate Polymer* 129: 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.043>.

116. Livermore DM. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*; 34: 634-40. DOI: [10.1086/338782](https://doi.org/10.1086/338782)

117. Lou, E., Fujisawa, S., Morozov, A., Barlas, A., Romin, Y., Dogan, Y., et al. (2012). Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS ONE* 7:e33093. doi: [10.1371/journal.pone.0033093](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033093)

- 118.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-275.
- 119.** Macheix J J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Collection Biologie, presses polytechniques et universitaires Romandes, p.185, 411.
- 120.** Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N., (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie* Volume 5, Numéro 2, Pages 35-40.
- 121.** Mahmoudi S, Mahmoudi N (2022). Biological Activities of Phenolics in Different Parts of Local Cultivar of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus*, var. *scolymus* L.). *Biology and life sciences forum*. 2: 1-7. <https://doi.org/10.3390/IECHo2022-12510>.
- 122.** Mandim F., Spyridon A. Petropoulos M. , Dias MI, Pinela J, Kosti K, Soković M, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR and Barros L. (2021). Phenolic Composition and Biological Properties of *Cynara cardunculus* L. var. *altalis* Petioles: Influence of the Maturity Stage. *Antioxidants* 2021, 10, 1907. DOI: 10.3390/biology11050699
- 123.** Martillanes S., Rocha-Pimienta J., Cabrera-Bañegil M., Martín-Vertedor D., Delgado-Adámez J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation : Food Additive and Active Packaging. From the edited volume « Phenolic Compounds - Biological Activity » Edited by Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos. DOI: 10.5772/66885
- 124.** Matos MJ, Santana L., Uriarte E., Abreu OA., Molina E., Yordi EG. (2015). Coumarins: An Important Class of Phytochemicals In book : *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* (pp.113-140), Chapter : 5, Publisher : In Tech, Editors : Venkateshwara Rao.
- 125.** Middleton G., Hilton M., Pinon L.G.P., Wyatt S., Davies A.M. (1998). Blc-2 accelerates the maturation of early sensory neurons. *Journal of Neurosciences*, 1998, 18 : 3344-3350.

doi: [10.1523/JNEUROSCI.18-09-03344.1998](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03344.1998)

126. Mignotte O., Herin P., Bihan A., Clarisse Randria C., Talneau Y. (2012). Dépolluer une eau avec des carapaces de crevettes? Pas si complexe... Bulletin de l'Union des Professeurs de Physique et de Chimie, N°940, pp :43-55, Université de Lille 1, France.

127. Mittal, A.; Singh, A.; Hong, H.; Benjakul, S. Chitooligosaccharides from shrimp shell chitosan prepared using H₂O₂ or ascorbic acid/H₂O₂ redox pair hydrolysis: Characteristics, antioxidant and antimicrobial activities. (2022). International Journal of Food Science and Technology 2022, 58, 2645–2660. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15696>

128. Mohan BS, Nambiar V (2020). Covid 19: An insight into SARS-CoV-2 pandemic originated at Wuhan city in Hubei province of China. Journal of Infectious Diseases and Epidemiology 2020, 6:146 Volume 6 | Issue 4 DOI: 10.23937/2474-3658/1510146

129. Mosaed F., AL-Subhi M., (2017). Artichoke as a tool to natural antioxidants for lowering diabetics and hypolipidemia parameters. Australian Journal of Basic and Applied Sciences vol.11, issue 1: 46-54.

130. Moschopoulou E., Moatsou G., Syrokou M.K., Paramithiotis S., Drosinos E.H. (2019). Food quality changes during shelf life in « Food Quality and Shelf Life », Edited by Charis M. Galanakis, Academic Press, copyright© 2019 Elsevier, pp: 1-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00001-X>

131. Moussaoui B., Rahali A., Bouamar S., Riazi A. (2020). Biological properties of betalains extracted from inner nopal pads of Algerian *Opuntia ficus indica* (L.). South Asian Journal of Experimental Biology. Vol. 10, issue 4, pp: 234-242.

132. Mukhin, V.A., Novikov, V.Y. Enzymatic Hydrolysis of Proteins from Crustaceans of the Barents Sea. *Applied Biochemistry and Microbiology* **37**, 538–542 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1010218712622>

133. Nabavi SF, Nabavi SM, Setzer WN, Nabavi SA, Nabavi SA, Ebrahimzadeh MA. (2013) Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits* 68(3):185–193. DOI: 10.1051/fruits/2013066

- 134.** Naczki M. et Shahidi F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of chromatography (1054.)*: 95-111. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8)
- 135.** Narudin N.A.H., Mahadi A.H., Kusrini E., Usman A. (2020). Chitin, Chitosan, and Submicron-Sized Chitosan Particles Prepared from *Scylla serrata* Shells. *Materials International*, Volume 2, Issue 2, PP 0139-0149.
- 136.** Ngo D.H., Kim S.K. (2014). Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 73, 2014, Pages 15-31.
- 137.** Olafadehan O., Kehinde O.A., Tolulase O.A., Bello V.E. (2021). Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Callinectes amnicola* and *Penaeus notialis* shell wastes. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*, Vol. 12(1), pp. 1-30. DOI: 10.5897/JCEMS2020.0353.
- 138.** Oliveira, A. S. de ; Schwambach, T. I. ; Sinhorin, A. P. ; Oliveira, M. R. C. ; Alessi, K. A. ; Filho, F. A. de O. ; Pina, D. dos S. (2012). Capacity of ensilage of *Jatropha curcas* L. cake to degrade phorbol esters. *Revista Brasileira de Zootecnica*, 41 (6): 1545-1549
- 139.** Osoyen E., Skaugrud O. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 49 (4) : 395-404. doi: 10.1002/jctb.280490410.
- 140.** Oyatogun G.A., Esan T.A., Akpan E.I., Adeosun S.O., Popoola A.P.I., Imasogie B.I., Soboyejo W.O., Afonja A.A., Ibitoye S.A., Abere V.D., Oyatogun A.O., Oluwasegun K.M., Akinwale I.E., Akinluwade K.J. (2020). Chapter 11 : chitin, chitosan, marine to market in « Handbook of chitin and chitosan », volume 1 : preparation and properties, 2020, pages 335-376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817970-3.00011-0>
- 140.** Özcan M., Chalchat M., (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 59 (7-8): 691-698. doi: 10.1080/09637480701777944.

- 141.** Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.R.; Mellenthin, A.; Haber, B.; Galensa, R. (2004). Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,2004 3791–3784 ,52.
- 142.** Parekh, J. and Chanda, S. (2007) In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turkish Journal of Biology*, 31, 53-58.
- 143.** Park PJ, Je JY, Kim S K (2004). Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer, *Carbohydrate Polymers* 55 (1): 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.05.002>.
- 144.** Pattnaik A, Pati S, Keshari Samal S (2022). Chitosan-Polyphenol Conjugates for Human Health. *Life* 12:1768.1-23. <https://doi.org/10.3390/life12111768>.
- 145.** Perveen S. Yousaf M., Mushtaq M.N., Sarwar N., Khaliq A., Hashim S. 2012. Selective bioherbicidal potential of delonix regia allelopathic leaf extract on germination and seedling growth of field bindweed and wheat. *Applied Ecology and Environmental Research* 17(1):511-519. DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1701_511519 © 2019, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary
- 146.** Petkova N., Petrova I., Ivanov I., Mihov R., Hadjikinova R., Ognyanov M., Nikolova V. 2017. Nutritional and antioxidant potential of carob (*Ceratonia siliqua*) flour and evaluation of functional properties of its polysaccharide fraction. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9(10), 2189-2195.
- 147.** Pezzola S., Tarallo S., Lannini A., Venanzi M., Galloni P., Conte V., Sabuzi F. (2022). An Accurate Approach for Computational pKa Determination of Phenolic Compounds. *Molecules* 2022, 27(23), 8590; <https://doi.org/10.3390/molecules27238590>
- 148.** Pol F, Le Potier M. F. (2011). Herpès virose chez le porc : la Maladie d’Aujeszky, *Communication*, Tome 164, N°04, p323-326, www.academie-veterinaire-defrance.org.
- 149.** Porfirio, L.L., Newth, D., Finnigan, J.J., Cai Y. (2018). Economic shifts in agricultural production and trade due to climate change. *Palgrave Communications* **4**, 111 (2018).

<https://doi.org/10.1057/s41599-018-0164-y>

- 150.** Prabu K., Natarajan, E (2012). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Chitosan Isolated from *Podophthalmus vigil*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2 (9): 075-082. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2916>.
- 151.** Putra M.R., Karnila R., Bustari H. 2023. Potential Chitosan Of Waste Shell Mantis Shrimp (*Harpiosquilla Raphidea*) As Antibacterial. Asian Journal of Aquatic Sciences, Vol 6, Issue (1) 129-135.
- 152.** Queiroz MF, Melo, K RT, Sabry D A, Sasaki G L, Rocha H A O, Costa LS (2019). Gallic Acid-Chitosan Conjugate Inhibits the Formation of Calcium Oxalate Crystals. *Molecules*, 24, 2074: 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules24112074>.
- 153.** Rabiul Islam, G.M., Gias Uddin, M., Mahfuzur Rahman, M. and Yousuf, A. (2013) Short Communication: Caffeine and Total Polyphenol Contents of Market Tea Cultivated and Processed in Bangladesh. *Malaysian Journal of Nutrition*, 19, 143-147.
- 154.** Rajalakshmi P, Sumathi V, Pugalenth M. (2016). Antioxidant activity of *Erigeron Karvinskianus* DC. and *Ageratina Adenophora* (Spreng.) King (leaves). *International Journal of Food Science and Nutrition*, Volume 1; Issue 5; September 2016; Page No. 64-68.
- 155.** Rakib, E.M.; Chicha, H.; Abouricha, S.; Alaoui, M. (2010). Determination of Phenolic Composition of Carob Pods Grown in Different Regions of Morocco. *J. Nat. Prod.* 2010, 3, 134–140.
- 156.** Randriamahatody Z., Sylla K.S.B., Nguyen H.T.M., Donnaymoreno C., Razanamparany L., Bourgougnon N., Berge J.P., 2011. Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar. *CyTa – Journal of food*, 9: 220-228. doi: 10.1080/19476337.2010.518250
- 157.** Ratajska M., Boryniec S. (1998). Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive and Functional Polymers*. Volume 38, Issue 1, 1 September 1998, Pages 35-49. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(98\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(98)00031-5)

- 158.** Renuka V., Ravishankar C.N.R., Elavarasan K., Zynudheen A.A., Joseph T.C. (2019). Production and Characterization of Chitosan from Shrimp Shell Waste of *Parapeneopsis stylifera*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* (2019) 8(11): 2076-2083.
- 159.** Richard T, Temsamani H, Delaunay JC, Krisa S, Merillon JM. 2014. Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection. *Stilbenes: From chemistry to neuroprotection. Cahiers de Nutrition et de Diététique*, Volume 49, Issue 4, September 2014, Pages 173-180. DOI: 10.1016/j.cnd.2014.03.001
- 160.** Rinaudo, M. (2006) Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- 161.** Robbins J, Rebecca J., (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of agricultural and food chemistry*, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51(10), 2866–2887.
- 162.** Romani A., Lattanzio V., Quideau S., (2014). *Recent Advances in polyphenol research*, Edition WILEY Blackwell, Volume 4, 316p.
- 163.** Roussy, J., Vooren, M.V., Dempsey, B.A., Guibal, E. (2005). Influence of chitosane characteristics on the coagulation and the flocculation of bentonite suspensions., *Water Research* (39) : 3247-3258.
- 164.** Rtibi K., Selmi S., Grami D., Mohamed A., Eto B., El Benna J., Sebai H., Marzouki L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review, 2017. *Biomedicine and Pharmacotherapy* Volume 93, September 2017, Pages 522-528. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.088
- 165.** Rudrapal M., Khairnar S.J., Khan J., Ben Dukhil A., Ansari M.A., Alomary M.N., Alshabrm F.M., Palai S., Kumar Deb P., Devi R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 14 February 2022 *Sec. Ethnopharmacology* Volume 13 - 2022 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>

- 166.** Saeedan S. Abdulaziz, Gamal A. Gabr, Gamal A. Soliman, Mohamed H. Fayed, Mohd Nazam Ansari. The Potential Anti-inflammatory and Wound Healing Activities of Chitosan in rats, *Advances in Bioresearch*. Vol 7 (6) November 2016: 01-07.
- 167.** Sahara E. (2011). Penggunaan kepala udang sebagai sumber pigmen dan kitin dalam pakan ternak. *Agrinak*, vol. I, no. 1, 2011, pp. 31-35.
- 168.** Saibabu V., Zeeshan F., Khan L.A., Hameed S. (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acid. *Advances in Pharmacological Sciences*, Volume 2015, Article ID 823539, 10 pages. Hindawi Publishing Corporation <http://dx.doi.org/10.1155/2015/823539>
- 169.** Salem, M B, Affes H, Ksouda K. (2015). Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 70, no. 4, pp. 441–453, 2015.
- 170.** Sangita C., Priyanka C., Protapaditya D., Sanjib B. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S178-S180. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60154-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60154-3)
- 171.** Sarmiento B., Neves J.D. (2012). Chitosan-based systems for biopharmaceuticals delivering, targeting and polymers pharmaceuticals. B. Sarmiento and J.D. Neves Editors, John Wiley & Sons, Feb 16th, 2012, 600 pages.
- 172.** Schapoval E. S. S., Winter De Vargas M. R., Chaves C.G., Bridi R., Zuanazzi J. A., and Henriques A. T. (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 60, N° 1, pp. 53–59, 1998. DOI: [10.1016/s0378-8741\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00136-0)
- 173.** Schütz K., Kammerer D.R., Carle R., Schieber A. (2004). Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2004, Volume19, Issue2 : Pages 179-186. <https://doi.org/10.1002/rcm.1767>
- 174.** Se-Kwon, K. (2011) Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives. Biological Activities and Applications. CRC Press Is an Imprint of Taylor & Francis Group, LLC. 6000

Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742.
<https://doi.org/10.1201/EBK1439816035>

175. Selosse M A. (2019). Les Goûts et les couleurs du monde. Une histoire naturelle des Tannins, de l'Ecologie à la Santé, Actes Sud Nature, p. 91

176. Shahidi F., Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(8), 1527–1532. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00008a032>

177. Sharma P., Verma P.K., Pankaj N.K., Agarwal S. (2021). The Phytochemical Ingredients and Therapeutic Potential of *Cynara scolymus* L, Pharmaceutical and Biomedical Research, 2021; 7(3):141-160.

178. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. 2022. Plant flavonoids : Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chemistry, vol.383, July 2022, 132531

179. Shun-Hsien Chang, Yi-Yung Lin, Guan-James Wu, ChungHsiung Huang, Guo Jane Tsai, 2019. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. International Journal of Biological Macromolecules. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.066

180. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA, Al-Hiary M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. Journal of AOAC International, Vol 102, N°5, 2019, 1397-1400

181. Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-)

- 182.** Si Trung D, Bao D (2015). Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitin and Chitosan Prepared from Pacific White Shrimp Waste. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/706259>.
- 183.** Sobiesiak. M. (2017). Chemical structure of phenols and its consequence for sorption processes, chapter in book “Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications Edited by Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos. InTech Available at : <http://dx.doi.org/10.5772/67213>.
- 184.** Spizzirri U.G., Abduvakhidov A., Caputo P., Crupi P., Muraglia M., Rossi C.O., Clodoveo M.L., Aiello F., and Restuccia , D. (2022). Kefir Enriched with Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Leaves Extract as a New Ingredient during a Gluten-Free Bread-Making Process Fermentation, 8, 305. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070305>
- 185.** Sugiyanti D., Darmadji P., Anggrahini S., Anwar C., and Santoso U. (2018). Preparation and Characterization of Chitosan from Indonesian Tambak Lorok Shrimp Shell Waste and Crab Shell Waste. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17: 446-453.
DOI: [10.3923/pjn.2018.446.453](https://doi.org/10.3923/pjn.2018.446.453) URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2018.446.453>
- 186.** Sun N., Carroll R.J., Zhao H. (2006). Bayesian error analysis model for reconstructing transcriptional regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21):7988-93.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0600164103>
- 187.** Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A.A.Q. (2000) The Recovery of Protein Hydrolysate during Enzymatic Isolation of Chitin from Shrimp Crangon crangon Processing Discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00165-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00165-x)
- 188.** Szewczyk A.A, Zgórk G., (2019). Plant Polyphenols in Cosmetics – A Review, *European Journal of Medical Technologies*; 3(24): 1-10.
- 189.** Ta, H., Dunstan, D. and Dass, C. (2010) ‘Anticancer Activity and Therapeutic Applications of Chitosan Nanoparticles’, in *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*. CRC Press. doi:10.1201/ebk1439816035-c21.

- 190.** Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY, Oliveira D.C.R, 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* ; 39: 403-408.
- 191.** Tikhonov V.E., Stepnova E.A. , Babak V.G. , Igor A. Yamskov I.A. , Palma-Guerrero J. , Jansson H.R. , Lopez-Llorca L.V. , Salinas J. , Gerasimenko D.V. , Avdienko I.D. , Varlamov V.P. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 66–72.
- 192.** Tong Z., He W., Fan X., Guo A. 2022. Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. *Frontiers Veterinary Sciences*, 2022 Jan 10;8:803657. doi:10.3389/fvets.2021.803657. PMID: 35083309; PMCID: PMC8784788
- 193.** Tounsi L., Ghazala I., Kechaou N. (2019). Physicochemical and phytochemical properties of Tunisian carob molasses. *Journal of Food Measurement and Characterization*. Springer Science + Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00263-9>.
- 194.** Tourón, N., El Khalfi B., Sayah Y.M., Chabir R., Errachidi F., Soukri A. (2016). Rheological and Antioxidant Characterization of Chitin and Chitosan Extracted with Different Acids. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, Volume 4, Number 1, March 2016, pp. 41-45(5).
- 195.** Tsai G.-J. and Su W.-H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, vol. 62, no. 3, pp. 239–243.
- 196.** Tsaih M.L., Chen R.H. (1997). Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 20, Issue 3, June 1997, Pages 233-240. [https://doi.org/10.1016/S01418130\(97\)01165-3](https://doi.org/10.1016/S01418130(97)01165-3)
- 197.** Tuorkey M., Khedr Y., Aborhyem S. and Xue X. (2022). Green synthesis of chicory (*Cichorium intybus* L.) Chitosan nanoparticles and evaluation of their anti-fungal, anti-hemolytic, and anti-cancer activities. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 37(6) 421–436.

198. Umapathy E, Ndebia EJ, Meeme A, Adam B, Menziwa P, NkehChungag BN, et al. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(9): 789-795. DOI: 10.5897/JMPR10.056
198.

199. Umberto Quattro chi FLS. CRC (2020). *World Dictionary of Plant Name*. Vol. I, Boca Raton, London, New York, Washington, D. C.: CRC Press 2020.

200. Varum, K.M., Myhr, M.M., Hjerde, R.J.N. and Smidsod, O. (1997) In-vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosan in human serum. *Carbohydrate Research*, 299, 99-101. doi:10.1016/S0008-6215(96)00332-1

201. Vasudevan R., Ramalinga Chandra Seka A., Sundarakannan B., Velkennedy B. (2006). A technique to dispose waste plastics in an ecofriendly way – Application in construction of flexible pavements. *Construction and Building Materials*, Volume 28, Issue 1, March 2012, Pages 311-320. doi:10.1016/j.conbuildmat.2011.08.031

202. Vercauteren J, Cheze C, Triaud J., (1998). Polyphenols 96, 18th international conference en polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18. Institut national de la recherche agronomique, Les Colloques n°87.

203. Vincente O., Boscaiu M. (2018). Flavonoids: Antioxidant Compounds for Plant Defence... and for a Healthy Human Diet. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 14–21. <https://doi.org/10.15835/nbha46110992>

204. Virgilio, F. (2004). New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. *Current Pharmaceutical Design* 10, 1647-1652. DOI: [10.2174/1381612043384727](https://doi.org/10.2174/1381612043384727)

205. Wang, G. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, vol. 55, no. 11, pp. 916–925. doi: 10.4315/0362-028X-55.11.916.

- 206.** Wang J., Li D., Gong L., Xing J., Shen H., Ma G.S.F. (2003). True metabolisable energy and true amino acid availability in chinese varieties of dehulled and hulled soybean meals determined with adult roosters. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 16 (10) : 1487-149. DOI : <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.1487>
- 207.** Winter C., Risley E, Nuss G. (1962). Carrageenin-induced Edema in Hin paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, vol.111, issue 3. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27>
- 208.** Woisky RG, Salatino A. (1998). Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural TResearch* 1998, 37, 99-105. <http://europepmc.org/abstract/AGR/IND21966817>.
- 209.** Wu C.H., Wood T.K, Mulchandani A., Chen W. (2006). Engineering Plant-Microbe Symbiosis for Rhizoremediation of Heavy Metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1129-1134. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1129-1134.2006>
- 210.** Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, *Food Hydrocolloids*, 25 (2): 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
- 211.** Xianli Wu, Beecher G R, Holden J M, Haytowitz D B, Gebhardt S E, Ronald L., (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption PRIOR USDA Arkansas Children’s Nutrition Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. DOI: [10.1021/jf0603001](https://doi.org/10.1021/jf0603001)
- 212.** Xie Y, Chen J, Xiao A, Liu L (2017). Antibacterial activity of polyphenols: structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules*, 22(11): 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules22111913>.
- 213.** Yang L., Zaharoff D.A.(2013). Role of chitosan co-formulation in enhancing interleukin-12 delivery and antitumor activity, *Biomaterials* 34(15) (2013) 3828-36. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2013.02.031](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.031)

- 214.** Youcefi F., Riazi A., Mokhtar M., Tefiani C., Khaouani N. (2017). Physicochemical characterization and in vitro antimicrobial activity of chitosan extracted from shrimp shells waste from Beni Saf sea, Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology*. Vol.7, issue 2, pages 122-129.
- 215.** Youcefi F, Riazi A (2014). Extraction, Physicochemical Characterization and in Vitro Antioxidative Potential of Chitosan in Shrimp Shell Waste from Beni Saf Sea, Algeria. *International Journal of Science and Research* 3(7) : 955-959.
- 216.** Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., Nasri, M. (2014). Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment, Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 69 (2014) 489–498. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013)
- 217.** Younes I., Rinaudo M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 2015 Mar. 2 ; 13(3) : 113374. Doi : [10.3390/md13031133](https://doi.org/10.3390/md13031133).
- 218.** [Zagoskina N.V.](#), [Zubova M.Y.](#), [Nechaeva T.L.](#), [Kazantseva V.V.](#), [Goncharuk E.A.](#), [Katanskaya V.M.](#), [Baranova E.N.](#), and [Aksenova M.A.](#) 2023. Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Science* 2023 Sep; 24(18): 13874 DOI: [10.3390/ijms241813874](https://doi.org/10.3390/ijms241813874)
- 219.** Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kerscher M., (2015). Polyphenols as Active Ingredients for Cosmetic Products, Review Article in *International Journal of Cosmetic Science*, 37, 455–464.

