

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bakr BELKAID - Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Laboratoire des Produits Naturels



Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de

Magister en Biologie

Option

Substances naturelles, activités biologiques et synthèse

Présenté par

ABID Lemya épouse MEFTAH

Thème

***Recherche des activités antimicrobiennes et
antioxydantes de Schinus molle L. et Pistacia vera L.
de la région de Tlemcen.***

Soutenu le :

Devant le Jury composé de :

M^{me} ATIK BEKKARA F.
M^r BENMANSOUR A.
M^r ABDELOUAHID D.E.
M^{me} BEKHECHI C.
M^{me} BENDIMERAD N.

Professeur
Professeur
Maître de Conférences
Maître de Conférences
Maître de Conférences

U.A.B.Tlemcen
U.A.B.Tlemcen
U.A.B.Tlemcen
U.A.B.Tlemcen
U.A.B.Tlemcen

Président
Examineur
Examineur
Co-encadreur
Encadreur

Année universitaire : 2008/2009

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents et mes beaux parents

A mon mari

A mes frères et sœur

A mon amie Sihem

A tous les membres de ma famille

Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bakr BELKAID – TLEMEN, sous la direction de madame BENDIMERAD Nassima et madame BEKHECHI Chahrazed.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Madame BENDIMERAD N., Maître de Conférences à l'Université Abou Bakr BELKAID-Tlemcen, pour ses conseils et ses commentaires mais aussi pour sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation.

Je remercie sincèrement mon co-encadreur Madame BEKHECHI C., Maître de Conférences à l'Université Abou Bakr BELKAID-Tlemcen. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidée dans mon travail.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur ATIK BEKKARA F., Chef de l'équipe « Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) », au laboratoire des « Produits Naturels » de l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de mémoire.

J'aimerais également remercier Monsieur le Professeur BENMANSOUR A. à l'Université Abou Bakr BELKAID-Tlemcen pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Que Monsieur ABDELOUAHID D.E. Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse également mes remerciements les plus vifs et ma profonde reconnaissance et gratitude à Monsieur Xavier FERNANDEZ, Maître de Conférences à l'Université de Nice

Sophia-Antipolis, pour nous avoir accueillis au sein du Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA) afin de réaliser les analyses chromatographiques.

J'adresse mes remerciements les plus vifs à monsieur BENABADJI N., Professeur à l'Université de Tlemcen et membre du Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels ; Université Abou Bakr BELKAID – Tlemcen pour son aide précieuse quant à l'identification des espèces botaniques.

Un très grand merci à Imad qui a joué un rôle fondamental dans mes études. Tout au long de ces trois années, il a su m'aider à orienter mes recherches. Je le remercie pour son amitié, son aide, sa confiance et ses conseils si précieux tout le long de mon travail.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire particulièrement Nadjib et Nacéra pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout mon cœur mes parents, mes frères et sœur qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études ainsi qu'à mon mari pour son amour, son aide et son soutien pendant la période ardue qu'est la rédaction.

Résumés

Résumé

Dans le cadre de la valorisation du patrimoine floral, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et aux activités biologiques des deux classes de familles chimiques qui sont les huiles essentielles et les flavonoïdes des deux plantes *Schinus molle* et *Pistacia vera*.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en huiles essentielles des feuilles de *Schinus molle* est de l'ordre de 1,11% et dans les fruits il est de l'ordre de 0,11%. Les feuilles de *Pistacia vera* quant à elles présentent un très faible rendement de l'ordre de 0,004%.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée par CPG/SM. Trente et un composés représentant plus de 89,93% de la composition de l'huile ont été identifiés pour les feuilles de *Schinus molle* et 27 composés identifiés pour les fruits (88,60%). Les composés majoritaires sont : l'alpha-phellandrène (32,24%) et le bêta-phellandrène (23%) pour les feuilles et l'alpha-phellandrène (20,19%), le limonène (14,21%), le myrcène (13,61%) et le para-cymène (12,20%) pour les fruits.

La teneur en composés phénoliques est plus importante dans les feuilles de *Schinus molle* par rapport à ses fruits et aux feuilles de *Pistacia vera*.

L'identification des composés phénoliques, dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes, par CCM nous a révélé la présence de l'acide gallique et de la catéchine dans les feuilles de *Schinus molle* et de la rutine dans les fruits. Deux composés phénoliques ont été identifiés dans l'espèce *Pistacia vera* : le résorcinol et l'acide paracoumarique.

L'activité anti-oxydante des extraits bruts est plus importante que celle des huiles essentielles. Par ailleurs, les souches fongiques se sont révélées plus sensibles aux huiles essentielles par rapport aux bactéries. Par contre, les extraits bruts se sont montrés inactifs vis-à-vis de tous les germes microbiens testés.

Mots clés : *Schinus molle*, *Pistacia vera*, étude phytochimique, huiles essentielles, CPG/SM, composés phénoliques, flavonoïdes, activité anti-oxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

As part of the promotion of heritage flowers, we were interested to study phytochemical and biological activities of two classes of chemical groups that are essential oils and flavonoids of both plants *Schinus molle* and *Pistacia vera*.

The results obtained show that the yield of essential oils of leaves of *Schinus molle* is about 1.11% and in fruits it is around 0.11%. The leaves of *Pistacia vera* in turn have a very low efficiency of around 0.004%.

The determination of the chemical composition of essential oils was performed by GC / MS. Thirty-one compounds representing more than 89.93% of the composition of the oil were identified for *Schinus molle* leaves and identified 27 compounds for fruit (88.60%). The majority compounds are alpha-Phellandrene (32.24%) and beta-Phellandrene (23%) for sheets and alpha-Phellandrene (20.19%), limonene (14.21%) the myrcène (13.61%) and para-cymene (12.20%) for fruit.

The content of phenolic compounds is higher in the leaves of *Schinus molle* over its fruits and leaves of *Pistacia vera*.

The identification of phenolic compounds in the fractions of ethyl acetate and n-butanol flavonoids by TLC has shown the presence of gallic acid and catechin in the leaves of *Schinus molle* and rutin in fruit. Two phenolic compounds were identified in the species *Pistacia vera*: the rsorcinol and paracoumaric acid.

The antioxidant activity of crude extract is more important than the essential oils. Furthermore, fungal strains have been more sensitive to essential oils as compared to bacteria. As against the crude extract were inactive against all tested microbial germs.

Key words: *Schinus molle*, *Pistacia vera*, phytochemical study, essential oils, GC / MS, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

يتميز الغطاء النباتي في الجزائر بتنوعه و وفرته على العديد من الأنواع النباتية التي تستعمل لأغراض طبية متنوعة تستعملها مختلف شرائح المجتمع للتداوي فيما يعرف باسم الطب البديل. فالبرغم من هذا التنوع، لا تزال الدراسات حول هذه النباتات قليلة بالمقارنة بهذا المخزون الطبيعي في بلادنا. ضمن هذا المفهوم و في إطار استغلال الثروة النباتية المحلية، ارتأينا أن نقوم بدراسة التركيب الكيميائي و النشاط البيولوجي لقسمين من المركبات الكيميائية: الزيوت العطرية و الفلافونويدات، المستخلصة من *Pistacia vera* و *Schinus molle* :

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن أوراق *Schinus molle* أعطت مردودا فيما يخص الزيوت العطرية مقدر ب 1.11 %، في حين أن المردود كان 0.11 % بالنسبة للثمار. كما سجلنا أن أوراق *Pistacia vera* أعطت مردودا جد ضعيف مقدر ب 0.004 %.

تمت دراسة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية مقرونة بمطيافية الكتلة. تم الكشف عن واحد و ثلاثين مركبا بنسبة 89.93 % في أوراق *Schinus molle* و عن سبع و عشرين مركبا بنسبة 88.60 % في الثمار. فيما يخص المركبات ذات الأغلبية في الزيوت العطرية نجد الألفا فيلوندران (32.24%) و البيتا فيلوندران (23%) بالنسبة للأوراق، و الألفا فيلوندران (20.19%)، الليمونان (14.21%)، الميرسان (13.61%) و الباراسيمان (13.20%) بالنسبة للثمار.

المحتوى الفينولي كان معتبرا في أوراق *Schinus molle* مقارنة بالثمار و كذلك بالنسبة لأوراق *Pistacia vera*.

أظهر التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة وجود حمض غاليك و الكاتشين في أوراق *Schinus molle*، جزيئة الروتين في الثمار و مركبين فينوليين بالنسبة لـ *Pistacia vera* هما: الغيزوغسينول و حمض باراكوماريك.

بينت النتائج أن الزيوت العطرية تمتلك نشاطا عاليا مضاد للميكروبات مقارنة بالمستخلصات الخام، في حين أنها ذات نشاط ضعيف مضاد للأكسدة مقارنة بهذه الأخيرة.

الكلمات المفتاحية: *Schinus molle*، *Pistacia vera*، الدراسة الكيميائية، التحليل الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية/مطيافية الكتلة، الزيوت العطرية، المركبات الفينولية، الفلافونويدات، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة.

Table des matières

Résumés.....	i
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Abréviations utilisées.....	xii

Introduction Générale..... 1

Première partie : Synthèse bibliographique..... 5

I. Présentation des plantes sélectionnées.....	6
I.1. Introduction.....	6
I.2. Espèce <i>Schinus molle</i>	6
I.2.1. Description botanique.....	6
I.2.2. Répartition géographique.....	7
I.2.3. Propriétés thérapeutiques.....	7
I.2.4. Composition chimique des huiles essentielles - travaux antérieurs.....	8
I.3. Espèce <i>Pistacia vera</i>	9
I.3.1. Description botanique.....	9
I.3.2. Répartition géographique.....	9
I.3.3. Propriétés thérapeutiques.....	10
I.3.4. Composition chimique des huiles essentielles - travaux antérieurs.....	10
II. Quelques classes chimiques rencontrées chez les végétaux.....	12
II.1. Introduction.....	12
II.2. Les flavonoïdes.....	14
II.2.1. Introduction.....	14
II.2.2. Définition.....	15
II.2.3. Rôles des flavonoïdes chez les plantes.....	15
II.2.4. Chimie des flavonoïdes.....	15
II.2.5. Biosynthèse des flavonoïdes.....	18
II.2.6. Propriétés chimiques et activités biologiques.....	18

II.3. Les huiles essentielles.....	21
II.3.1. Introduction	21
II.3.2. Définition.....	22
II.3.3. Répartition, Localisation.....	22
II.3.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	23
II.3.5. Composition chimique des huiles essentielles.....	23
II.3.6. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles	25
II.3.7. Propriétés chimiques et activités biologiques.....	27
III. Méthodes d'analyses chromatographiques.....	29
III.1. Introduction	29
III.2. Identification des constituants dans un mélange complexes	29
III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	31
III.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	32
III.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	33

Deuxième partie : Matériel et méthodes..... 36

I. Introduction	37
II. Matériel végétal.....	37
III. Tests phytochimiques.....	39
III.1. Différentes classes recherchées.....	39
III.1.1. Les flavonoïdes	39
III.1.2. Les tanins.....	39
III.1.3. Les alcaloïdes	39
III.1.4. Les saponosides.....	39
III.1.5. L'amidon	40
III.1.6. Les composés réducteurs.....	40
III.1.7. Les stérols et stéroïdes.....	40
III.1.8. Anthocyanosides	40
III.1.9. Les anthracénosides et émодols	40
III.1.10. Les coumarines.....	40
III.2. Epuisement du matériel végétal	40
IV. Extractions sélectives	44
IV.1. Extraction des huiles essentielles.....	44
IV.1.1. Calcul du rendement	44
IV.1.2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/SM.....	44

IV.2. Extraction des composés phénoliques.....	46
IV.2.1. Calculs des rendements en extraits bruts secs.....	46
IV.2.2. Extraction des flavonoïdes.....	47
IV.2.3. Dosage des phénols totaux.....	48
IV.2.4. Dosage des flavonoïdes.....	48
IV.2.5. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par Chromatographie sur couche mince (CCM).....	49
V. Pouvoir antioxydant : piégeage du radical libre DPPH.....	50
V.1. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes.....	50
V.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles.....	51
VI. Pouvoir antimicrobien.....	52
VI.1. Provenance des germes étudiés.....	52
VI.2. Antibiotiques et antifongique utilisés.....	53
VI.3. Pouvoir antimicrobien des extraits.....	54
VI.3.1. Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien des extraits.....	54
VI.3.2. Méthode d'étude du pouvoir antifongique des extraits.....	55
VI.4. Préparation des inoculums.....	56
VI.4.1. Bactéries.....	56
VI.4.2. Moisissures.....	56
VI.5. Milieux de culture utilisés.....	56

Troisième partie : Résultats et discussion.....57

I. Tests phytochimiques.....	58
I.1. Introduction.....	58
I.2. Résultats des tests.....	58
II. Les huiles essentielles.....	60
II.1. Rendement en huile essentielle.....	60
II.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Schinus molle</i>	61
III. Les composés phénoliques.....	69
III.1. Rendements des extraits bruts obtenus.....	69
III.2. Teneurs en phénols totaux.....	69
III.3. Teneurs en flavonoïdes.....	71
III.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM.....	72
IV. Pouvoir antioxydant et anti-radicalaire testé par la méthode au DPPH.....	82
IV.1. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes.....	82

IV.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles.....	88
V. Pouvoir antimicrobien.....	90
V.1. Introduction.....	90
V.2. Pouvoir antimicrobien des antibiotiques.....	91
V.3. Pouvoir antimicrobien de l'antifongique.....	91
V.4. Pouvoir antimicrobien des extraits.....	92
V.4.1. Activité antibactérienne des extraits.....	92
V.4.2. Activité antifongique des extraits testée par la méthode de contact direct.....	95
Conclusion générale.....	97
Références bibliographiques.....	101

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : <i>Schinus molle</i> (arbre).....	9
Figure 2 : <i>Schinus molle</i> (fruits).....	9
Figure 3 : <i>Pistacia vera</i>	11
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure 5 : Diverses classes de flavonoïdes.....	17
Figure 6 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine.....	19
Figure 7 : Unité isoprénique.....	24
Figure 8 : Structure de quelques composés terpéniques.....	24
Figure 9 : Synthèse des différentes classes terpéniques chez les plantes	26
Figure 10 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe.....	30
Figure 11 : Schéma d'une chromatographie sur couche mince.....	31
Figure 12 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.....	33
Figure 13 : Schéma d'un couplage CPG/SM.....	34
Figure 14 : Identification des composés d'une huile essentielle par CPG/SM.....	35
Figure 15 : Carte de localisation géographique des stations d'études.....	38
Figure 16 : Représentation schématique des tests phytochimiques.....	42
Figure 17 : Représentation schématique des tests phytochimiques (suite).....	43
Figure 18 : Schéma d'extraction des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes	47
Figure 19 : Rendement en huile essentielle de <i>Schinus molle</i> et <i>Pistacia vera</i> obtenus par entraînement à la vapeur d'eau.....	60
Figure 20 : Chromatogramme de CPG/SM des feuilles de <i>Schinus molle</i>	64
Figure 21 : Chromatogramme de CPG/SM des fruits de <i>Schinus molle</i>	64
Figure 22 : Composés volatils présents dans les fruits de <i>Schinus molle</i>	65
Figure 23 : Composés volatils présents dans les feuilles de <i>Schinus molle</i>	66
Figure 24 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des feuilles et des fruits de <i>Schinus molle</i>	66
Figure 25 : Rendements des extraits bruts exprimés en pourcentage	69
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	70
Figure 27 : Teneurs en phénols totaux exprimées en mg équivalent acide gallique/g de la plante sèche	70
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	71
Figure 29 : Teneurs en flavonoïdes exprimées en mg équivalent catéchine/g de la plante sèche	72
Figure 30 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 1).....	74
Figure 31 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 2).....	76

Figure 32 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 3).....	78
Figure 33 : Chromatographie sur couche mince de nos témoins (système de solvants 3).....	80
Figure 34 : 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).....	82
Figure 35 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des fruits de <i>Schinus molle</i>	83
Figure 36 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des fruits de <i>Schinus molle</i>	83
Figure 37 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des feuilles de <i>Schinus molle</i>	84
Figure 38 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des feuilles de <i>Schinus molle</i>	84
Figure 39 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des feuilles de <i>Pistacia vera</i>	85
Figure 40 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des feuilles de <i>Pistacia vera</i>	85
Figure 41 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.....	86
Figure 42 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile essentielle des feuilles de <i>Schinus molle</i>	88
Figure 43 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile essentielle des fruits de <i>Schinus molle</i>	89
Figure 44 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.....	89
Figure 45 : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes.....	91
Figure 46 : Pourcentage d'inhibition de l'amphotéricine B relatif aux différentes souches fongiques.....	92
Figure 47 : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles et des extraits bruts relatives aux différentes souches bactériennes.....	93
Figure 48 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de <i>Schinus molle</i> relatif aux différentes souches fongiques.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Provenance des germes étudiés.....	52
Tableau 2 : Antibiotiques utilisés.....	53
Tableau 3 : Antifongique utilisé.....	53
Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques.....	59
Tableau 5 : Comparaison des rendements en huiles essentielles de <i>Schinus molle</i> et <i>Pistacia vera</i> avec des travaux antérieurs.....	61
Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Schinus molle</i>	62
Tableau 7 : Comparaison de teneurs en composés majoritaires de nos échantillons avec celles de la littérature.....	68
Tableau 8 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques	73
Tableau 9 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques	75
Tableau 10 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques ..	77
Tableau 11 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de nos témoins des composés phénoliques par le système de solvants 3.....	79
Tableau 12 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques par le système de solvants 3.....	79
Tableau 13 : Composés identifiés dans le système de solvants 3.....	81
Tableau 14 : Valeurs des IC ₅₀ et le pouvoir anti-radicalaire (ARP) des flavonoïdes.....	87
Tableau 15 : Valeurs des IC ₅₀ et le pouvoir anti-radicalaire (ARP) de l'huile essentielle de <i>Schinus molle</i>	90
Tableau 16 : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles des feuilles et des fruits de <i>Schinus molle</i> sur les souches <i>E. coli</i> et <i>E. feacalis</i>	94

Abréviations utilisées

Vol	: Volume
%	: Pourcentage
μL	: Microlitre
μm	: Micromètre
ADN	: Acide désoxyribonucleïque
Amu	: Atomic mass unit
ATP	: Adénosine triphosphate
CCM	: Chromatographie sur couche mince
cm	: Centimètre
CoA	: Coenzyme A
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CPG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
[C]	: Concentration
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: densité optique
ev	: Electron volt
g	: Gramme
IR	: Indice de rétention
m	: Mètre
mg	: Milligramme
min	: Minute
mL	: Millilitre
mm	: Millimètre
nm	: Nanomètre
PPF	: Pyrophosphate de farnésyle
PPG	: Pyrophosphate de géranyle
PPI₂	: Pyrophosphate de diméthylallyle
PPI₃	: Pyrophosphate d'isopentèn-3-yle
Rf	: Rapport frontal
ROS	: Reactive Oxygen Species
Sol	: Solution
UV	: Ultra-violet

Introduction Générale

Au travers les âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**Hostettmann et al., 1998**).

Malgré les progrès réalisés en médecine, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que : cancer, Alzheimer, infections virales et bactériennes. A ceci, s'ajoute l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistantes aux traitements connus. Cependant, le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux.

La recherche de nouvelles molécules pharmacologiques actives via le screening de sources naturelles a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (**Gurib-Fakim, 2006**).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux composés pouvant avoir une application thérapeutique. Pour cela, notre laboratoire et principalement notre équipe de recherches s'intéresse à la chimie et aux activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante) des extraits végétaux des plantes soupçonnées médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels (**Bendimerad et al., 2005 ; Bendimerad et al., 2007 ; Bekhechi et al., 2007 ; Belarbi et al., 2007**). Les plantes étudiées peuvent être une source de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes.

L'intérêt porté à la famille des anacardiées nous a conduit à élargir nos recherches à deux espèces de l'ordre des térébintales *Schinus molle* et *Pistacia vera* parce qu'elles sont susceptibles de contenir des molécules thérapeutiques proches de celles des autres espèces de cette famille telles que *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* (Benhammou et al., 2007 ; Atik Bekkara et al., 2008 ; Benhammou et al., 2008). En outre, les deux espèces étudiées n'ont fait l'objet d'un aucun travail chimique en Algérie. Par contre, pour les huiles essentielles de ces deux espèces, des travaux ont été faits ailleurs (Rossini et al., 1996 ; Duru et al., 2003 ; Tsokou et al., 2007 ; Hayouni et al., 2008).

Initialement, ces plantes ont été étudiées en raison des propriétés thérapeutiques que leur attribuait la médecine traditionnelle dans plusieurs pays (Taylor, 2005).

Le présent travail apporte donc une contribution à la connaissance de ces deux espèces à travers leur étude phytochimique et la mise en évidence des propriétés antimicrobienne et anti-oxydante de leurs essences et leurs extraits phénoliques en vue de l'utilisation ultérieure dans l'industrie.

Dans la première partie, nous aborderons, dans un premier chapitre, l'état des connaissances bibliographiques sur ces deux plantes et leur famille. Dans le second, chapitre, nous détaillerons ainsi deux classes chimiques : les flavonoïdes et les huiles essentielles. Nous développerons également, dans le dernier chapitre, l'utilisation de différentes techniques d'analyses chromatographiques pour l'identification de composés naturels tels que les huiles essentielles et les flavonoïdes.

Dans la deuxième partie, nous appliquerons les méthodes utilisées pour :

- la détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique.
- La détermination des rendements et de la composition chimique des extraits (flavonoïdes et huiles essentielles) des deux plantes, avec application de deux techniques chromatographiques (CCM et CPG/SM) respectivement.
- Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.
- L'évaluation de l'activité anti-oxydante de ces deux métabolites secondaires. La capacité anti-oxydante des extraits a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH[•] Avec la détermination des IC₅₀ et ARP.

- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits bruts vis-à-vis de cinq souches bactériennes et quatre souches fongiques.

La dernière partie sera consacrée à la discussion des résultats de l'étude phytochimique, de l'identification des composés isolés et également de l'activité antimicrobienne et anti-oxydante.

Première partie

Synthèse bibliographique

I. Présentation des plantes sélectionnées

I.1. Introduction

Dans la classification botanique, la famille des anacardiées appelée aussi térébinthacées, constitue une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones. Elle regroupe approximativement 60 genres et 500 espèces, habitant les contrées chaudes et tempérées du globe (Gaston, 1990).

La systématique des anacardiées selon *Quezel et santa (1963)* :

Règne : Végétal

Sous règne : Trachéobianta – plantes vasculaires

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Dialypétales ou Rosidées

Ordre : Térébintales ou sapindales

Famille : Anacardiées ou térébinthacées.

I.2. Espèce *Schinus molle*

Genre : *Schinus*

Espèce : *Schinus molle* L.

Nom commun : Faux poivrier

I.2.1. Description botanique

Schinus molle est un arbre persistant à tronc de 5 à 10 m de hauteur, ramure arrondie, jeunes branches étalées ou pleureuses, jeunes rameaux lisses, à moelle abondante.

Les feuilles sont vertes composées paripennées, aromatiques lorsqu'elles sont froissées, de 2 à 6 cm de longueur.

Les fleurs sont jaunes verdâtres en panicules lâches. Les fruits pisciformes, roses abondants et très ornementaux, mesurent environ 8 mm de diamètre (Belot, 1978 ; Becker et al., 1982 ; Somon, 1987).

I.2.2. Répartition géographique

L'espèce *Schinus molle* L., est un arbre originaire d'Amérique du Sud, introduit dans la plupart des régions tropicales et subtropicales (Olafsson et al., 1997), elle est très répandue en Équateur et au Pérou.

Elle s'adapte à tous les climats, mais elle se plaît généralement bien sur le littoral méditerranéen (Taylor, 2005).

I.2.3. Propriétés thérapeutiques

Les effets thérapeutiques de cette plante sont diverses. En Europe, cette espèce est répandue comme plante ornementale dans de nombreux domaines, Leurs fruits sont consommés comme épice et produisent une huile volatile qui a été utilisée comme un substitut de poivre noir et des produits pharmaceutiques. Elle est utilisée traditionnellement comme antihémorragique, antiseptique, laxatif (doux), astringent, cardiotonique, stimulant digestif, diurétique, stimulant menstruel, stimulant, tonifiant, et comme antidépresseur (Taylor, 2005).

Les études pharmacologiques menées avec des extraits de *Schinus molle* ont montré que cette plante exerce plusieurs effets biologiques, tels que : un agent hypotenseur (Bello et al., 1996), analgésique (Barrachina et al., 1997), antispasmodique (Bello et al., 1998), antitumoral (Ruffa et al., 2002) et antifongique (Quiroga et al., 2001 ; Schmourlo et al., 2005).

Une étude récente a conduit à l'isolement de trois agents anti-inflammatoires, deux sont des acides triterpénoïdal et un biflavanone (Yucquin et al., 2003).

1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles - travaux antérieurs

Les huiles essentielles de *Schinus molle* ont fait l'objet de plusieurs travaux décrivant leur composition chimique très variée.

Les premiers travaux effectués par **Rossini et al. (1996)** rapportent que l'huile essentielle extraite des feuilles de *Schinus molle* provenant de l'Uruguay, analysée par CPG/SM, ont révélé l'existence d'un seul composé majoritaire qui est le bicyclogermacrène (29,20%).

Une étude de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles et des fruits effectuée par **Baser et al. (1997)**, révèle la présence d'un composé majoritaire l'alpha-phellandène (38,1% et 22,1%) suivi du bêta-phellandène (11,8% et 10,4%), le limonène (11,6% et 10,4%) et l'alpha-cadinol (7,2% et 5,6%).

En 2004, **Marongiu et al.**, ont pu identifier 26 composés représentant 98,9% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles de *Schinus molle*. Les deux composés majoritaires sont : l'alpha-phellandène (26,1%) et le bêta-phellandène (21%).

En 2004, les travaux réalisés par **Ibrahim et al.**, sur l'huile essentielle des feuilles et des fruits de *Schinus molle* provenant de l'Egypte, ont montré l'existence de l'alpha-phellandène comme composé majoritaire dans les deux parties de la plante avec des pourcentages respectifs 39,72% et 23,4%.

Par ailleurs, en Pérou, **Huaman et al. (2004)** ont identifié 31 composés dans l'huile essentielle des fruits qui représentent un pourcentage variant entre 94,9 et 98,2%. Ils avancent que les composants majoritaires sont : le myrcène (42%), l'alpha-phellandène (25%), le limonène (19%) et le bêta-phellandène (9,7%).

En outre, l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle*, poussant en Tunisie, est caractérisée par une prédominance des composés suivants : l'alpha phellandène (35,86%), le bêta phellandène (29,3%) et le bêta pinène (15,68%), (**Hayouni et al. 2008**).

L'huile essentielle de *Schinus molle* provenant d'Algérie n'a fait l'objet d'aucun travail phytochimique auparavant.



Figure 1 : *Schinus molle* (arbre)



Figure 2 : *Schinus molle* (fruits)

1.3. Espèce *Pistacia vera*

Genre : *Pistacia*

Espèce : *Pistacia vera* L.

Nom commun : Vrai pistachier

1.3.1. Description botanique

Pistacia vera est un arbre qui atteint 7 à 10 m de hauteur, aux feuilles caduques, fleurs printanières et aux fruits comestibles, les pistaches.

Les feuilles sont vertes caduques, composées et pennées, légèrement aromatiques. Elles sont couvertes de poils courts, elles possèdent de 3 à 5 folioles en général. Ces derniers peuvent dépasser 4 cm de largeur.

Il montre en mai et juin ses fleurs brunâtres, et fructifie à la fin de l'été. Les fruits ont environ la grosseur d'une olive, charnus, de couleur verdâtre et de saveur douce, logés dans une coque s'ouvrant latéralement quand le fruit est mûr (Gaston, 1990).

1.3.2. Répartition géographique

L'espèce *Pistacia vera*, est un arbre originaire de Syrie, introduit à Rome et depuis, cultivé sur le bassin méditerranéen, elle est très répandue en moyen orient, l'Iran est l'un des plus grands pays producteurs et exportateurs de pistache (Gaston, 1990).

1.3.3. Propriétés thérapeutiques

La plante est utilisée par la population turque pour traiter l'asthme, en mâchant les feuilles, les hémorroïdes (externe) ainsi que comme stomachique (en mâchant de la gomme) (Baytop, 1999).

Il existe très peu de travaux portant sur l'activité biologique du pistachier. Une seule étude a été faite par Berrin et al. (2005) sur l'activité antimicrobienne des extraits lipophiliques de *Pistacia vera*. Cette étude montre que ces extraits ont une activité modérée sur quelques espèces bactériennes et fongiques.

1.3.4. Composition chimique des huiles essentielles - travaux antérieurs

Le genre *Pistacia* regroupe un grand nombre d'espèces et de variétés. La caractérisation des huiles essentielles du genre *Pistacia* a fait l'objet de plusieurs travaux (Barra et al., 2007). Cependant, l'huile essentielle de *Pistacia vera* a fait l'objet de trois travaux.

Une étude effectuée par Duru et al. (2003), montre que l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia vera* présente un rendement très faible de l'ordre de (0,15%). L'analyse chimique par CPG/SM de l'huile essentielle de cette plante récoltée en Turquie, a révélé l'existence d'un composé majoritaire, l'alpha-pinène (29,2%) suivi du limonène (12,4%) et l'alpha-terpinéol (9,6%). Les monoterpènes hydrocarbonés représentent 59,5% de la composition totale de l'huile essentielle et les monoterpènes oxygénés (22,6%). Cet auteur a effectué en parallèle l'analyse chimique de l'huile essentielle de deux autres espèces *Pistacia terebinthus* et *Pistacia lentiscus*, qui présentent toutes les deux une teneur élevée en terpinène-4-ol (33,7% et 29,9% respectivement).

Hakki Alma et al. (2004) avancent que le composé majoritaire présent dans l'huile essentielle de *Pistacia vera* est l'alpha-pinène (75,6%).

Tsokou et al. (2007) rapportent que l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia vera* provenant de la Grèce contient comme composés majoritaires : l'alpha-pinène (30%) et le terpinolène (17,6%).



Figure 3 : *Pistacia vera*.

II. Quelques classes chimiques rencontrées chez les végétaux

II.1. Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments.

Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Les différentes classes chimiques rencontrées chez les végétaux sont les suivantes :

- **Les tanins** : Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles. On distingue habituellement, chez les végétaux, deux groupes de tanins différents par leurs structures et par leur origine biogénétique (Scalbert, 1991 ; Bruneton, 1999).
 - **Les tanins hydrolysables** : ou pyrogalliques qui sont des polyesters de glucides et d'acides-phénol. Ils se divisent à leur tour en tanins galliques et tanins ellagiques.
 - **Les tanins condensés** : appelés aussi proanthocyanidols, différent fondamentalement des tanins galliques et ellagiques. Leur structure ressemble à celle des flavonoïdes. Ce sont des polymères flavaniques formés d'unités de flavan-3-ols liées entre eux par des liaisons carbone-carbone.

Les tanins ont des propriétés biologiques remarquables. Ils favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. De plus, ils ont un effet antiseptique. En outre, ils jouent le rôle d'inhibiteurs enzymatiques (Bruneton, 1999).

- **Les alcaloïdes** : Ce sont des composés organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azotés existant à l'état de sels et biosynthétiquement formés à partir des acides

aminés. Ce sont des substances intéressantes par leur activité pharmacologique dans des domaines variés (Bruneton, 1999).

- **Les saponosides** : Les saponosides constituent un groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Structurellement, ils peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine : les saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpéniques. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, vasculoprotectrices et veinotoniques (Facino et al., 1995).
- **L'amidon** : L'amidon se comporte comme une substance de réserve principale des végétaux. Il existe sous forme d'une structure correspondant à un homopolymère de D-glucose. En pharmacie, le principal usage des amidons est celui d'adjuvant dans la formulation des comprimés (Guignard, 1979).
- **Les composés réducteurs** : Les glucides, appelés hydrates de carbone, ce sont des composés organiques carbonylés (aldéhydiques ou cétoniques).
- **Les stérols et stéroïdes** : Ce sont des composés terpéniques se présentant sous forme d'alcool libre ou sous forme d'esters associés par le glucose (Linden et Lowient, 1994). Ils jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles (Kamm et Dionisi, 2001). Ils demeurent indispensables pour couvrir les besoins de l'industrie pharmaceutique en médicaments stéroïdiques. Ils ont aussi une potentialité thérapeutique dans les domaines les plus divers : antiviraux, insecticides et analgésiques (Connolly et Hill, 1991 ; John Goad, 1991).
- **Anthocyanosides** : Le terme anthocyanine désigne toute substance responsable de la coloration des fleurs et des fruits, ils sont issus du métabolisme des flavonoïdes. Ces pigments existent sous la forme d'hétérosides (les anthocyanosides) et leurs génines (les anthocyanidols). Comme beaucoup d'autres composés phénoliques, les pigments anthocyaniques se comportent comme des piègeurs de radicaux libres. L'intérêt majeur des anthocyanosides est leur pouvoir colorant (Jackman et Smith, 1996).
- **Les anthracénosides et émодols** : Cette classe regroupe tous les composés phénoliques, hétérosidiques, dérivés de l'anthracène de degré d'oxydation variable. De plus les émодols sont des dérivés hydroxy-anthracéniques. Ce sont des laxatifs stimulants et ils agissent sur la motilité intestinale (Larousse, 2001).

- **Les coumarines** : Ce sont des dérivés de la benzo- α -pyrone, leurs propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone. Leur spectre UV est caractéristique et sert à leur identification (Hoult et Paya, 1996 ; Namba et al., 1988). L'intérêt pharmacologique des coumarines est limité. Certaines sont présentées comme veinotoniques et vasculoprotectrices (Bruneton, 1999).

Ces classes chimiques sont réputées actives, mais plus particulièrement, les flavonoïdes et les huiles essentielles sont reconnus pour leur grande activité biologique, ils occupent une très grande place dans le domaine de la pharmacologie, d'où notre intérêt envers ces classes.

II.2. Les flavonoïdes

II.2.1. Introduction

L'oxydoréduction est un processus nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, où l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie.

Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres (Vansant, 2004).

Ces radicaux centrés sur l'oxygène (appelés ainsi parce que l'électron célibataire est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne) (Favier, 2003). Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN.

Ces dommages oxydatifs sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (Gutteridge, 1993).

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes).

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, Les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes.

II.2.2. Définition

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, qui appartiennent à la famille des polyphénols. Ils font partie des composés les plus répandus et les plus nombreux dans la quasi-totalité des plantes (Bruneton, 1999). Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines). Ils sont également présents dans les épices et les herbes aromatiques (Marfak, 2003).

II.2.3. Rôles des flavonoïdes chez les plantes

Les flavonoïdes sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogenèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Di Carlo et al., 1999 ; Pietta, 2000).

II.2.4. Chimie des flavonoïdes

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Bruneton, 1999)

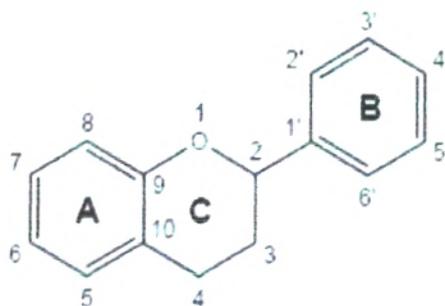
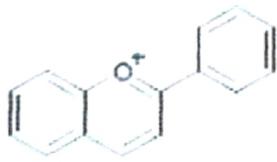


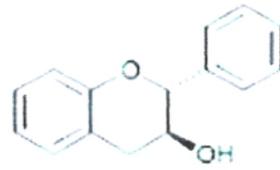
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (figure 5), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Harborne, 1988).

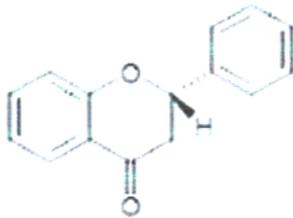
Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Bruneton, 1999).



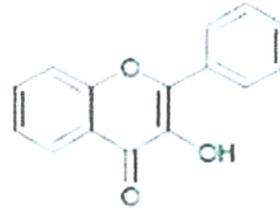
Anthocyanane



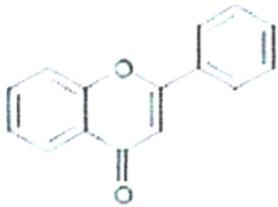
Catéchine



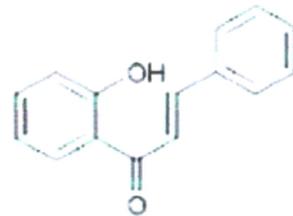
Flavanone



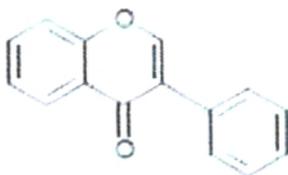
Flavonol



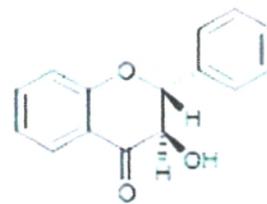
Flavone



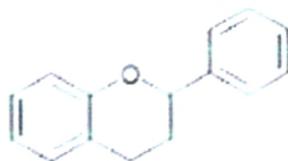
Chalcone



Isoflavone



Dihydroflavonol



Flavane



Aurone

Figure 5 : Diverses classes de flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II.2.5. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-Coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figure 6).

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalconeisomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (Heller et Forkmann, 1993).

II.2.6. Propriétés chimiques et activités biologiques

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très important et qui présentent un grand intérêt dans de nombreux domaines.

Leurs propriétés thérapeutiques ont été largement étudiées. La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

- **Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux : suppression de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Pietta, 2000)**

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde. Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération du ROS telles que les cyclooxygénases, les lipoxygénases, ou les monooxygénases microsomiales (Pietta, 2000).

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques. C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (telle que la quercétine) par une action de chélation du fer (Cuyckens et Claeys, 2004).

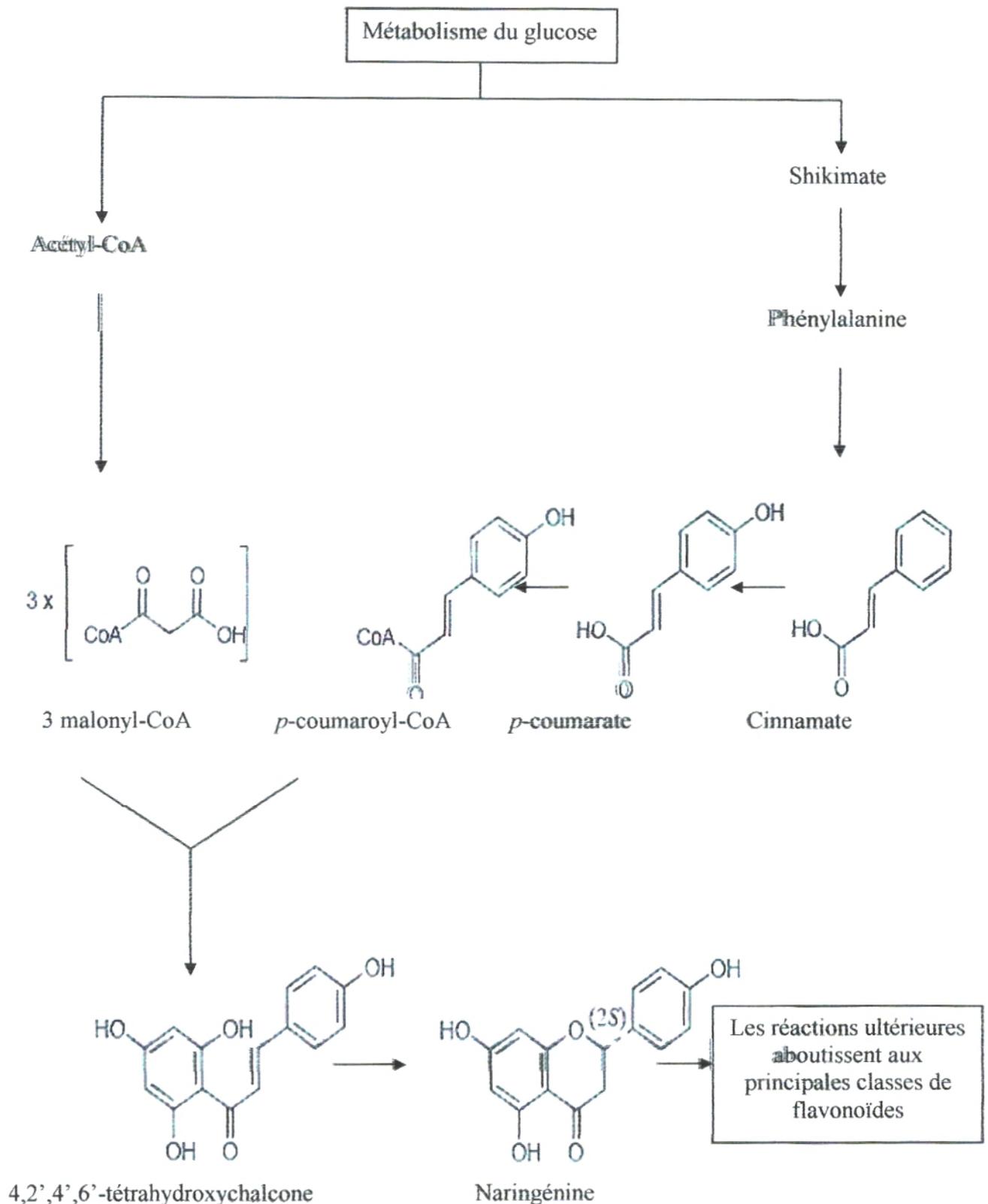


Figure 6 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine (Heller et Forkmann, 1993).

- **Piégeage de radicaux**

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène (Pietta, 2000). L'oxyde nitrique qui forme, en se combinant avec le radical superoxyde, le très délétère peroxyde d'azote est également piégé par les flavonoïdes. Le radical flavonoïde ainsi formé est stable et interrompt les événements de dégradation cellulaire initiés par l'attaque radicalaire (Hollman et Katan, 1997).

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, inflammations chroniques... De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Da Silva *et al.*, 1994 ; Galati *et al.*, 1994 ; Read, 1995), athéroscléroses...

Ainsi, leur propriété de piègeurs de radicaux implique les flavonoïdes dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les ROS sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires (Brasseur, 1989) et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses (Merken et Beecher, 2000). De ce fait, ils sembleraient également intervenir dans la prévention de cancers, d'athérosclérose, d'hypertension et des maladies cardio-vasculaires. Ils sont également reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques.

Outre leur pouvoir antioxydant, certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones). Plus généralement, les flavonoïdes sont utilisés pour toute une gamme d'activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices (ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire) (Middleton, 1996). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee *et al.*, 1986 ; Namgoong *et al.*, 1994) et sont des anti-hépatotoxiques et anti-ostéoporotiques (Sannomiya *et al.*, 2005 ; de Rijke *et al.*, 2006).

Contre les allergies, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki ; 1984). Ils ont également une activité antivirale (Van Hoof et al., 1984)

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et antidiarrhéiques (Di Carlo et al., 1999). Des études épidémiologiques ont démontré qu'une consommation régulière de fruits frais et de légumes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et d'apparition de certains cancers (Hertog et al., 1993). Ces effets sont attribués, en partie, aux concentrations relativement importantes des flavonoïdes présents dans ces aliments.

Sur le plan cosmétique, les flavonoïdes peuvent entrer dans la fabrication de crèmes adoucissantes de la peau. En effet, les flavonoïdes sont des substances qui absorbent dans l'ultraviolet et peuvent, pour cela, être utilisés pour la protection de la peau contre les rayons solaires nocifs.

II.3. Les huiles essentielles

II.3.1. Introduction

Le règne végétal comprend des substances organiques de structure et d'utilisation variées (Lafon et al., 1988).

En effet, les plantes renferment des composants chimiques qui se répartissent en deux grands groupes. Le premier regroupe les constituants du métabolisme primaire (les glucides, les lipides, les protides...) qui existent en permanence au sein de la plante. Le deuxième regroupe les constituants provenant du métabolisme secondaire (pigments, polyphénols, vitamines, les huiles essentielles...) qui ne sont pas toujours présents chez les végétaux. Ces métabolites secondaires ont des rôles biologiques divers.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau les plantes pour soigner les maladies qui résistent aux médicaments.

L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification des huiles essentielles selon leur capacité à lutter contre les bactéries.

II.3.2. Définition

Les huiles essentielles, ou essences aromatiques végétales, sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales. Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras, elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles. Ces essences peuvent être regroupées en cinq classes : les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones et les lactones. Elles sont souvent colorées du jaune pâle au rouge foncé voire brun, en passant par le vert émeraude. Elles sont obtenues par différentes techniques d'extraction.

Néanmoins, diverses significations leurs sont données par les botanistes, chimistes, industriels, parfumeurs, et pharmacologues.

Depuis, la norme AFNOR définit l'huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 1989).

II.3.3. Répartition, Localisation

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques. Elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles (Richter, 1993).

Ces essences se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante ; dans une même plante, ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes, où la composition chimique peut varier d'un organe à un autre.

Ces essences aromatiques sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante, au sein du cytoplasme de certaines cellules où elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes, ensuite elles sont stockées dans des cavités, les cellules sécrétrices sont souvent localisés sur ou à proximité de la surface de la plante ce qui facilite leur émission (Bruneton, 1999).

II.3.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Les huiles essentielles ont des fonctions multiples dans la nature. Actuellement, il est difficile de les préciser dans tous les cas. Néanmoins, il semble probable qu'elles aient un rôle écologique car, dans les régions désertiques, elles conservent l'humidité autour de la plante ce qui empêche la température d'augmenter d'une manière excessive pendant le jour et de baisser au cours de la nuit (**Belaïche, 1979**).

En effet, expérimentalement, il a été établi qu'elles exercent des interactions sur les végétaux et les animaux. Ainsi, elles constituent un moyen de communication (**Bruneton, 1993**). Certaines essences attirent les insectes et favorisent la pollinisation, tandis que d'autres servent à la défense des plantes contre les prédateurs (herbivores, insectes, micro-organismes) (**Capo et al., 1990**).

Toutefois, la fonction des essences au sein de la plante reste encore un phénomène assez obscur (**Rai et al., 2003**).

II.3.5. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est généralement très complexe, à la fois par la diversité considérable de leurs structures, et par le nombre élevé de constituants présents. Ces derniers appartiennent à deux grands groupes.

Le premier groupe est celui des terpénoïdes. Ce sont des hydrocarbures de structure très diverses (acycliques, monocycliques, bicycliques...) constituant une chaîne plus ou moins longue. Les molécules de cette famille sont formées de l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques (**Figure 7**), unité composée de cinq carbones isopréniques, de formule brute $(C_5H_8)_n$ (**Allinger et al., 1975**). Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés (**Figure 8**). Ce groupe renferme surtout les monoterpènes (C_{10}) et quelques sesquiterpènes (C_{15}), rarement des diterpènes (C_{20}).

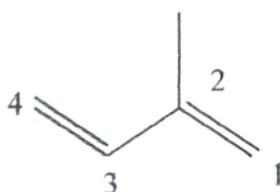
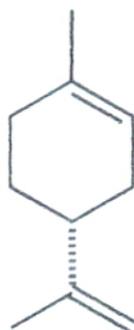


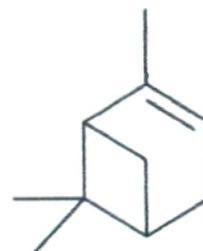
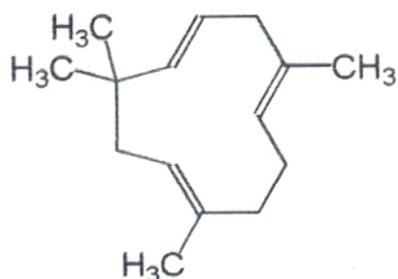
Figure 7 : Unité isoprénique.

Le second groupe est celui des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui sont moins fréquent que les terpénoïdes (Svoboda et Hampson, 1999).

Entre ces deux catégories de composés, il existe naturellement d'autres corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines essences (esters, aldéhydes, alcools...) (Bruneton, 1993).



Limonène

 α -pinène

Humulène

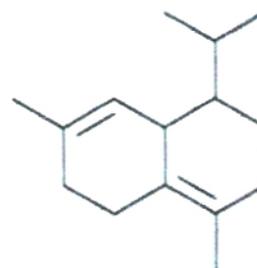
 δ -cadinène

Figure 8 : Structure de quelques composés terpéniques.

La composition chimique d'une essence varie en fonction d'un grand nombre de facteurs d'origine extrinsèque tel que l'origine géographique, les facteurs écologiques (climatiques, pédologiques...), qui exercent une influence directe sur la production et la quantité de l'essence (Garnero, 1985), et des facteurs d'origine intrinsèque tel que l'origine botanique, le chimiotype et le cycle biologique. Ce sont des variables qui dépendent de la plante elle-même.

II.3.6. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles

➤ Origine biosynthétique des terpènes

Les principales étapes de la formation des terpènes sont (Figure 9) :

- L'autocondensation de l'acétyl-Coenzyme A : ce dernier est condensé avec une autre molécule d'acétyl-Coenzyme A pour former le β -hydroxy β -glutaryl-CoA qui conduit, après réduction et hydrolyse à l'acide mévalonique.
- L'acide mévalonique activé enzymatiquement par phosphorylation fournit le pyrophosphate d'isopentèn-3-yle (PPI_3) par une réaction d'élimination et de décarboxylation.
- Une fraction de PPI_3 est isomérisée enzymatiquement en pyrophosphate de diméthylallyle (PPI_2). L'action de PPI_3 sur PPI_2 conduit par une liaison tête-queue au pyrophosphate de géranyle (PPG).

On peut obtenir tous les dérivés monoterpéniques acycliques à partir du PPG, comme par exemple le limonène...

- La condensation d'une autre unité PPI_3 sur le pyrophosphate de farnésyle (PPF) qui est le précurseur de tous les sesquiterpènes.

La biogénèse des autres terpènes (diterpènes... polyterpènes) s'explique par le même processus (Lamarti et al., 1994).

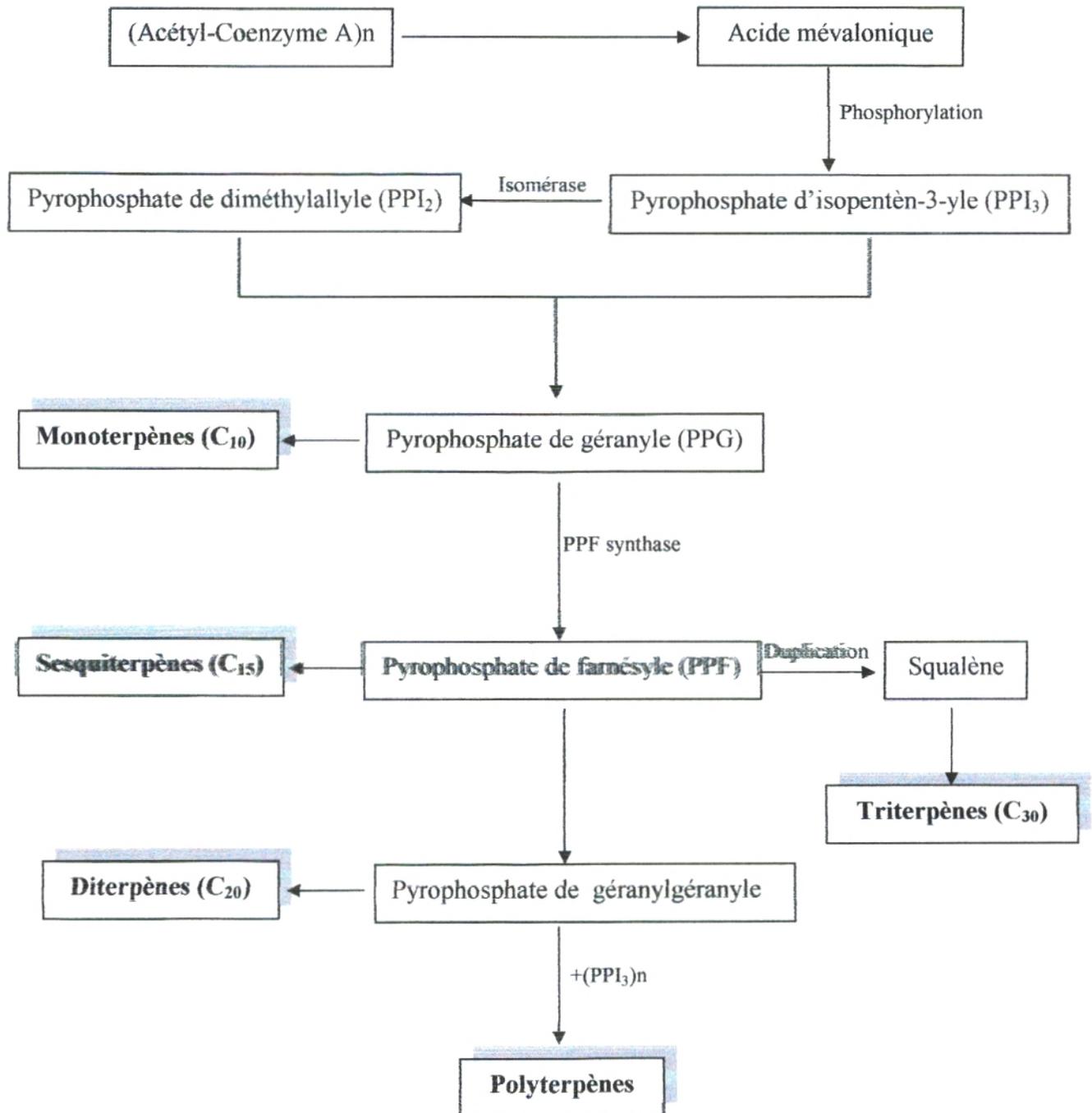


Figure 9 : Synthèse des différentes classes terpéniques chez les plantes (Dubey et al., 2003).

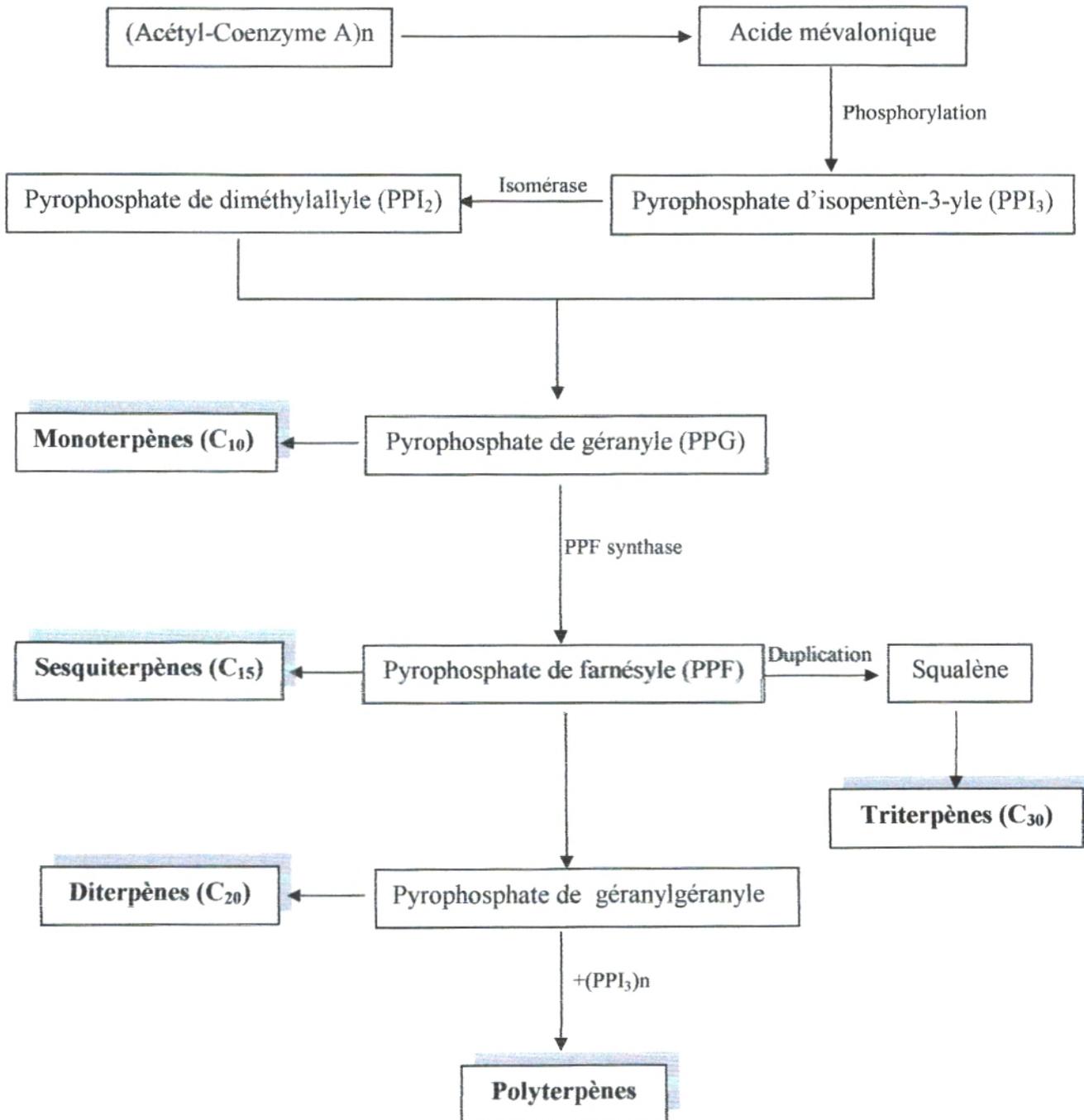


Figure 9 : Synthèse des différentes classes terpéniques chez les plantes (Dubey et al., 2003).

➤ **Origine biosynthétique des dérivés du phénylpropane**

Les dérivés du phénylpropane empruntent la voie de l'acide shikimique qui représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes. Cet acide est obtenu par condensation de l'acide pyruvique activé par phosphorylation.

L'addition d'une deuxième molécule d'acide pyruvique activé donne l'acide préphénique qui, par décarboxylation et élimination, conduit à l'acide phényle pyruvique. Ce dernier se transforme en phénylalanine, acide aromatique qui est à l'origine de la formation de nombreux composés aromatiques (Hatanaka et al., 1987).

II.3.7. Propriétés chimiques et activités biologiques

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les plantes aromatiques et leurs essences trouvent leur emploi dans de multiples domaines telles que : l'alimentation, la parfumerie par leurs propriétés odoriférantes, la pharmacie, l'aromathérapie, etc.

Les propriétés aromatisantes des huiles essentielles s'utilisent quotidiennement dans les préparations culinaires (thym, laurier,...), elles donnent aux condiments (poivre, cannelle,...) et aux aromates (menthe, anis,...) leurs saveurs. Elles sont également employées pour masquer l'odeur désagréable des médicaments destinés à la voie orale.

Le pouvoir anti-oxydant de certaines essences permet la conservation des aliments en évitant la prolifération des moisissures et l'altération des qualités organoleptiques de l'aliment.

Les essences sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire dans la préparation surgelées non seulement pour rehausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminants alimentaires de se développer (Bustaf et FoeGeding, 1983).

Cependant, elles sont très efficaces contre les moisissures, responsable de la détérioration des denrées alimentaires lors de leur stockage (Dwivedi et Singh, 1998 ; Mejholm et Dalgaard, 2002). Elles connaissent de nos jours un renouveau exceptionnel, il s'est avéré qu'elles ont une activité sur les germes résistant aux médicaments, ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies et les infections (Buchbauer et Jirovetz, 1994).

Les propriétés des essences sont innombrables et variables, elles sont dues à leur richesse en terpènes.

Les huiles essentielles sont douées d'un pouvoir de pénétration transcutanée : elles passent à travers la peau en très peu de temps (Valnet, 1984). Elles sont également antiseptiques pulmonaires, intestinales et urinaires (Sallé, 1991).

De nombreuses essences ont un effet analgésique tel que l'origan (Schwämmle et al., 2001), d'autres ont des propriétés antispasmodiques, vermifuges, antioxydants, etc.

La plupart des essences ont une action sur les parasites, les bactéries, les virus et les champignons.

- Le mode d'action des huiles essentielles contre les bactéries est large. Elles agissent, dans certains cas, par modification du bon fonctionnement de la membrane plasmique en réagissant avec les sites actifs des enzymes ou servent de transporteur de proton en réduisant la synthèse de l'ATP (Chang et al., 2001 ; Ultee et al., 2002). Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (Burt, 2004; Oussalah et al., 2006) :

- Au niveau de la paroi, elle provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- A l'intérieur de la cellule bactérienne, par son pouvoir acidifiant, elle bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Au niveau du matériel génétique, elle détruit l'ADN conduisant à la mort de la bactérie.

- L'action antifongique des essences est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite de contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox et al., 2000).

Elles ont aussi la propriété fondamentale de renforcer les défenses de l'organisme pour permettre de vaincre les maladies.

III. Méthodes d'analyses chromatographiques

III.1. Introduction

L'analyse des huiles essentielles et des flavonoïdes reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en œuvre simultanée ou successive de diverses techniques.

Elle est basée sur la purification des constituants par différentes techniques chromatographiques : chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC), chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP), Spectrométrie de Masse (SM), Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), Ultraviolet (UV), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN du proton et du carbone-13, RMN bidimensionnelle) (Cooper,1980; Silverstein *et al.*, 1991).

III.2. Identification des constituants dans un mélange complexe

L'analyse des mélanges complexes naturels peut être effectuée selon trois voies (Figure 10) :

- **La voie A** : est basée sur l'identification des constituants par le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques, qui permettent l'individualisation et l'identification des constituants. Elle est la plus couramment utilisée, tout au moins pour les analyses de routine.
- **La voie B** : fait intervenir la séparation de ces mêmes constituants, y compris les produits minoritaires, par diverses techniques chromatographiques, telles que la CCM, la CLC, la CLHP, la CPGP. Leur identification est alors réalisée par comparaison des données spectrales des composés isolés (SM, IR mais aussi RMN du proton et du carbone-13) avec celles de produits de référence. Cette méthode est forcément indispensable dans le cas de molécules nouvelles.
- **La voie C**, intermédiaire par rapport aux précédentes, met en œuvre la RMN du carbone-13 sans séparation préalable des constituants.

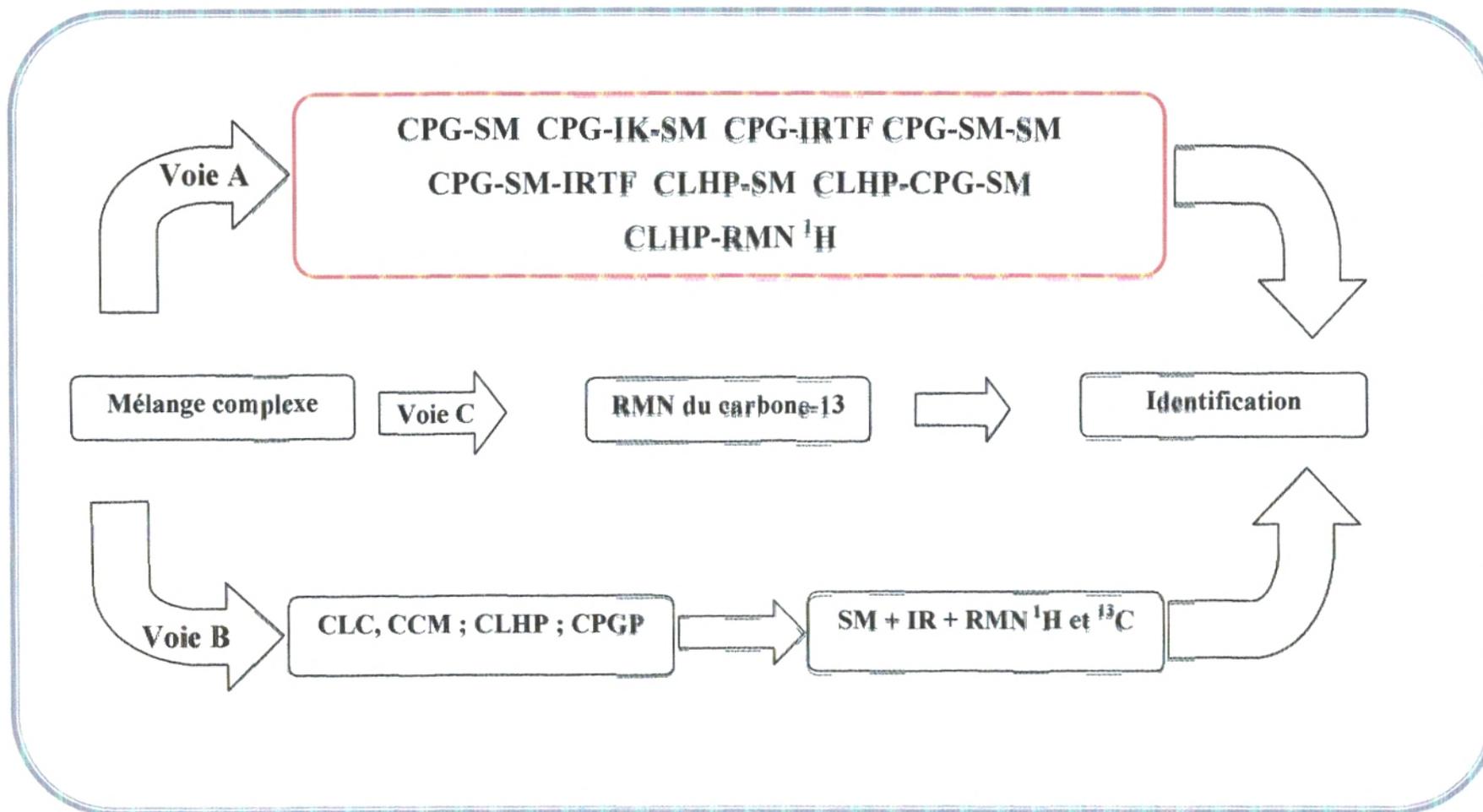


Figure 10 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe.

III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (**Figure 11**) est employée dans le suivi des purifications et permet de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés.

Une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) se compose d'un support en aluminium ou en verre, sur lequel est fixé une fine couche d'un produit d'adsorption (silice, cellulose, polyamide ...) comme phase stationnaire.

L'échantillon à étudier ($2\mu\text{L}$ de chaque extrait ainsi que les étalons) est déposé à l'état liquide par apposition successive d'une micropipette et éventuellement séché.

La plaque est placée ensuite en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre ; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal (Rf) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front de solvant).

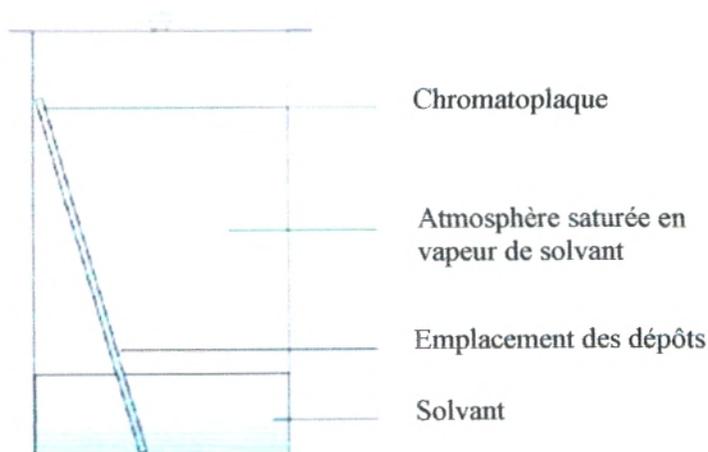


Figure 11 : Schéma d'une chromatographie sur couche mince.

III.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (**Figure 12**) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al., 1995**).

La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (**Arpino et al., 1995**).

La spécificité de la CPG est l'inertie de la phase mobile (azote, hélium ...), qui ne joue le rôle que de vecteur. La séparation dépend donc uniquement des interactions entre analytes et phase stationnaire. Les phases stationnaires peuvent être de plusieurs types (**Judeinstein et al., 1999 ; Rogalska et al., 2001**).

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (indice de rétention) (**Van Den Dool et Kratz, 1963**). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou plus rarement l'IRTF. La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

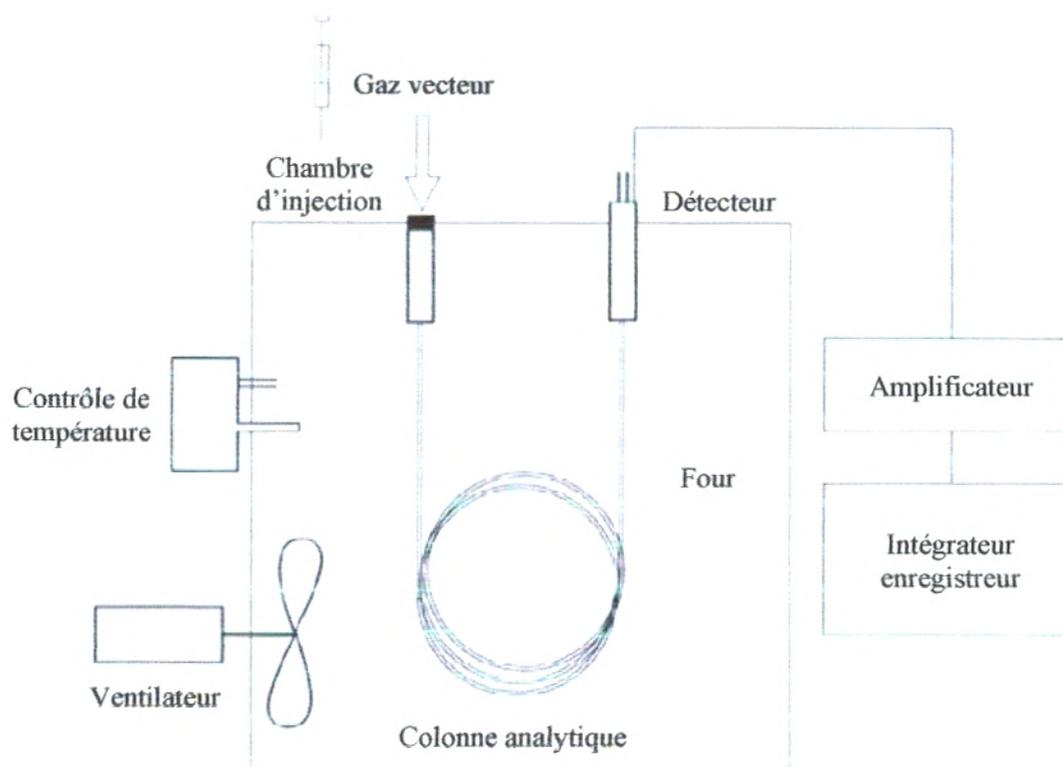


Figure 12 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.

III.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Cette technique d'analyse permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leur spectre de masse (Figure 13). Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation, les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil (Longeviaffe, 1981 ; Constantin, 1996).

Les systèmes modernes sont par ailleurs pilotés par un logiciel qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés. La co-élution avec des témoins authentiques en CPG peut permettre de confirmer une proposition de structure (Figure 14).

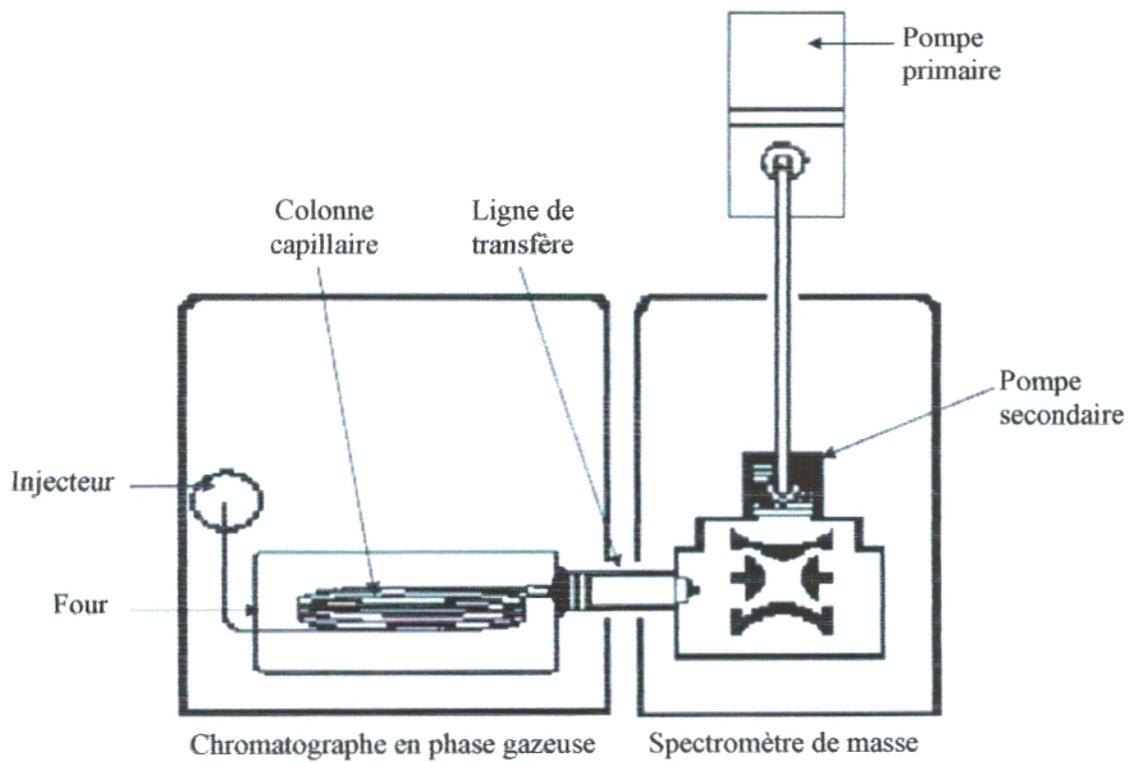


Figure 13 : Schéma d'un couplage CPG/SM.

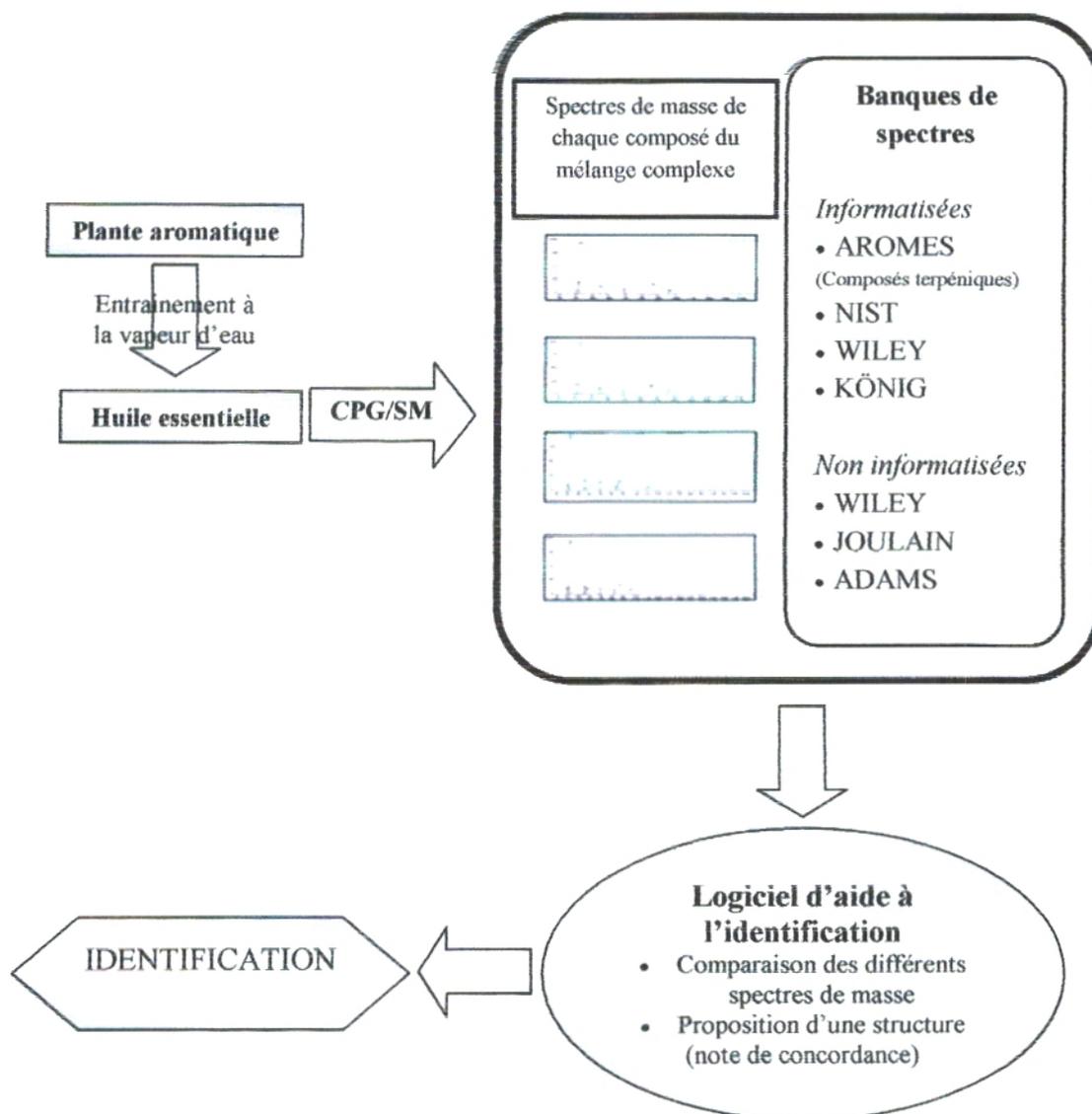


Figure 14 : Identification des composés d'une huile essentielle par CPG/SM.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

I. Introduction

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles de la région de Tlemcen, et plus particulièrement les plantes aromatiques, nous nous sommes intéressés particulièrement à deux espèces de la famille des anacardiacees, *Schinus molle* et *Pistacia vera*.

Pour cela, il est important de définir leurs identités, connaître leur composition chimique, et rechercher leurs activités biologiques.

II. Matériel végétal

Schinus molle a été récolté durant le mois de novembre 2007 dans la station de Remchi. *Pistacia vera* a été récolté en période de pleine floraison durant le mois de juin 2008 dans la station de Es safsaf de la région de Tlemcen (**figure 15**).

Les deux espèces ont été identifiées par le professeur Benabadji N. du Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels ; Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen (Algérie).

Après la récolte, les échantillons ont été triés puis mis pour séchage pendant plusieurs jours dans un endroit couvert, à l'abri de la lumière et du soleil, aéré afin de préserver le maximum d'intégrité des molécules. Le matériel végétal était retourné au fur et à mesure de son séchage.

Les plantes séchées ont été récupérées. Une petite quantité a été broyée et mise dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et conservés à basse température pour minimiser les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents aux caractères organiques de ces matières premières. Ces poudres servent à l'étude phytochimique.



Figure 15 : Carte de localisation géographique des stations d'études.

III. Tests phytochimiques

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leur composition chimique par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existant dans les différents organes des plantes.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

III.1. Différentes classes recherchées

III.1.1. Les flavonoïdes

Ils donnent généralement avec le Magnésium, en présence d'acide chlorhydrique, une coloration rose ou rouge (Cavé, 1993).

III.1.2. Les tanins

En présence des sels ferriques, les tanins hydrolysables donnent des précipités bleu-noirs. Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodate de potassium (KIO_3) (Bruneton, 1999).

Les tanins condensés sont caractérisés par les sels ferriques, le précipité coloré obtenu est brun-verdâtre. En présence de la vanilline chlorhydrique, ils sont colorés en rouge. (Bruneton, 1999 ; Paris et Hurabielle, 1981).

III.1.3. Les alcaloïdes

Leur caractérisation est faite en présence d'acide chlorhydrique, en additionnant quelques gouttes de réactif de Wagner afin d'obtenir un précipité brun indiquant leur présence (Memelink et al., 2001).

III.1.4. Les saponosides

Ils sont caractérisés par un indice de mousse, déterminé sur un décocté obtenu par ébullition prolongée. Après agitation, la hauteur de mousse est mesurée (Bruneton, 1999).

III.1.5. L'amidon

Il est caractérisé au moyen du réactif à l'eau iodée par apparition d'une couleur bleue (Guignard, 1979).

III.1.6. Les composés réducteurs

Ils sont caractérisés par la liqueur de Fehling. Ils donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

III.1.7. Les stérols et stéroïdes

Leur caractérisation est basée sur la réaction de Liebermann-Burchardt.

III.1.8. Anthocyanosides

Elles ont des colorations variant en fonction du pH. De rouge stable en $\text{pH} < 3$, elles virent au bleu en milieu alcalin.

III.1.9. Les anthracénosides et émodols

Leur caractérisation fait appel à la réaction de Bornträger. Cette dernière n'est positive qu'avec les formes anthraquinoniques libres.

III.1.10. Les coumarines

Elles sont caractérisées par une fluorescence des solutions extractives. L'examen en lumière UV permet leur révélation en milieu alcalin (KOH, NaOCH_3).

III.2. Epuisement du matériel végétal

L'épuisement est réalisé dans un ballon monocoil, surmonté d'un réfrigérant, contenant 50g de poudre de matériel végétal en présence de 300 mL de solvants : éthanol, éther diéthylique et eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et soumis à différents tests (Figure 16 et 17).

III.2.1. Réactifs et réactions de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests sont les suivants :

- **Réactif de Wagner** : Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I_2 dans 75 mL d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 mL d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 mL d'eau.
- **Réactif d'amidon** : Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5 mL de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.
- **Réaction de Liebermann-Burchardt** : Mélanger 5 mL de la solution à tester avec 5 mL d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C.

Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.

- **Réaction de Bornträger** : En milieu alcalin aqueux (NH_4OH), les anthracénosides et les émolois donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

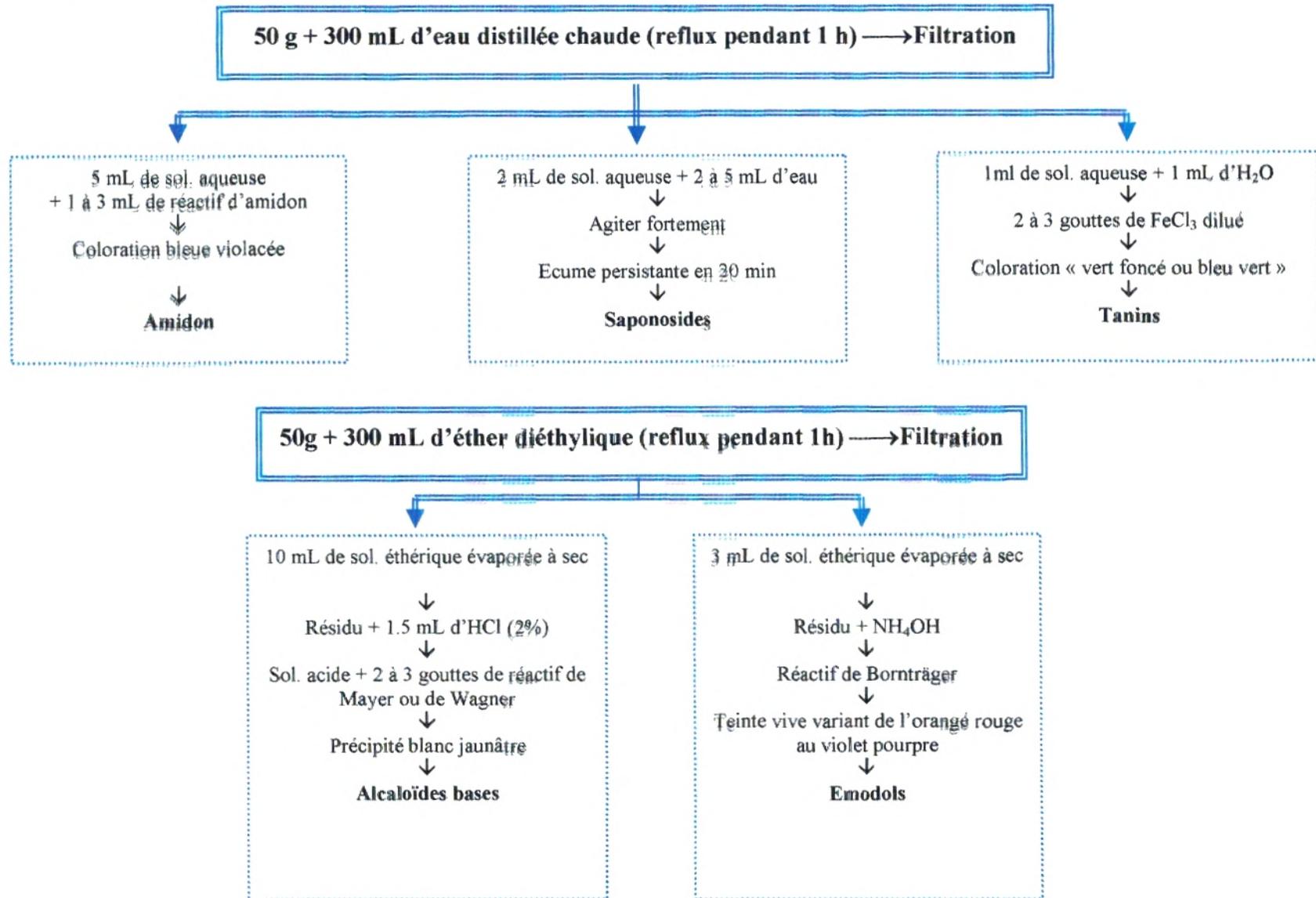


Figure 16 : Représentation schématique des tests phytochimiques.

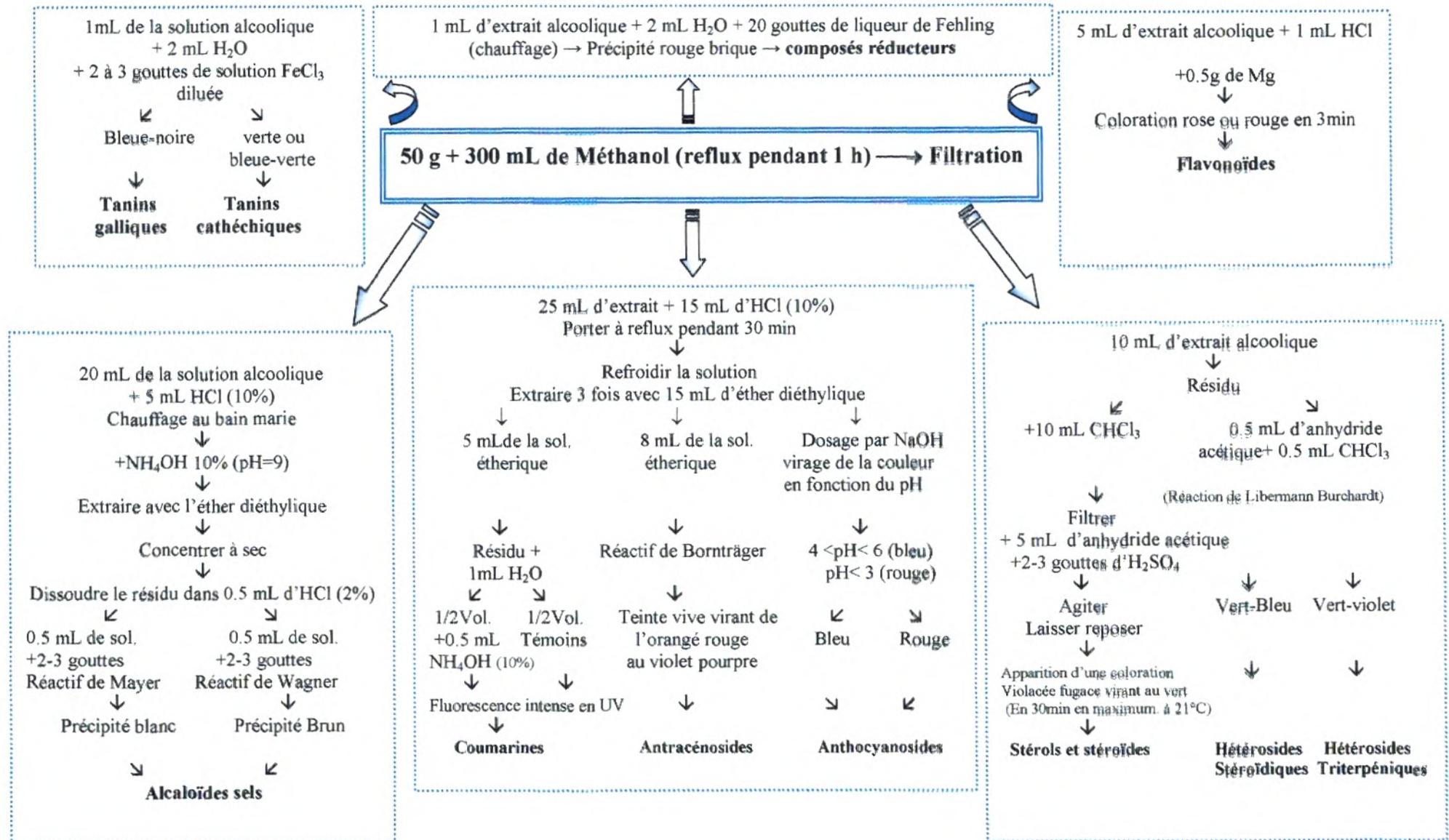


Figure 17 : Représentation schématique des tests phytochimiques (suite).

IV. Extractions sélectives

IV.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction est présentée, la plupart du temps, comme un procédé de séparation par lequel un matériau peut être traité par différentes méthodes. Dans le cas particulier des huiles essentielles, d'une façon générale, l'extraction est faite par entraînement à la vapeur d'eau. Cette méthode est un procédé de séparation basé après condensation sur la différence de composition entre l'eau et la vapeur produite pendant l'exécution de l'opération unitaire (Rose, 1965 ; Lawrencet, 2000).

- **Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur provenant d'un alambic rempli d'eau au préalable (**Annexe A**). Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées dans des réfrigérants puis décantées dans une ampoule à décanter. L'huile essentielle récupérée est conservée au congélateur jusqu'à analyse.

IV.1.1. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile extraite et la masse de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (m / m_0) \times 100$$

R (%) : Rendement en huile essentielle exprimé en %.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

m₀ : Masse en grammes du matériel végétal sec à traiter.

IV.1.2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/SM

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. Des méthodes appropriées ont été utilisées pour l'identification des molécules qu'elles soient volatiles et présentes dans l'huile essentielle.

L'identification de ces molécules est faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

➤ **Principe de CPG/SM**

Cette technique est réalisée pour l'analyse de la composition des huiles essentielles. Elle permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leur spectre de masse (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996).

Les systèmes modernes sont par ailleurs pilotés par un logiciel qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés. La co-élution avec des témoins authentiques en CPG peut permettre de confirmer une proposition de structure.

➤ **Conditions opératoires**

Les analyses des huiles essentielles par CPG/SM ont été effectuées au Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA) de l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

Les analyses chromatographiques ont été réalisées avec un chromatographe Hewlett-Packard 6890N muni d'un injecteur automatique couplé à un spectromètre de masse (HP 5973).

- Ionisation par impact électronique à 70 eV ;
- Gamme de détection des ions : 35-400 amu ;
- Colonne capillaire apolaire HP-1 (50 m x 0,2 mm x 0,5 µm) ;
- Mode splitless ;
- Gaz vecteur : Hélium ;
- Programmation de la température : 60-200°C à raison de 2°C/min, puis 200°C pendant 120 min.
- Température de l'injecteur : 250°C ;
- Température du détecteur : 250°C ;
- Volume injecté : 0,2 µL.

Les indices de rétention ont été déterminés par injection d'une série d'alcane linéaires allant de C₇-C₂₈.

Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur des colonnes de même type dans la littérature (Jennigs et Shibamoto, 1980 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1989 ; Davies, 1990 ; Adams, 1995 ; Joulain et König, 1998 ; Bacis, 1999 ; Joulain et al., 2001).

IV.2. Extraction des composés phénoliques

Pour l'extraction des flavonoïdes, nous avons adopté la méthode de Bekkara et al., (1998).

La matière végétale sèche et broyée (2 g) a été mélangée avec 100 mL de méthanol aqueux (70:30) (v/v).

Le mélange est mis sous reflux pendant 3 h à 70°C. Après refroidissement à la température ambiante, l'extrait méthanolique est filtré puis évaporé sous pression réduite à sec par le Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200) et à une température de 45°C. Le résidu sec pesé a été repris dans 5mL de méthanol puis conservé à +4°C. Ce dernier étant l'extrait brut. Il servira au dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.

IV.2.1. Calculs des rendements en extraits bruts secs

Pour déterminer le rendement en extrait sec, il est nécessaire de calculer le rapport de la différence entre la masse du ballon utilisé après évaporation de l'extrait méthanolique et sa masse avant d'être utilisé (vide) exprimé en gramme, avec la masse de la matière végétale utilisée en gramme. Les rendements sont calculés par rapport à 100g de la matière végétale sèche de départ.

$$R(\%) = [(P_1 - P_2) / M] \times 100$$

R (%): Rendement exprimé en %.

P₁ : Poids du ballon après évaporation.

P₂ : Poids du ballon avant évaporation.

M : Masse de la matière végétale à traiter.

IV.2.2. Extraction des flavonoïdes

Les résidus secs, obtenus après évaporation du filtrat méthanolique de chaque plante, sont repris dans de l'eau bouillante et épuisés dans une ampoule à décanter successivement par l'acétate d'éthyle et le n-butanol avec un rapport de volume égale à 1 (v/v) (Figure 18).

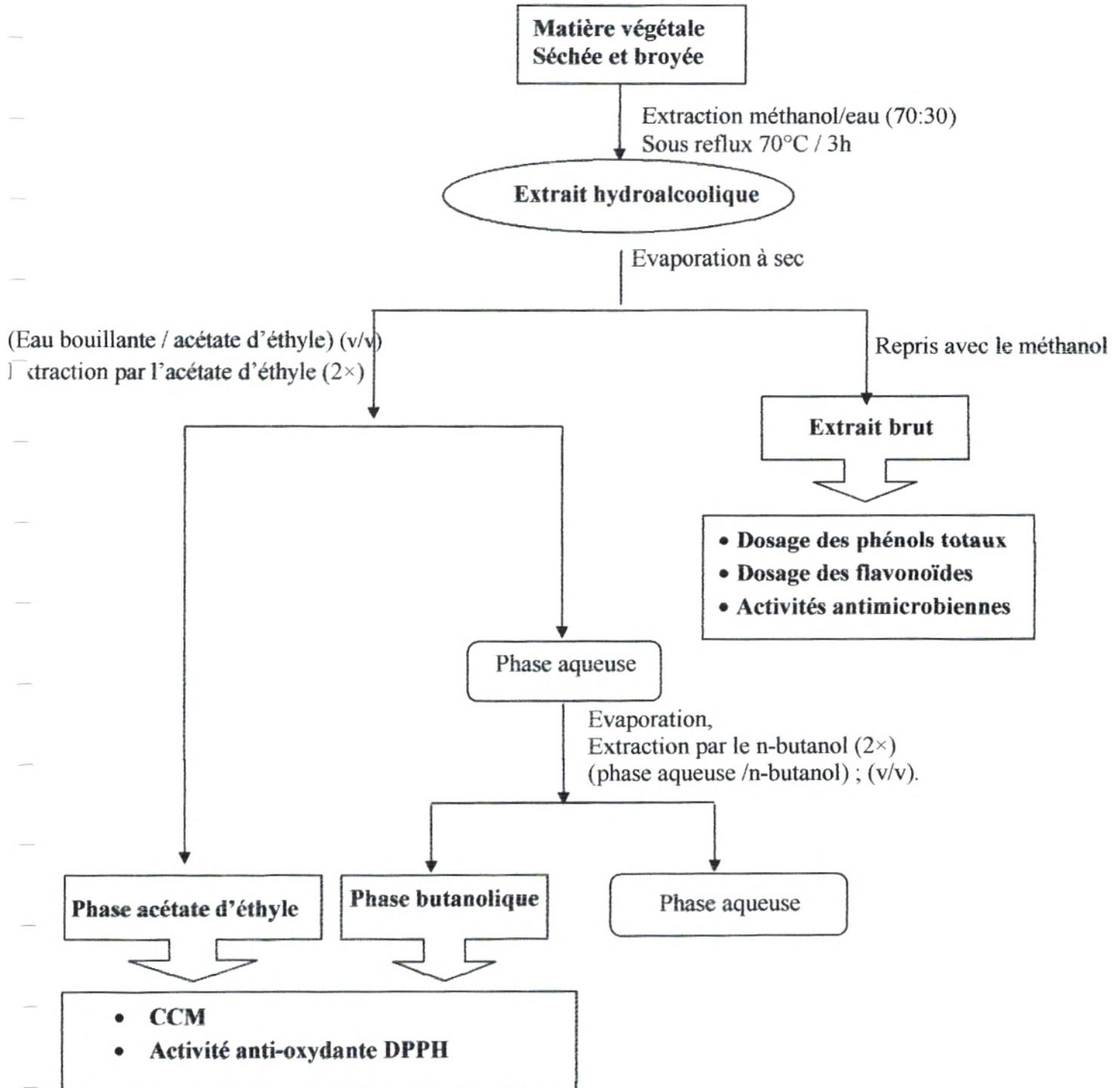


Figure 18 : Schéma d'extraction des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes.

IV.2.3. Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie pour leurs propriétés biologiques diverses et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant (Zhao et al, 2000). Pour cela, nous nous sommes intéressés au dosage des phénols totaux. Il est réalisé selon la méthode décrite par Vermerris et Nicholson, (2006).

0.1 mL de l'extrait brut de chaque plante étudiée est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée et le tout est agité par un vortex. Après 5 minutes, 100 µL du réactif Folin-Ciocalteu à 1 N sont ajoutés au mélange. Le tout est laissé pendant 30 minutes à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un essai blanc au spectrophotomètre à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Ce dernier appartient à la famille des acides phénols, il convient avec ce type de dosage puisqu'il réagit avec le réactif Folin-Ciocalteu pour produire une coloration bleue, qui est proportionnelle à la quantité de phénols totaux présente dans les plantes.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

IV.2.4. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes de nos extraits est réalisée par la méthode colorimétrique décrite par Ardestani et Yazdanparast ; (2007).

500µL de l'extrait brut de chaque plante étudiée sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée suivi de 150µL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 minutes, 150µL de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 10% sont ajoutés au mélange et le tout est laissé pendant 6 minutes. Deux millilitres d'hydroxyde de sodium à 4% sont ensuite ajoutés aux tubes et le volume final est complété immédiatement à 5mL.

Après 15 minutes, la lecture est faite à 510 nm contre un essai blanc.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche.

IV.2.5. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince sont employées dans le suivi des purifications et permettent de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés.

L'échantillon à étudier (2µL de chaque extrait ainsi que les étalons) est déposé à l'état liquide par apposition successive d'une micropipette et éventuellement séché.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal (Rf) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front de solvant).

Dans notre pratique, nous avons utilisé des plaques de gel de silice de 20x 20 cm, prêtes à l'emploi à support en aluminium. Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'utilisation de différents systèmes de solvants permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suites aux différentes chromatographies et d'avoir un nombre élevé de constituants.

Après plusieurs essais de systèmes de solvants suivant la littérature, nous avons opté pour trois systèmes selon **Males et Medic-Saric, (2001)**; **Heimeur et al., (2004)**; **Hennebelle, (2006)**:

- Acétate d'éthyle / acide formique / eau distillée ; (65 : 15 : 20) ; (V : V : V)
- Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100 : 11 : 11 : 27) ; (V : V : V : V)
- Chloroforme / méthanol / acide acétique / eau ; (100 : 15 : 0,3 : 0,5) ; (V : V : V : V)

Après développement et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 365 nm. Les couleurs des spots et leur Rf ont été enregistrés.

V. Pouvoir antioxydant : piégeage du radical libre DPPH

Les antioxydants peuvent être définis comme les substances qui, présentent à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Boyd et al., 2003). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances comprenant les terpènes et les flavonoïdes. On trouve parmi leurs nombreux intérêts potentiels la chélation de certains métaux et la captation de radicaux libres (Vansant, 2004).

L'intérêt porté à ces composés nous a conduit à étudier l'activité anti-oxydante *in vitro* de nos extraits par la méthode au DPPH.

V.1. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode décrite par Leong et Shui, (2002). Cette technique est basée sur la mesure de la capacité des extraits à piéger le radical DPPH. Ce dernier est un radical stabilisé qui absorbe dans l'UV-visible à une longueur d'onde donnée, il possède une coloration violette, lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune.

Le DPPH a été solubilisé dans le méthanol afin d'obtenir une solution de 0,1mM (0,0039 g/100mL). Les extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol.

Trois millilitres de la solution méthanolique du DPPH sont ajoutés à 40µL de différentes concentrations de chaque extrait fraîchement préparés.

Après 30 min à température ambiante et en obscurité, l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre à 515 nm. La diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde traduit l'efficacité des extraits à réduire le radical DPPH.

Deux répétitions ont été effectuées pour chaque concentration.

Pour chaque dilution, un essai blanc est préparé à partir de 3mL de méthanol additionnés à 40µL d'extrait.

Un contrôle négatif est représenté par la solution méthanolique du DPPH (3mL) contenant 40µL méthanol.

V.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

La méthode appliquée est celle de **Tappel et Mellors, (1996)**. Elle consiste à dissoudre 2 mg de DPPH dans 50mL d'éthanol. Deux millilitres de cette solution sont additionnés à 100µL de la solution méthanolique contenant de l'huile essentielle à différentes concentrations.

Après 30min à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre à 517nm.

Deux répétitions ont été effectuées pour chaque concentration.

Pour chaque dilution, un blanc est préparé à partir de 2mL de méthanol additionnée à 100µL d'extrait.

Un contrôle négatif est composé de 2 mL du DPPH et de 100µL méthanol.

L'antioxydant de référence (acide ascorbique) a été préparé par la même méthode.

➤ **Pourcentages d'inhibition**

Les pourcentages d'inhibition sont calculés en utilisant la formule suivante :

$$SC(\%) = [A_0 - A / A] \times 100$$

A_0 : Absorbance du contrôle ;

A : Absorbance de l'échantillon ;

SC : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de deux mesures plus ou moins les écarts types.

La valeur IC_{50} , c'est-à-dire la concentration en produit nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, a été déterminée pour chaque extrait (extraits flavonoïques, huile essentielle), ainsi le pouvoir anti-radicalaire (ARP) qui est l'inverse de La valeur IC_{50} ($1/ IC_{50}$) (**Brand-Williams et al., 1995**).

Les valeurs IC moyennes ont été calculées par la régression linéaire des droites tracés des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés (**Mensor et al., 2001**)

VI. Pouvoir antimicrobien

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. Elles agissent quasiment dans tous les domaines de la santé et de la maladie. Elles ont la capacité à s'opposer au développement des microbes (bactéries, champignons) en les détruisant.

L'objectif de cette étude est de déterminer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts des feuilles et des fruits de *Schinus molle*, les extraits bruts des feuilles de *Pistacia vera* et de les comparer avec l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques.

VI.1. Provenance des germes étudiés

Les souches microbiennes utilisées font partie de deux groupes de microorganismes (**Tableau 1**), se sont des contaminants fréquents, provoquant ainsi des infections importantes.

Après vérification de la pureté, les souches ont été conservées dans des tubes contenant le milieu de culture (GN pour les bactéries et PDA acidifié pour les moisissures).

Tableau 1 : Provenance des germes étudiés.

Souches utilisées	Origine
<p>a- Les bactéries :</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778</p>	Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Tlemcen.
<p>b- les moisissures :</p> <p><i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium spp</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i></p>	Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Tlemcen.

VI.2. Antibiotiques et antifongique utilisés

La sensibilité des souches a été testée vis-à-vis de quelques antibiotiques et d'un seul antifongique, cités dans les tableaux (2 et 3).

Tableau 2 : Antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Sigle	Famille	Charge du disque µg/disque
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	β-lactamines	30
Tétracycline	Te	Tétracyclines	30
Triméthoprine + sulfamide	Sxt	Sulfamides	25
Céfalexine	Cl	Céphalosporines	30

La sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque.

Les recommandations du comité de standardisation de l'OMS ont été respectées, en tenant compte des valeurs définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie (Vandepitte *et al.*, 2003).

Tableau 3 : Antifongique utilisé.

Antifongique	Sigle	Famille	Concentration (µg/mL)
Amphotéricine B	AB	Macrolide polyénique	200

Nous avons utilisé la même méthode que celle établie pour l'évaluation de l'activité antifongique des extraits.

VI.3. Pouvoir antimicrobien des extraits

VI.3.1. Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien des extraits

VI.3.1.1. Méthode de diffusion sur disque : Aromatogramme (Lesueur et al., 2007)

Un millilitre de suspension bactérienne est étalé sur gélose MH précédemment coulée dans des boîtes de pétri stériles pendant 5 à 10 minutes, puis l'excédant est éliminé par aspiration. Ensuite, les boîtes ont été séchées.

A la surface de chaque boîte, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont déposés imbibés de 15 μ L d'huiles essentielles en présence de DMSO à 10%(v/v), et d'autres imbibés d'extraits bruts (repris dans du méthanol).

Un témoin négatif (15 μ L) est réalisé avec du DMSO pour les huiles essentielles et un autre avec du méthanol pour les extraits bruts.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, la sensibilité a été appréciée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Nous avons utilisé la même méthode pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque extrait.

VI.3.1.2. Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Nous avons déterminé l'activité antibactérienne des extraits par une méthode rapide celle de diffusion sur disque et dans l'affirmation, nous avons déterminé la CMI.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**).

L'huile essentielle est disposée dans chaque boîte afin d'effectuer une gamme de dilution de 0,2% à 1%, avec pour chacune, son équivalent en DMSO. Puis, 20 mL de gélose MH stériles sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé à la main.

10 μ L de la suspension bactérienne préalablement standardisée sont déposées et étalées sur chaque boîte.

Après incubation de 24 h à 37°C, nous avons évalué la présence ou l'absence de croissance bactérienne.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque extrait.

VI.3.2. Méthode d'étude du pouvoir antifongique des extraits

L'essai antifongique contre les moisissures a été estimé par la méthode de contact direct (Fandohan et al., 2004).

Des concentrations de l'ordre de 50µL à 150µL à intervalle de 50 µL d'extraits (huiles essentielles et extrait brut) ont été ajoutées à 20ml du milieu PDA en surfusion. Après solidification, un disque mycélien de diamètre 6 mm, pris de la culture de mycète âgée de 5 jours, a été inoculé à chaque boîte de pétri.

Le milieu de culture sans extrait a servi de témoin. Les boîtes ont été incubées à 25°C pendant 48 h pour *Rhizopus stolonifer* et 5 jours pour les autres souches. Des mesures de diamètre des colonies ont été faites après la fin de l'incubation.

Un témoin négatif est réalisé sans extrait.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration.

L'action microbienne a été déterminée par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaite et Pečiulyté, 2004) :

$$T = (D_k - D_0) / D_k \times 100$$

D_k : Diamètre de la colonie mycélienne du témoin (en cm) ;

D_0 : Diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (en cm) ;

T : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

Nous avons utilisé la même méthode pour l'évaluation de l'activité antifongique de l'Amphotéricine B.

VI.4. Préparation des inoculums

VI.4.1. Bactéries

Les souches ont été revivifiées dans du bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis, des gouttelettes de la suspension bactérienne sont ensemencées en strie dans des boîtes de pétri préalablement coulées de gélose nutritive d'une manière aseptique.

Après incubation des boîtes, deux à trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10 ml de bouillon nutritif.

Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être ajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 625nm soit environ 10^8 UFC/mL. Nous avons effectué des dilutions au 1/10 pour *Staphylococcus aureus* et au 1/100 pour les autres souches (Joffin et Leyral, 2001).

VI.4.2. Moisissures

Les souches conservées dans de PDA acidifié inclinée à 4°C, sont ensemencées sur le milieu PDA coulé en boîtes de pétri. Ensuite, les boîtes sont incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 48 h pour *Rhizopus stolonifer* et 5 jours pour les autres souches.

VI.5. Milieux de culture utilisés

- Pour les bactéries, nous avons utilisé deux milieux de culture.

Pour la revivification des souches, nous avons utilisé gélose nutritive, qui est un milieu usuel, ordinaire, pouvant servir à la culture des bactéries n'ayant pas d'exigences particulières

Pour déterminer le pouvoir antimicrobien, nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton, milieu riche en éléments nutritifs, habituellement utilisé pour vérifier la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

- Pour les moisissures, le milieu choisi pour l'antifongigramme est Potato Dextrose Agar (PDA). C'est un milieu de base utilisé pour la culture des moisissures.

Troisième partie

Résultats et discussion

I. Tests phytochimiques

I.1. Introduction

L'évaluation de l'activité biologique d'une plante est complexe et requiert de nombreux outils d'analyse. Dans le cas de cette étude, les tests phytochimiques ont non seulement permis la sélection d'espèces végétales biologiquement actives, mais aussi d'orienter la purification et l'isolement des molécules thérapeutiques.

I.2. Résultats des tests

Les tests phytochimiques (réalisés sur les feuilles, les fruits de *Schinus molle* et les feuilles de *Pistacia vera*) ont permis de détecter les différentes familles de composés par des réactions qualitatives de caractérisation (**Tableau 4**).

Cette dernière présente quatre possibilités :

(+) : est enregistré si le réactif présente une légère opacité (présence en faible quantité).

(++) : est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation (présence en quantité moyenne).

(+++): est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd (présence en forte quantité).

(-) : absence de turbidité et de floculation.

L'analyse a révélé que l'amidon, les émodols, les composés réducteurs, les anthracénosides, les anthocyanosides et les coumarines sont des classes de familles chimiques totalement absentes dans les parties des plantes étudiées. D'autres classes y sont présentes en faibles quantités, à savoir les alcaloïdes, les stérols et stéroïdes ainsi que les hétérosides. Les saponosides sont une classe de familles présente en faible quantité dans *Pistacia vera* mais absente dans l'autre espèce.

Les huiles volatiles, les flavonoïdes et les tanins présents en quantité moyenne, ont été caractérisés dans les deux espèces.

Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'extraction sélective des huiles essentielles, et des flavonoïdes.

Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques.

Espèce étudiée	<i>Schinus molle</i>		<i>Pistacia vera</i>
Partie étudiée	Feuilles	Fruits	Feuilles
Familles chimiques			
Huiles volatiles	++	++	+
Flavonoïdes	++	++	++
Tanins	++	++	++
Alcaloïdes	+	+	+
Saponosides	-	-	+
Amidon	-	-	-
Emodols	-	-	-
Stérols et stéroïdes	+	+	+
Hétérosides	+	+	+
Composés réducteurs	-	-	-
Anthracénosides	-	-	-
Anthocyanosides	-	-	-
Coumarines	-	-	+

Bien que les deux plantes semblent peu riches en familles chimiques, ces tests ont néanmoins permis de caractériser la présence ou l'absence de celles-ci.

II. Les huiles essentielles

II.1. Rendement en huile essentielle

L'huile essentielle des deux plantes *Schinus molle* (feuilles et fruits) et *Pistacia vera* (feuilles) est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau.

Le poids d'huile essentielle nous a permis de calculer le rendement pour chaque partie utilisée.

Les résultats de calcul des rendements obtenus à partir de la plante sèche pendant la période hivernale pour *Schinus molle* et le mois de Juin pour *Pistacia vera* sont reportés dans l'histogramme (figure 19).

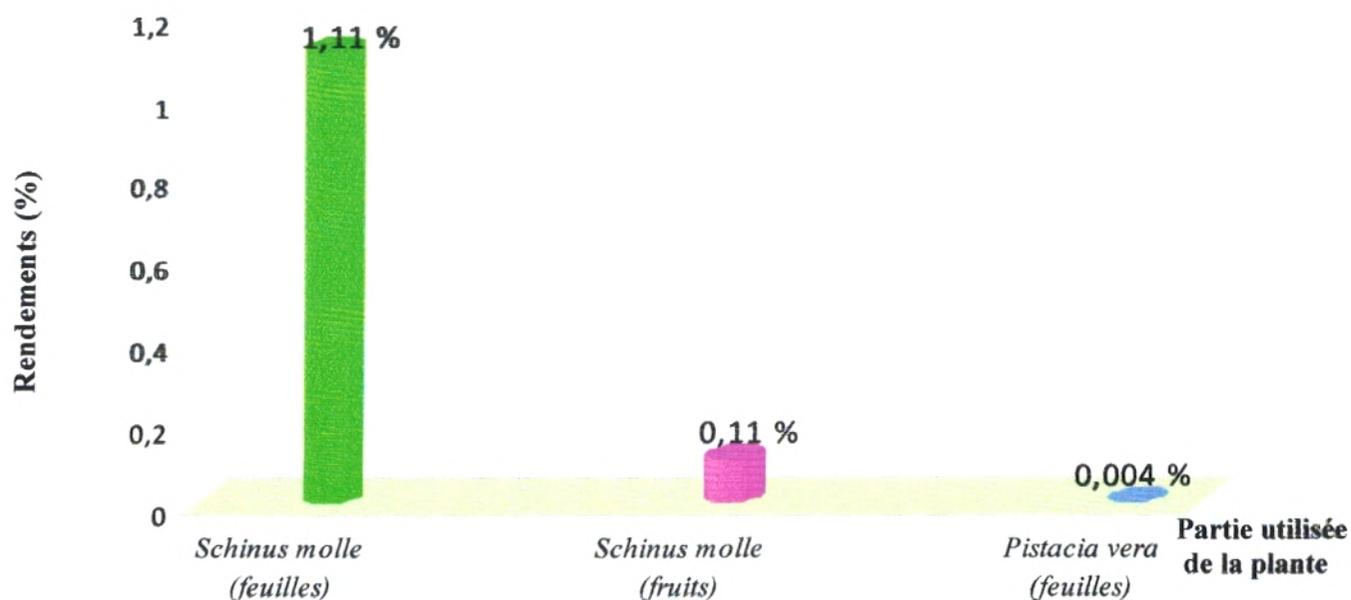


Figure 19 : Rendement en huile essentielle de *Schinus molle* et *Pistacia vera* obtenus par entraînement à la vapeur d'eau.

Il faut noter que la teneur en huile essentielle des feuilles (1,11%) est dix fois plus élevée que celle des fruits (0,11%). Ceci peut être expliqué par la régulation physiologique, biochimique, métabolique, et génétique (Costa et al., 2003).

Nous remarquons que le rendement en huile essentielle de *Pistacia vera* est très faible de l'ordre de 0,004%.

La comparaison de nos résultats à certains travaux antérieurs (**Tableau 5**) révèle que les rendements en huiles essentielles de nos échantillons sont différents de ceux de la littérature.

Il est alors possible de penser que les conditions environnementales, climatiques, géographiques, la période de récolte et la technique de distillation influent sur le rendement (**Lahlou, 2004**). Nous avons envisagé que notre technique d'extraction apparaisse comme technique performante notamment pour *Schinus molle*.

Tableau 5 : Comparaison des rendements en huiles essentielles de *Schinus molle* et *Pistacia vera* avec des travaux antérieurs.

Plantes	Rendement %	Technique de distillation	Références bibliographiques
<i>Schinus molle</i> (feuilles)	0,7	Hydrodistillation	Marongiu <i>et al.</i> (2004)
<i>Schinus molle</i> (fruits)	0,75	Hydrodistillation	Hayouni <i>et al.</i> (2008)
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	0,15	Hydrodistillation	Duru <i>et al.</i> (2003)
<i>Schinus molle</i> (feuilles)	1,11	Entrainement à la vapeur d'eau	Nos travaux (2009)
<i>Schinus molle</i> (fruits)	0,11	Entrainement à la vapeur d'eau	Nos travaux (2009)
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	0,004	Entrainement à la vapeur d'eau	Nos travaux (2009)

II.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus molle*

La composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus molle* varie quantitativement en fonction de la partie de la plante étudiée à savoir feuilles et fruits (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus molle*.

composés identifiés	indice sur HP-1	Huile essentielle(%)	
		feuille%	fruits%
Alpha pinène	932	3,88	3,13
Camphène	947	-	0,25
Sabinène	971	0,49	-
Béta pinène	976	0,16	0,19
Myrcène	990	7,06	13,61
Alpha phellandrène	1010	32,24	20,19
Alpha terpinène	1016	0,27	0,29
Para cymène	1025	2,36	12,20
Limonène	1030	-	14,21
Béta phellandrène	1031	23,00	7,03
Gamma terpinène	1057	0,13	-
Terpinolène	1084	0,25	0,20
Bornéol	1172	-	0,36
Terpinèn-4-ol	1180	0,11	-
Alpha terpinéol	1195	-	0,53
Thymol	1290	0,09	1,89
Carvacrol	1298	0,08	1,11
Acétate de citronellyle	1347	0,11	-
Alpha copaène	1372	0,13	-
Béta élemène	1386	0,84	0,46
Alpha gurgunène	1403	0,42	0,20
Béta caryophyllène	1416	0,49	0,28
Gamma élemène	1426	0,31	0,24
Aromadendrène	1446	0,16	-
Alpha cubebène	1452	0,34	-
Alpha humulène	1457	0,10	0,18
Allo-aromadendrène	1469	0,23	-
Inconnu 1	1472	0,33	-

D-germacrène	1478	0,62	0,25
Béta cubebène	1486	0,30	-
Inconnu 2	1489	0,39	-
Inconnu 3	1493	2,05	0,36
Alphamuuroène	1496	0,73	0,32
Inconnu 4	1504	0,14	-
Gamma cadinène	1510	-	0,34
Delta cadinène	1516	2,77	1,31
Inconnu 5	1530	0,14	-
Elémol	1549	7,86	6,43
Delta élemène	1557	1,30	0,94
Inconnu 6	1574	0,47	-
Inconnu 7	1592	0,23	0,26
Epi gamma eudesmol	1631	2,07	2,19
Inconnu 8	1640	0,44	0,65
citronnelle	1643	0,36	0,29
Inconnu 9	1655	5,40	8,33
Inconnu 10	1692	1,15	1,80

Cette étude a permis d'identifier 27 composés représentant 88,60% de la composition chimique de l'huile essentielle des fruits et 31 composés identifiés pour les feuilles (89,93%).

Les chromatogrammes des huiles essentielles des différentes parties de la plante de *Schinus molle* (figures 20 et 21) sont caractérisés par la présence de quatre composés majoritaires dans les fruits et deux composés dans les feuilles. Ils représentent à eux seuls 60,20% de l'extrait des fruits et 55,24% de celui des feuilles.

Concernant les fruits, le composé majoritaire est l'alpha-phellandrène (20,19%) suivi du limonène (14,21%), du myrcène (13,61%) et du para-cymène (12,20%). Cette huile renferme également des quantités appréciables en d'autres composés tels que : le bêta-phellandrène (6,96%), l'élémol (6,36%) et l'alpha pinène (3,08%).

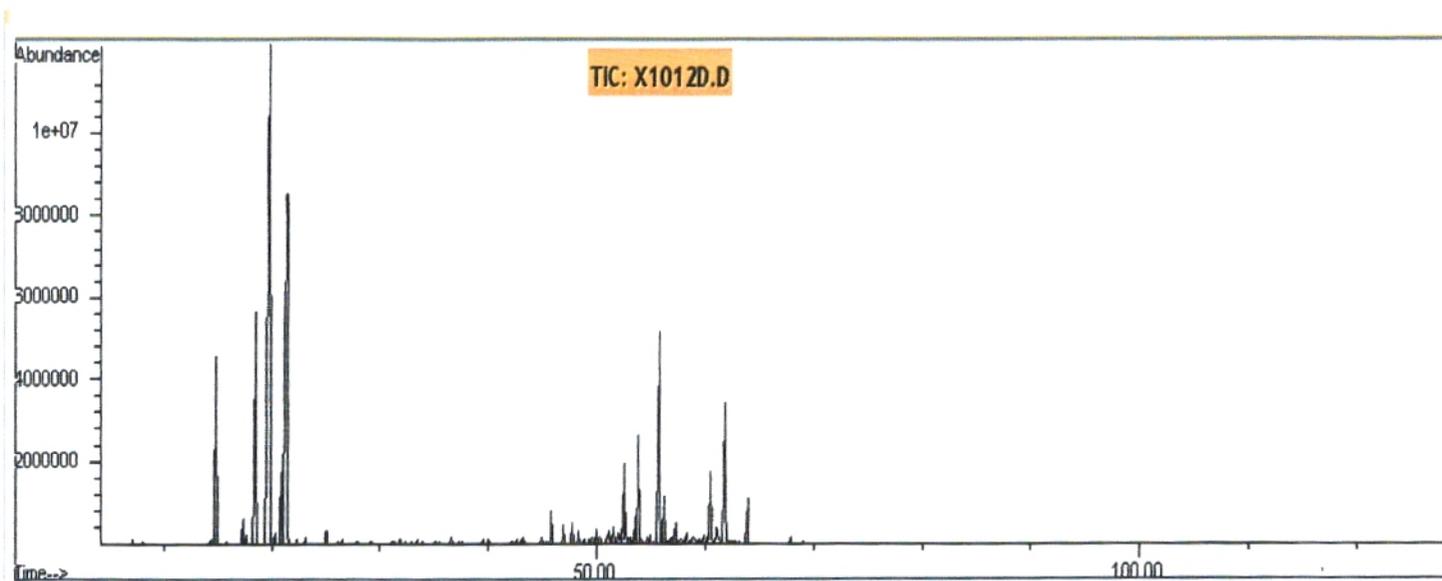


Figure 20 : Chromatogramme CPG/SM des feuilles de *Schinus molle*.

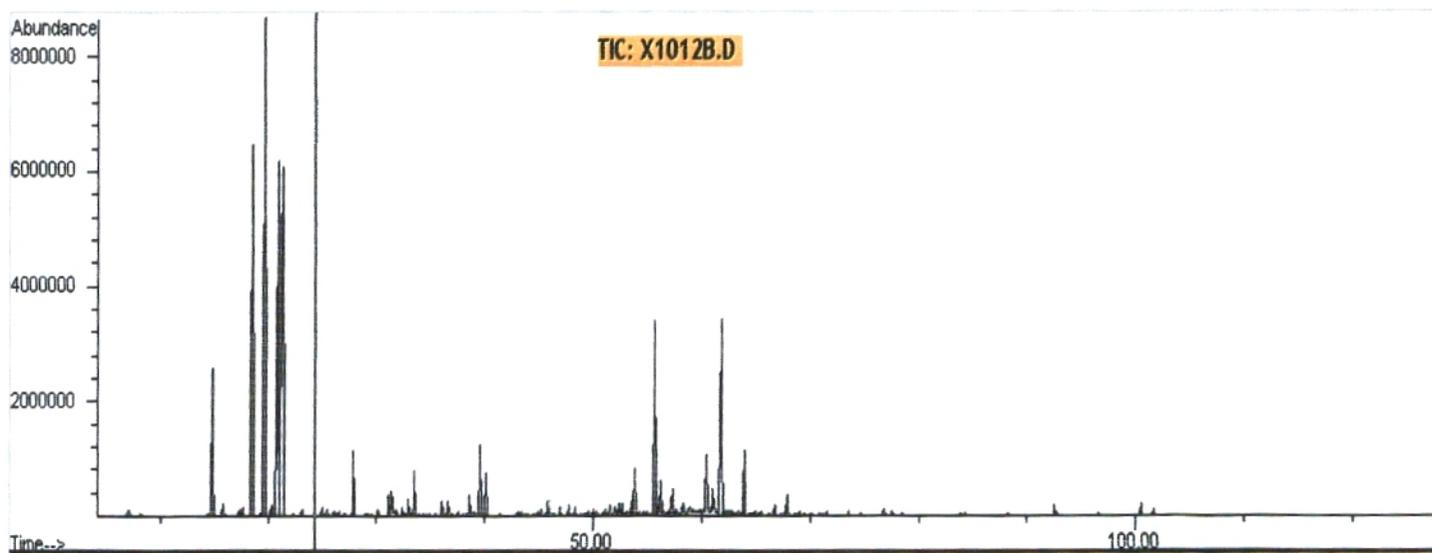


Figure 21 : Chromatogramme CPG/SM des fruits de *Schinus molle*.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent 71,29% de la composition totale de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle*, les monoterpènes oxygénés (3,90%), les sesquiterpènes hydrocarbonés (3,57%), les sesquiterpènes oxygénés (9,85%). Les composés non identifiés représentent à eux seuls 11,40% (figure 22).

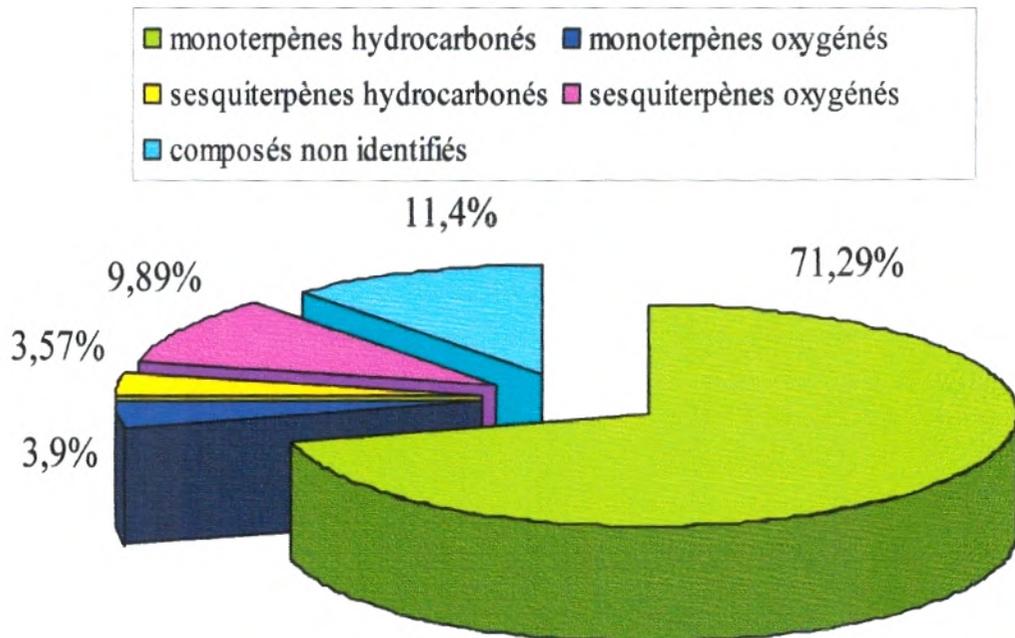


Figure 22 : Composés volatils présents dans les fruits de *Schinus molle*.

Au niveau des feuilles, les deux constituants les plus abondants sont l'alpha et le bêta-phellandrène (32,24% et 23% respectivement). D'autres composés existent en quantités moindres qui sont : le myrcène (7,02%) et l'alpha pinène (3,86%). Cette huile est caractérisée par un pourcentage élevé en monoterpènes hydrocarbonés (69,84%) alors que les monoterpènes oxygénés représentent 0,39% de la composition totale, quand aux sesquiterpènes oxygénés présents à 11,59% sont plus important que les hydrocarbonés (7,45%). Cependant, les composés non identifiés représentent 10,73% de la composition totale de l'huile essentielle des feuilles de *Schinus molle* (figure 23).

Il faut noter que la proportion des monoterpènes hydrocarbonés est plus importante dans les deux parties de la plante (feuilles et fruits) car elle contient les composés majoritaires.

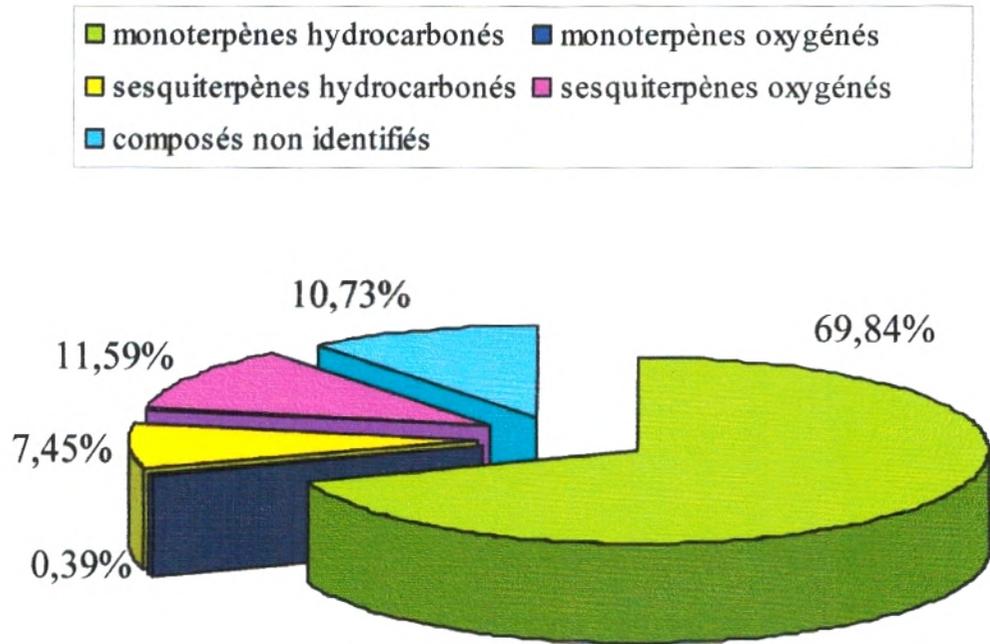


Figure 23 : Composés volatils présents dans les feuilles de *Schinus molle*.

Nous remarquons que la composition chimique des deux échantillons (feuilles et fruits) présente une légère différence non seulement par la teneur en composés majoritaires (figure 24) mais aussi en d'autres composés minoritaires, nous soulignons également la présence ou l'absence de certains composés.

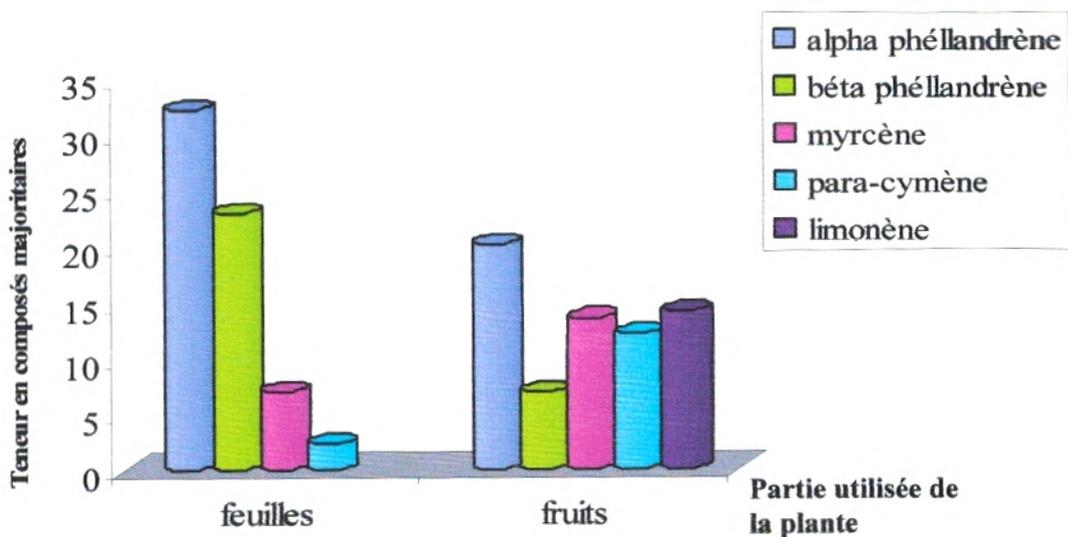


Figure 24 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des feuilles et des fruits de *Schinus molle*.

Les résultats obtenus par l'analyse de l'huile essentielle des feuilles sont comparables à ceux obtenus par **Marongiu et al.,(2004)**, aussi la composition chimique de l'essence des fruits de notre échantillon est semblable à celle du Pérou (**Huaman et al., 2004**) (**Tableau 7**). Ces essences présentent les mêmes composés majoritaires que de nos échantillons mais à des proportions différentes.

Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle de *Schinus molle* de l'Égypte est semblable à celle de nos échantillons. Elle est riche en alpha-phellandrène dans les feuilles et les fruits à des proportions de 39,72 %, 23,4 % respectivement (**Ibrahim et al., 2004**). Celles provenant de la Turquie sont riches en alpha-phellandrène (38,1% ; 22,1%) comme nos échantillons mais à des proportions différentes et en d'autres composés qui sont présents en proportion notable : bêta-phellandrène (11,8%; 10,4%), limonène (11,6%; 9,6%) et alpha-cadinol (7,2%; 5,6%) (**Baser et al., 1997**) (**Tableau 7**).

Rossini et al. (1996) ont analysés l'huile essentielle des feuilles de *Schinus molle* provenant de l'Uruguay, cette analyse a révélé que cette plante est caractérisé par l'abondance de bicyclogermacrène (29,20%) comme composé majoritaire, constituant non identifié comme prépondérant dans les huiles des autres pays (**Tableau 7**).

En outre, l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle*, poussant en Tunisie, est caractérisée par une prédominance des composés suivants : l'alpha phellandrène (35,86%), le bêta phellandrène (29,3%) et le bêta pinène (15,68%), ceux sont proches de nos échantillons (**Hayouni et al. 2008**).

Cette différence peut être liée à l'origine botanique de l'espèce, aux conditions environnementales et au stade de maturité.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia vera* n'a pas pu être déterminée en raison du très faible rendement.

Tableau 7 : Comparaison de teneurs en composés majoritaires de nos échantillons avec celles de la littérature.

Plante étudiée	Constituants majoritaires en (%)	La région	Références bibliographiques
• <i>Schinus molle</i> feuilles	Bicyclogermacrène (29,20)	Uruguay	Rossini et al. (1996)
• <i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (38,1)	Turquie	Baser et al. (1997)
• <i>Schinus molle</i> fruits	α -phellandrène (22,1)		
• <i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (26 ,1) β -phellandrène (21)	Sardaigne	Marongiu et al. (2004)
• <i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (39,72)	Egypte	Ibrahim et al. (2004)
• <i>Schinus molle</i> fruits	α -phellandrène (23,4)		
• <i>Schinus molle</i> fruits	Myrcène (42) α -phellandrène (25) limonène (19) β -phellandrène (9,7)	Pérou	Huaman et al. (2004)
• <i>Schinus molle</i> fruits	α -phellandrène (35,86) β -phellandrène (29,3) β -pinène (15,68)	Tunisie	Hayouni et al. (2008)
• <i>Schinus molle</i> feuilles	α -phellandrène (32,24) β -phellandrène (23)	Remchi (Tlemcen)	Nos travaux (2009)
• <i>Schinus molle</i> fruits	α -phellandrène (19,99) limonène (14,07) myrcène (13,39) para-cymène(12,08).		

III. Les composés phénoliques

III.1. Rendements des extraits bruts obtenus

Nous rappelons que les rendements des extraits bruts secs exprimés en pourcentages sont calculés par le rapport de la différence des masses du ballon avant et après évaporation de l'extrait méthanolique sur la quantité de la plante.

Les résultats des rendements obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-dessous (figure 25).



Figure 25 : Rendements des extraits bruts exprimés en pourcentage.

Nous remarquons que les teneurs en extraits secs varient d'une espèce à l'autre voire d'une partie à l'autre de la même plante.

Nous constatons que le rendement de *Schinus molle* en extrait sec brut dans les fruits (26%) est plus important que celui dans les feuilles (15,50%).

Nous signalons également que les feuilles de *Pistacia vera* présentent un taux élevé en extrait sec (29,50%) par rapport à ceux des feuilles de *Schinus molle* (15,50%).

III.2. Teneurs en phénols totaux

Afin de déterminer la teneur totale des phénols totaux de nos deux plantes, nous avons réalisé le dosage de ceux-ci sur les feuilles de *Pistacia vera*, les feuilles et fruits

de *Schinus molle*. Une courbe d'étalonnage (figure 26) de l'acide gallique a été tracée pour cet objectif.

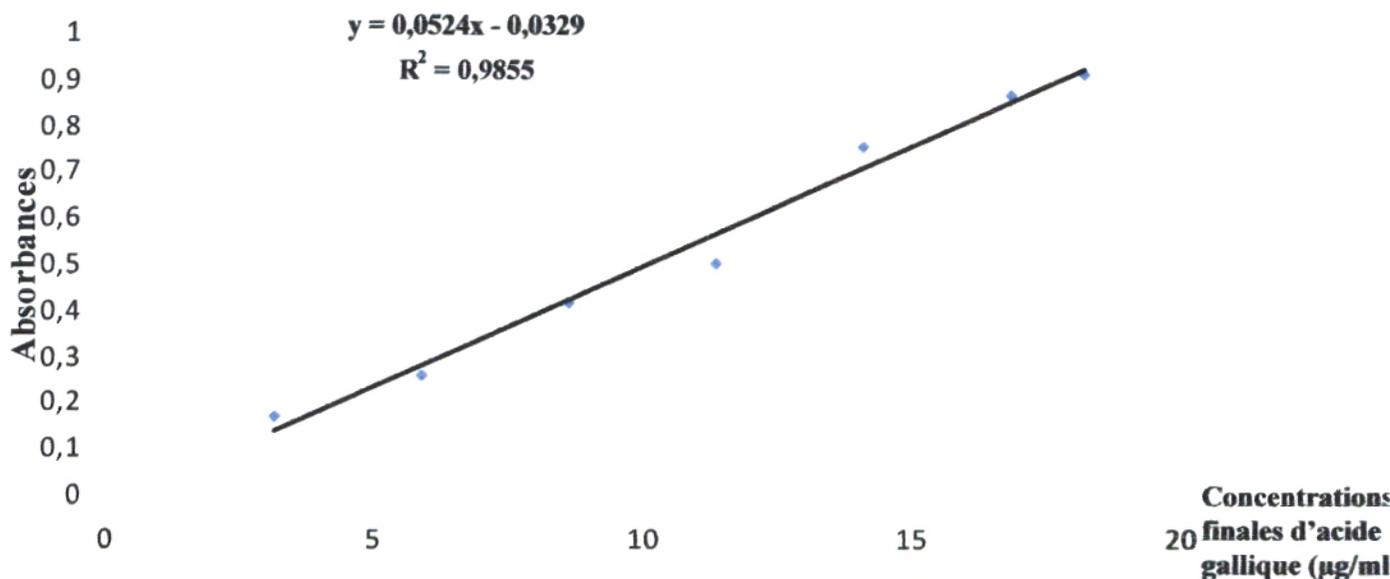


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux (concentrations finales exprimées en µg/mL).

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-après (figure 27) :

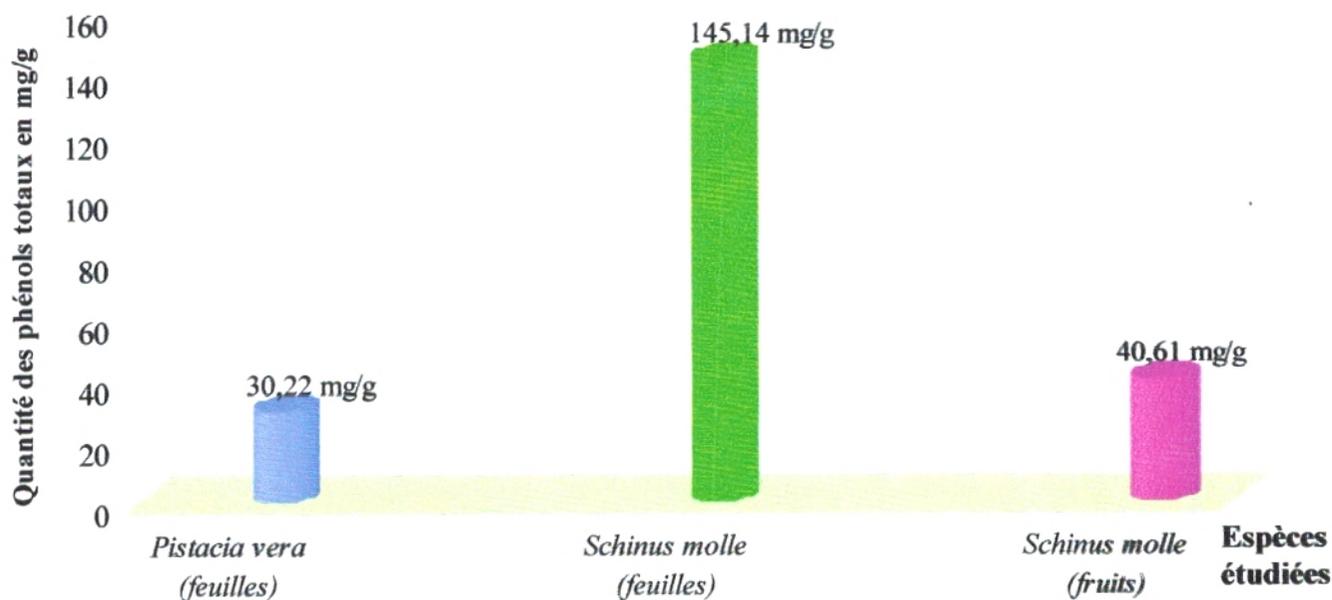


Figure 27 : Teneurs en phénols totaux exprimées en mg équivalent acide gallique/g de la plante sèche.

Le règne végétal fournit un apport considérable de phénols totaux. Le taux de composés phénoliques dans les feuilles de *Schinus molle* (145,14mg/g) est plus important que dans les fruits (40,61mg/g). En comparaison, le premier aurait environ 20% plus de phénols totaux que le second.

La teneur de ces composés phénoliques dans les feuilles de *Pistacia vera* est nettement plus faible comparée à celle des feuilles de *Schinus molle*. Cependant, la teneur correspondante aux fruits de *Schinus molle* (40,61mg/g) est relativement proche à celle de *Pistacia vera* (30,22mg/g).

III.3. Teneurs en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a pour objectif la détermination de la quantité des flavonoïdes existant dans nos plantes. Ce dosage sera traduit par rapport à celle de la catéchine (flavonoïde de référence). Pour cela une courbe d'étalonnage a été tracée dans ce sens (**figure 28**).

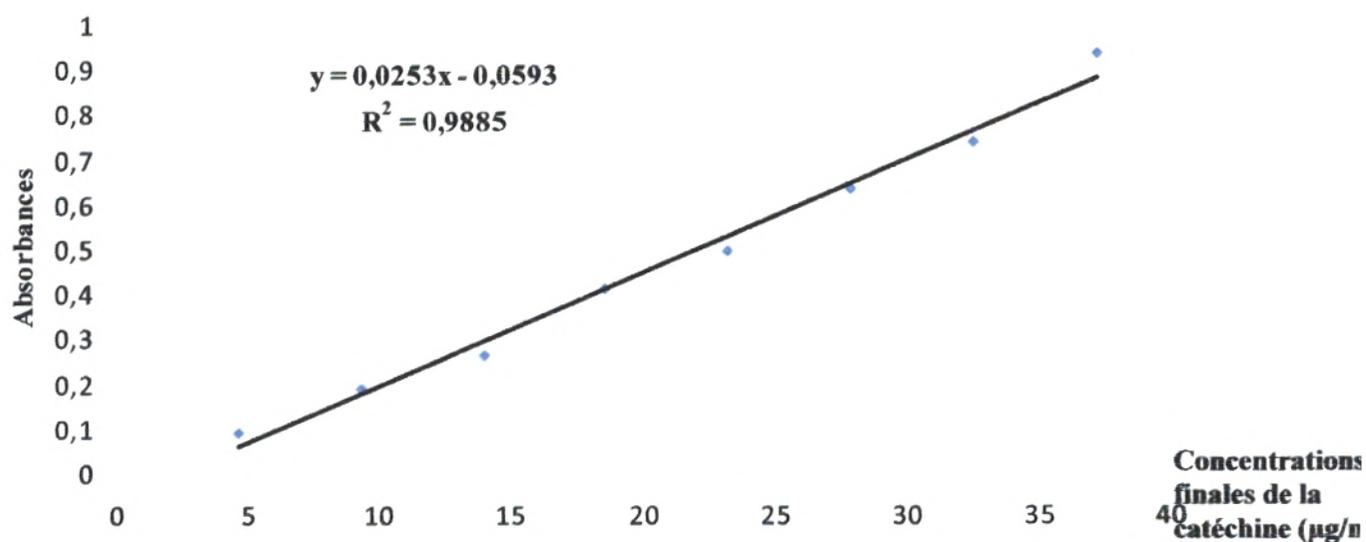


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes (concentrations finales exprimées en µg/ml).

Les résultats obtenus sont rapportés dans l'histogramme ci-après (**figure 29**).

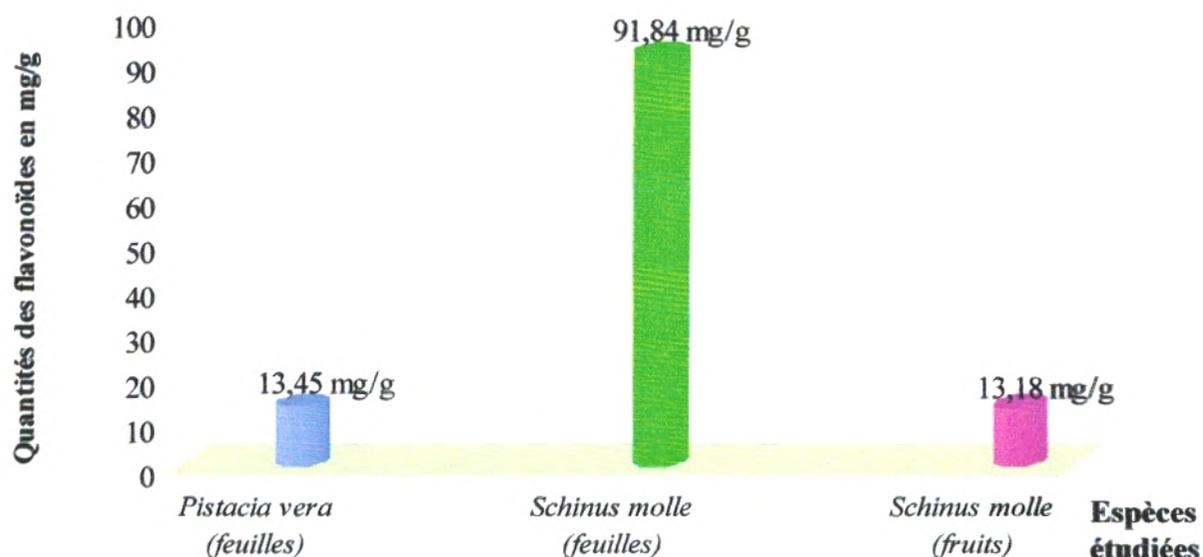


Figure 29 : Teneurs en flavonoïdes exprimées en mg équivalent catéchine/g de la plante sèche.

En comparaison aux fruits de *Schinus molle*, les feuilles de cette dernière ont environ 80% plus de flavonoïdes.

Les deux espèces *Schinus molle* et *Pistacia vera* se différencient nettement par leur teneur en flavonoïdes. Au niveau des feuilles de la première, les flavonoïdes représentent environ 91,84mg/g de matière sèche et 13,45mg/g de matière sèche au niveau de la deuxième espèce.

Néanmoins, les teneurs en flavonoïdes des fruits de *Schinus molle* (13,18mg/g) et de *Pistacia vera* (13,45mg/g) sont proches.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que les fruits de *Schinus molle* ont environ les mêmes teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes que les feuilles de *Pistacia vera*.

III.4. Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM

La chromatographie sur couche mince est la première analyse effectuée pour la séparation et l'identification des constituants des flavonoïdes.

Après la migration de l'éluant à la ligne de front, la plaque est retirée et séchée. Les composés séparés sont détectés à l'aide d'une lampe UV afin d'avoir une identification précise du nombre de constituants présents.

Les systèmes de solvants utilisés nous ont permis de séparer plusieurs composés dans les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques de nos échantillons et par ailleurs nous avons soumis nos témoins au système de solvants 3 (Tableaux 8, 9, 10, 11).

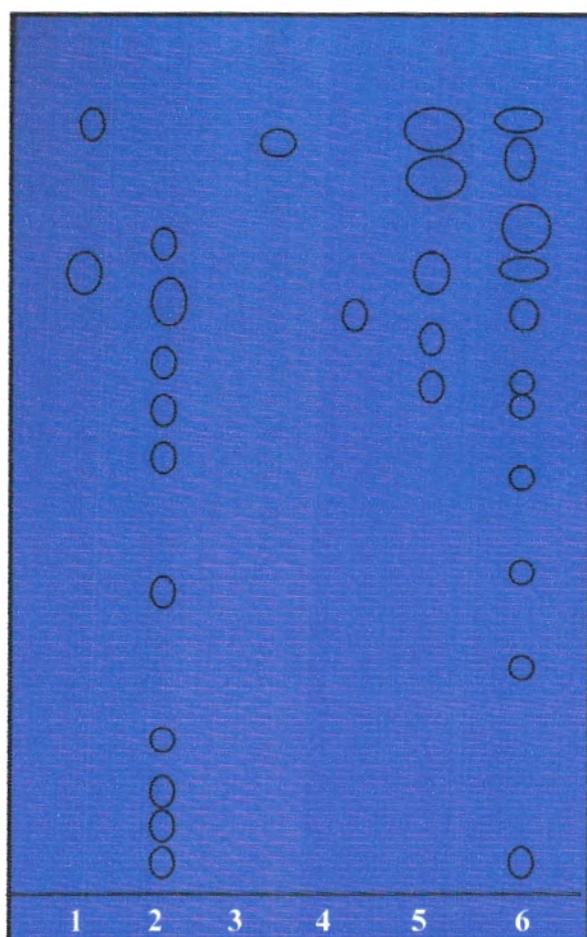
Les résultats de la mesure des Rf des différents extraits flavonoïques ainsi que les couleurs des constituants sont reportés sur les tableaux

Tableau 8 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles et des fruits de *Schinus molle* et les feuilles de *Pistacia vera*.

Système de solvants 1 : Acétate d'éthyle/Acide formique/Eau : 65/15/20.

Adsorbant : gel de silice.

	Extrait acétate d'éthyle	Rf	Couleur des spots	Extrait n-butanol	Rf	Couleur des spots
<i>Schinus molle</i> (feuilles)	1	0,72	Violet	1	0,17	Violet clair
	2	0,87	Violet	2	0,22	Violet clair
				3	0,27	Violet clair
				4	0,31	Violet clair
				5	0,44	Violet clair
				6	0,56	Bleu violet
				7	0,60	Bleu violet
				8	0,65	Bleu violet
				9	0,70	Violet
				10	0,76	Violet
<i>Schinus molle</i> (fruits)	1	0,85	Violet	1	0,69	Violet
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	1	0,64	Violet	1	0,18	Jaune
	2	0,68	Violet	2	0,35	Violet
	3	0,73	Violet	3	0,45	Violet
	4	0,83	Violet	4	0,55	Violet
	5	0,86	Bleu violet	5	0,64	Violet
				6	0,68	Violet
				7	0,73	Violet
				8	0,78	Violet
				9	0,82	Violet
				10	0,85	Violet
				11	0,88	Bleu violet



1. Phase acétate de *Schinus molle* feuilles.
2. Phase n-butanol de *Schinus molle* feuilles.
3. Phase acétate de *Schinus molle* fruits.
4. Phase n-butanol de *Schinus molle* fruits.
5. Phase acétate de *Pistacia vera* feuilles.
6. Phase n-butanol de *Pistacia vera* feuilles.

Figure 30 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 1).

Ce système de solvants nous a permis de séparer plusieurs composés :

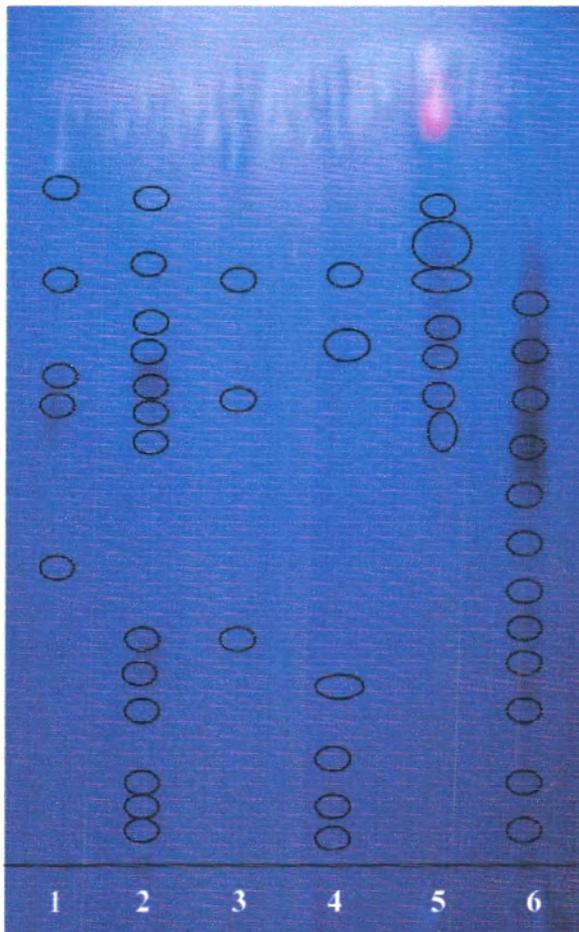
- Pour les feuilles de *Schinus molle*, deux composés ont été séparés dans l'extrait d'acétate d'éthyle, tandis que l'extrait butanolique nous révèle dix composés.
- Pour les fruits de *Schinus molle*, le nombre de taches révélé dans l'extrait d'acétate d'éthyle est de l'ordre de un et il est égal à celui de l'extrait butanolique.
- Pour *Pistacia vera*, l'extrait méthanolique présente cinq composés dans l'extrait d'acétate d'éthyle et onze dans l'extrait butanolique.

Tableau 9 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles et des fruits de *Schinus molle* et les feuilles de *Pistacia vera*.

Système de solvants 2: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau :100/11/11/27.

Adsorbant : gel de silice.

	Extrait acétate d'éthyle	Rf	Couleur des spots	Extrait n-butanol	Rf	Couleur des spots
<i>Schinus molle</i> (feuilles)	1	0,34	Violet	1	0,03	Blanc
	2	0,53	Marron	2	0,08	Violet clair
	3	0,57	Marron	3	0,14	Violet clair
	4	0,68	Violet	4	0,23	Violet foncé
	5	0,85	blanc	5	0,27	Violet foncé
				6	0,33	Violet
				7	0,42	Violet
				8	0,47	Violet
				9	0,50	Violet
				10	0,55	Violet foncé
				11	0,58	Marron
				12	0,67	Violet
				13	0,81	violet
<i>Schinus molle</i> (fruits)	1	0,31	Violet	1	0,03	Blanc
	2	0,59	Violet	2	0,05	Violet
	3	0,71	Violet	3	0,11	Violet
				4	0,24	Violet
				5	0,61	Violet foncé
				6	0,7	Violet foncé
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	1	0,51	Violet	1	0,06	Violet
	2	0,56	Violet foncé	2	0,11	Violet
	3	0,63	Violet foncé	3	0,22	Marron
	4	0,67	Violet	4	0,30	Marron
	5	0,72	Violet	5	0,37	Violet
	6	0,77	Violet	6	0,42	Violet
	7	0,81	Violet	7	0,50	Marron
				8	0,54	Violet foncé
				9	0,61	Marron
				10	0,66	Violet foncé
				11	0,73	Violet foncé
				12	0,80	Violet foncé



1. Phase acétate de *Schinus molle* feuilles.
2. Phase n-butanol de *Schinus molle* feuilles.
3. Phase acétate de *Schinus molle* fruits.
4. Phase n-butanol de *Schinus molle* fruits.
5. Phase acétate de *Pistacia vera* feuilles.
6. Phase n-butanol de *Pistacia vera* feuilles.

Figure 31 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 2).

Dans ce système de solvants, nous remarquons que les extraits méthanoliques de nos trois échantillons ont séparé un maximum de composés dans les extraits butanoliques que les extraits d'acétate d'éthyle.

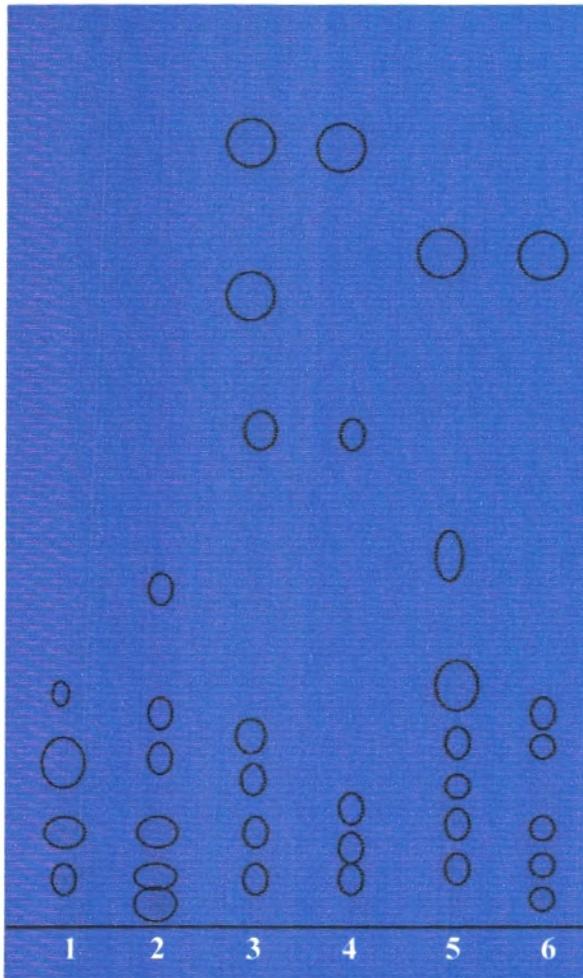
- Nous remarquons que dans les feuilles de *Schinus molle*, le nombre de taches dans l'extrait butanolique atteint treize spots alors que dans l'extrait d'acétate d'éthyle il est de l'ordre de cinq.
- Pour les fruits de *Schinus molle*, six composés ont été séparés dans l'extrait butanolique et trois dans l'extrait d'acétate d'éthyle.
- Pour *Pistacia vera*, douze spots ont été séparés par ce système dans l'extrait butanolique et sept spots dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

Tableau 10 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïques des feuilles et des fruits de *Schinus molle* et les feuilles de *Pistacia vera*.

Système de solvants 3 : Chloroforme/Méthanol/Acide acétique/Eau : 100/15/0,3/0,5.

Adsorbant : gel de silice.

	Extrait acétate d'éthyle	Rf	Couleur des spots	Extrait n-butanol	Rf	Couleur des spots
<i>Schinus molle</i> (feuilles)	1	0,02	Jaune	1	0,02	Blanc
	2	0,05	Violet foncé	2	0,05	Violet foncé
	3	0,09	Violet foncé	3	0,06	Violet foncé
	4	0,13	Bleu	4	0,10	Violet foncé
				5	0,13	Violet foncé
				6	0,21	Violet foncé
<i>Schinus molle</i> (fruits)	1	0,02	Violet	1	0,02	Bleu
	2	0,04	Violet	2	0,04	Violet
	3	0,08	Violet	3	0,06	Violet
	4	0,14	Violet	4	0,30	Violet
	5	0,31	Violet foncé	5	0,48	rouge
	6	0,39	Violet foncé			
	7	0,48	rouge			
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	1	0,02	Violet foncé	1	0,18	Jaune
	2	0,05	Violet foncé	2	0,35	Violet foncé
	3	0,06	Violet foncé	3	0,45	Violet foncé
	4	0,10	Violet foncé	4	0,55	Violet foncé
	5	0,14	Violet foncé	5	0,64	Violet foncé
	6	0,23	Jaune	6	0,68	Violet foncé
	7	0,41	Violet			



1. Phase acétate de *Schinus molle* feuilles.
2. Phase n-butanol de *Schinus molle* feuilles.
3. Phase acétate de *Schinus molle* fruits.
4. Phase n-butanol de *Schinus molle* fruits.
5. Phase acétate de *Pistacia vera* feuilles.
6. Phase n-butanol de *Pistacia vera* feuilles.

Figure 32 : Chromatographie sur couche mince des extraits phénoliques des deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) des trois échantillons (système de solvants 3).

Dans ce système de solvants, quatre spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Schinus molle*, alors que six spots ont été révélés dans l'extrait butanolique.

- Pour les fruits de *Schinus molle*, l'extrait méthanolique nous a permis d'obtenir sept composés dans l'extrait d'acétate d'éthyle et cinq composés dans l'extrait butanolique.
- Pour *Pistacia vera*, sept taches ont été révélés avec ce système dans l'extrait d'acétate d'éthyle et six dans l'extrait butanolique.

Nous avons comparé nos fractions avec des témoins que nous avons utilisés dans les mêmes conditions de ceux utilisés par **Benhammou, (2006)** avec d'autres témoins et un même système de solvants³.

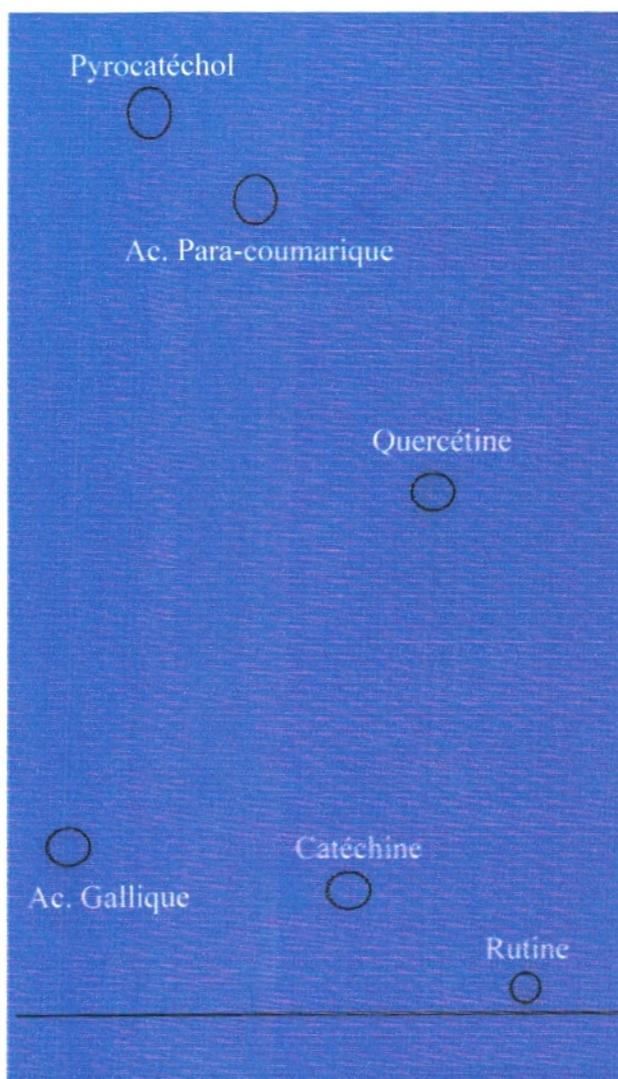
Les tableaux (11 et 12) résument les résultats des témoins obtenus par le système de solvants 3 de notre travail et celui de **Benhammou, (2006)**.

Tableau 11 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de nos témoins des composés phénoliques par le système de solvants 3.

Témoins	Rf	Couleur des spots	Classes phénoliques
Rutine	0,04	Violet	Flavone
Catéchine	0,09	Violet	Flavonol
Acide gallique	0,13	Bleu violet	Acide phénol
Quercétine	0,41	Jaune	Flavonol
Acide paracoumarique	0,64	Violet	Acide phénol
Pyrocatechol	0,71	Violet	Phénol simple

Tableau 12 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques par le système de solvants 3 (Benhammou, 2006).

Témoins	Rf	Couleur des spots	Classes phénoliques
Acide férulique	0,55	Bleu	Acide phénol
Myricétine	0,08	Jaune	Flavonol
Résorcinol	0,40	Violet	Phénol simple
Hydroquinone	0,36	Violet	Phénol simple



1. Acide gallique
2. Pyrocatechol
3. Acide paracoumarique
4. Catéchine
5. Quercétine
6. Rutine

Figure 33 : Chromatographie sur couche mince de nos témoins (système de solvants 3).

L'identification des composés phénoliques des feuilles et fruits de *Shinus molle* et les feuilles de *Pistacia vera* est reporté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Composés identifiés dans le système de solvants 3.

	Fraction acétate d'éthyle		Fraction butanolique	
	Composé	Rf	Composé	Rf
<i>Shinus molle</i> (feuilles)	Acide gallique	0,13		
	Catéchine	0,09		
<i>Shinus molle</i> (fruits)	Rutine	0,04	Rutine	0,04
<i>Pistacia vera</i> (feuilles)	Résorcinol	0,40	Acide paracoumarique	0,64

D'après nos résultats de la chromatographie sur couche mince de nos témoins et ceux de **Benhammou (2006)**, nous avons pu identifier cinq composés phénoliques répartis dans les deux espèces.

- Dans la fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Shinus molle*, nous avons pu identifier deux composés phénoliques qui sont : l'acide gallique et la catéchine.
- Pour les fruits de *Shinus molle*, dans les deux fractions, nous avons pu identifier un composé phénolique qui est la rutine.

Dans les feuilles de *Pistacia vera*, nous avons pu identifier deux composés phénolique, le résorcinol dans la fraction acétate d'éthyle et l'acide paracoumarique dans la fraction butanolique.

IV. Pouvoir antioxydant et anti-radicalaire testé par la méthode au DPPH

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études, car ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement de nombreuses pathologies.

Afin de déterminer la capacité anti-oxydante de nos extraits, nous avons fait appel au test de référence qui est le test au DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl) (**Figure 34**). Ce dernier est le test le plus fréquemment rencontré dans la littérature. Cette méthode est basée sur la neutralisation de radicaux libres. Elle consiste à mettre le radical DPPH en présence de molécules dites « anti-oxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite n'absorbe plus à la longueur d'onde donnée, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. Le résultat est donné par une mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

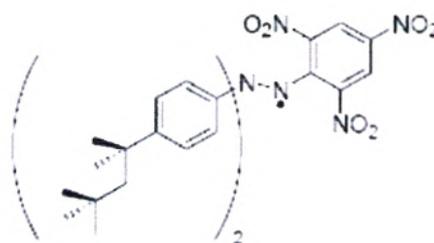


Figure 34 : 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).

IV.1. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes

Nous avons évalué l'activité anti-radicalaire des deux fractions, acétate d'éthyle et n-butanol, des extraits flavonoïques afin de déterminer la fraction la plus active par leur activité inhibitrice sur la solution méthanolique de DPPH, mesuré à 515 nm. La substance de référence est l'acide ascorbique.

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans les figures (35-41).

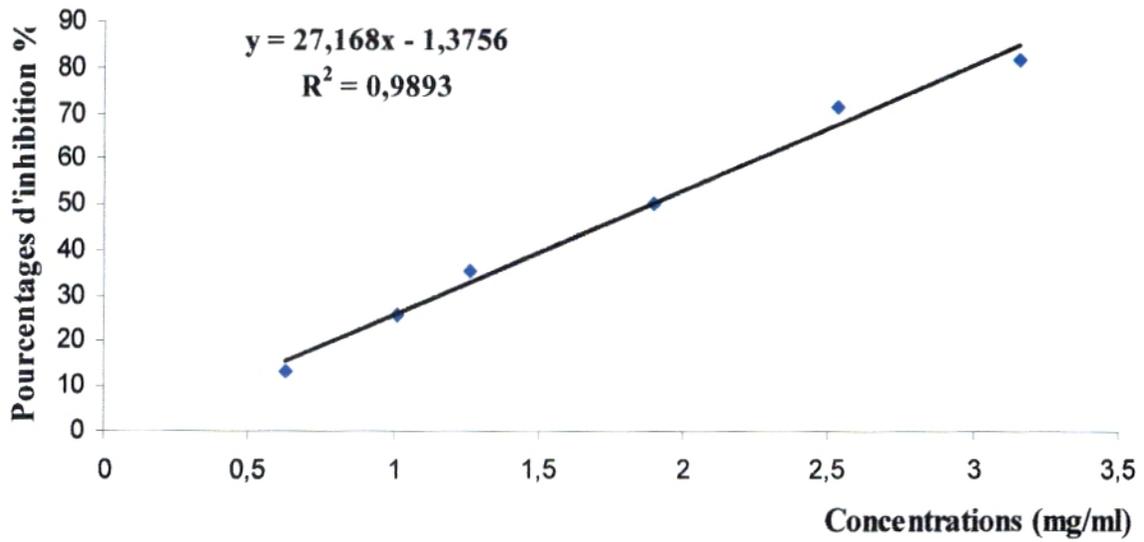


Figure 35 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des fruits de *Schinus molle*.

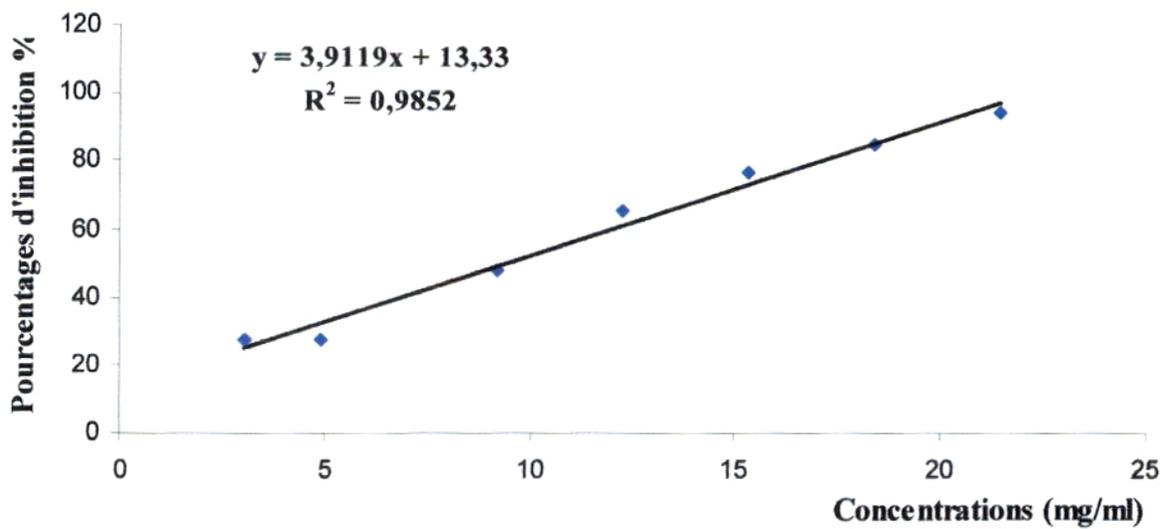


Figure 36 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des fruits de *Schinus molle*.

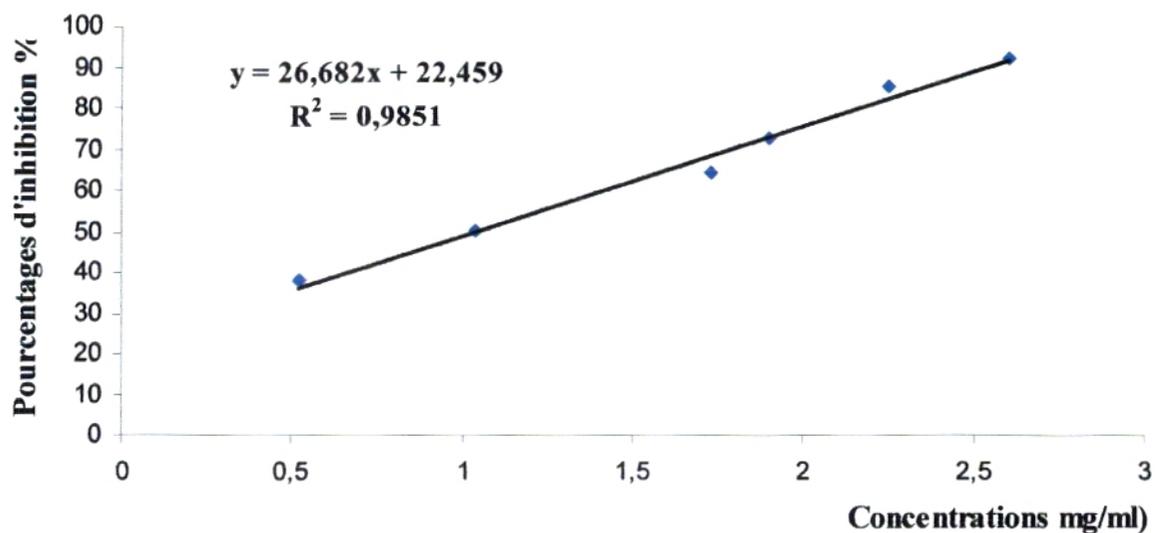


Figure 37 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des feuilles de *Schinus molle*.

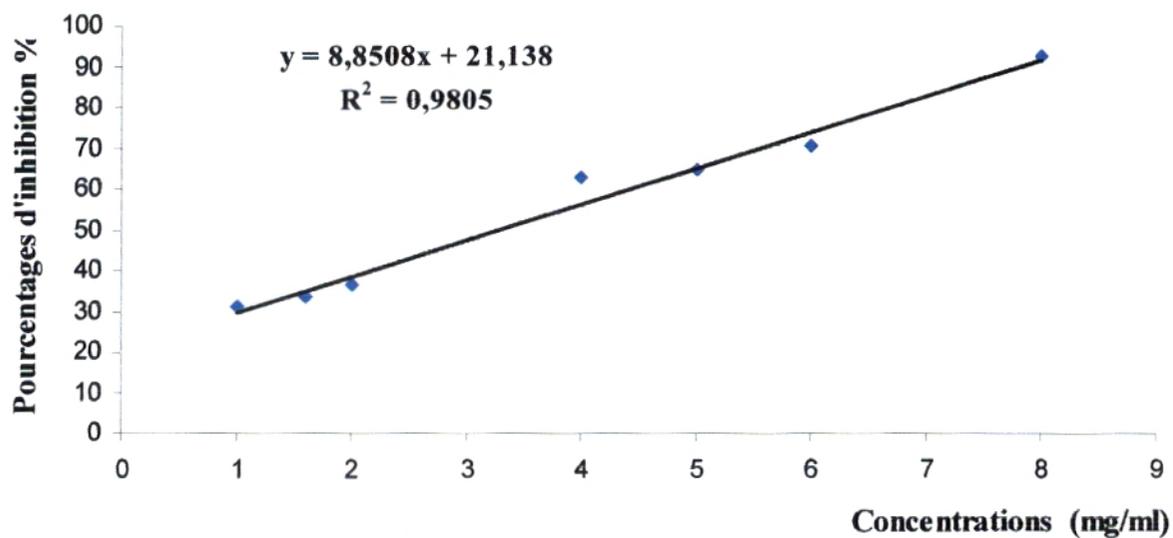


Figure 38 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des feuilles de *Schinus molle*

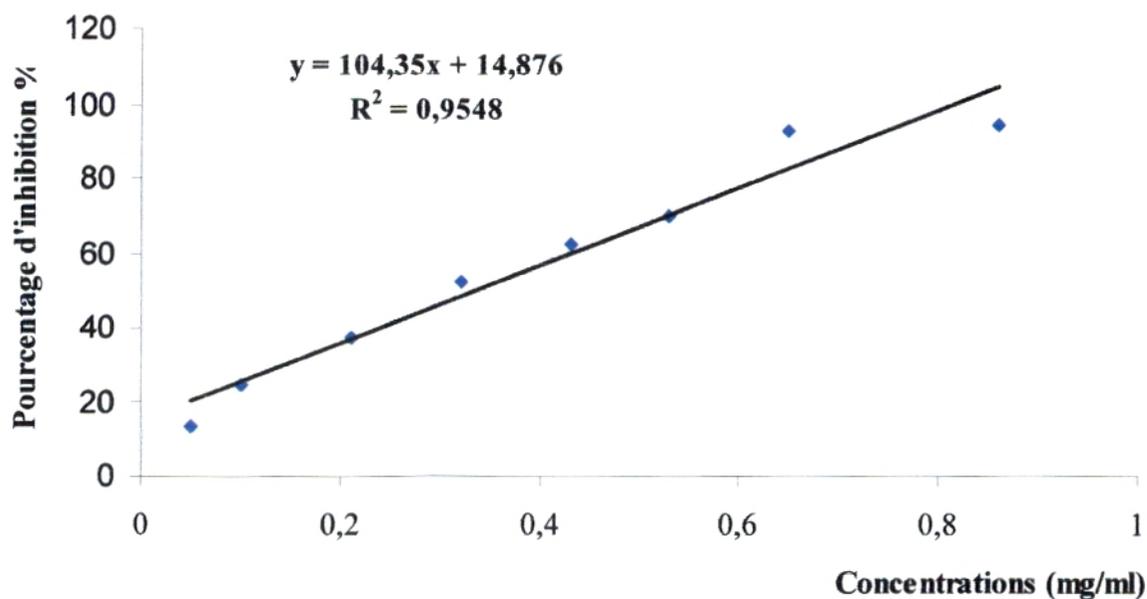


Figure 39 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase acétate d'éthyle des feuilles de *Pistacia vera*.

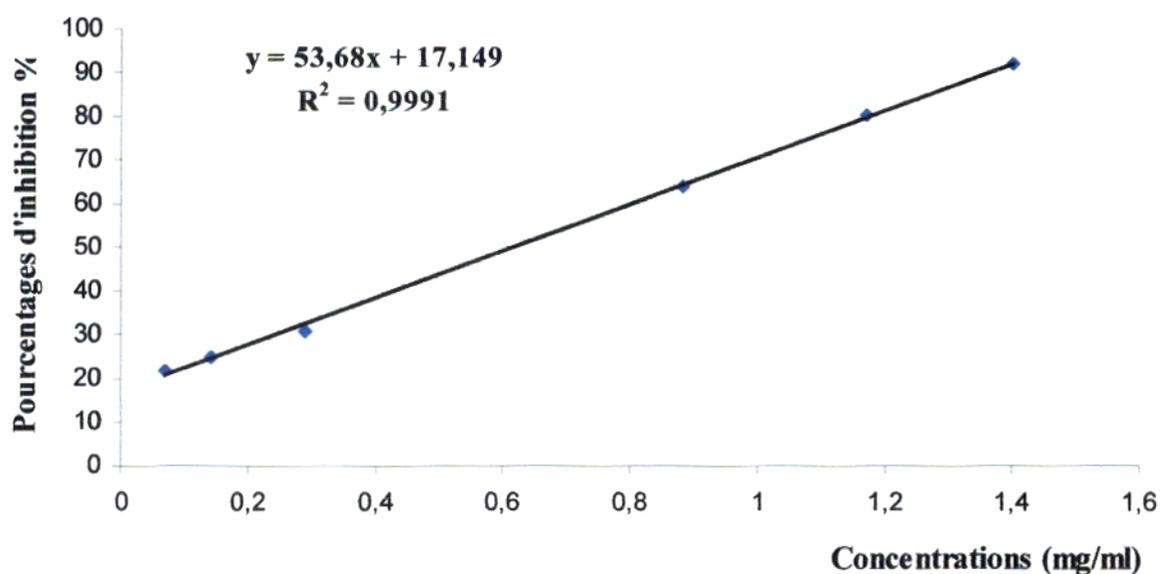


Figure 40 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de la phase n-butanol des feuilles de *Pistacia vera*.

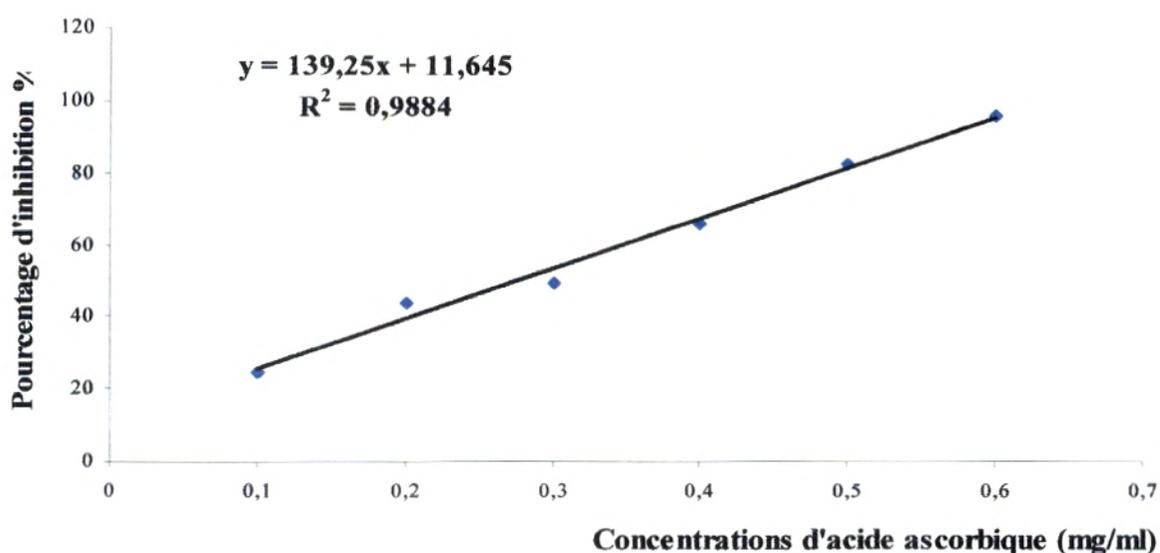


Figure 41 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.

D'après les figures (35-40), nous constatons que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration et que nos extraits présentent des pourcentages supérieurs à 80% d'inhibition à des faibles concentrations. Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une puissante activité à céder le proton afin de neutraliser le radical DPPH.

La capacité anti-oxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC_{50} , les concentrations inhibitrices de 50%, cette dernière est définie comme étant la concentration du substrat qui réduit 50% du DPPH.

Nous avons choisi de calculer les IC_{50} par les régressions linéaires dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait flavonoïque et l'ordonnée représente le pourcentage d'inhibition du radical DPPH. Le tableau 14 rapporte les valeurs des IC_{50} et le pouvoir anti-radicalaire des extraits phénoliques de *Schinus molle* et *Pistacia vera*.

Tableau 14 : Valeurs des IC₅₀ et le pouvoir anti-radicalaire (ARP) des flavonoïdes.

Plante	Partie étudiée	Phase organique	IC ₅₀ (mg/ml)	ARP
<i>Schinus molle</i>	Feuilles	Acétate d'éthyle	1,03	0,97
		n-butanol	3,26	0,30
	Fruits	Acétate d'éthyle	1,89	0,52
		n-butanol	9,37	0,10
<i>Pistacia vera</i>	Feuilles	Acétate d'éthyle	0,33	3,03
		n-butanol	0,61	1,63
Acide ascorbique			0,27	3,70

L'acide ascorbique est connu par sa propriété anti-oxydante, il est donc utilisé comme contrôle positif (Frei et al., 1990). Il présente un bon pouvoir anti-radicalaire qui est de l'ordre de 3,70.

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits flavonoïques des feuilles et des fruits de *Schinus molle* sont supérieures (allant de 1,03 mg/ml à 9,37 mg/ml) à celle de l'acide ascorbique qui est de l'ordre de 0,27 mg/ml. Par contre, l'extrait flavonoïque des feuilles de *Pistacia vera* présente des IC₅₀ comparables à celle de l'acide ascorbique.

Cependant, nous remarquons que le pouvoir anti-radicalaire de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait flavonoïque des feuilles de *Pistacia vera* (3,03) est proche à celui de l'acide ascorbique (3,70). Ceci peut être expliqué par la présence du résorcinol dans cette fraction que nous avons mis en évidence par CCM.

Nos résultats concordent à ceux reportés par les travaux de Benhammou et al. (2007) qui ont travaillé sur des espèces de la même famille que les nôtres à savoir *Pistacia atlantica* et *lentiscus*. Cette étude a montré que les extraits bruts de *Pistacia atlantica* et *lentiscus* ont une activité élevée quant au piégeage du radical DPPH.

Il faut noter que les fractions acétate d'éthyle des deux plantes ont donné un pouvoir anti-radicalaire plus important que les fractions n-butanol. Ceci vient renforcer

ce qu'ils avancent **Fabri et al., 2009** et **Tian et al., 2009**, que les fractions acétate d'éthyle ont un pouvoir anti-radicalaire plus important que les fractions n-butanol.

Nous pouvons déduire que nos extraits flavonoïques présentent un bon pouvoir antioxydant, ce qui est confirmé par la littérature que les flavonoïdes sont des capteurs puissants des radicaux libres (**Heilerova et al., 2003**).

IV.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été testées par leur pouvoir antioxydant (**Candan et al., 2003 ; Wang et al., 2008**) et ont donné de bon résultats ce qui nous a incité à tester nos essences.

Afin d'évaluer l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle*, nous avons réalisé le test au DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl). La substance de référence est l'acide ascorbique.

L'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia vera* n'a pas pu être utilisée en raison de sa très faible teneur.

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH, de chaque huile essentielle, sont illustrés dans les figures (42-44).

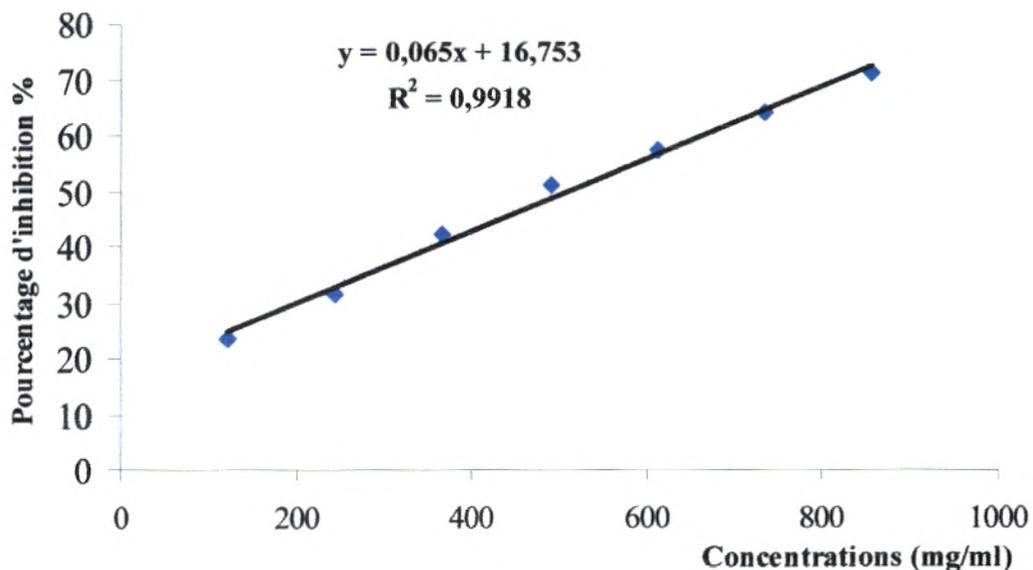


Figure 42 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile essentielle des feuilles de *Schinus molle*.

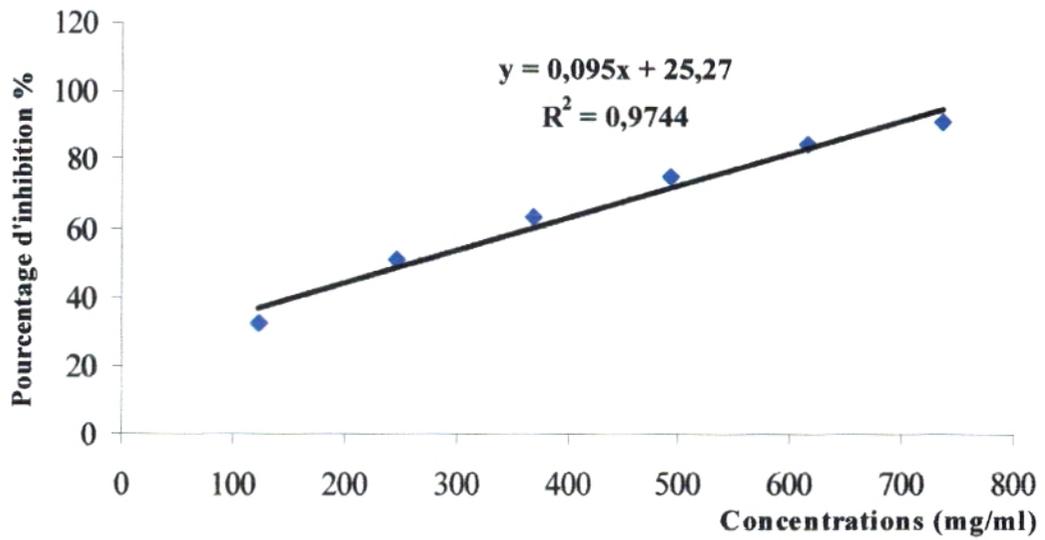


Figure 43 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle*.

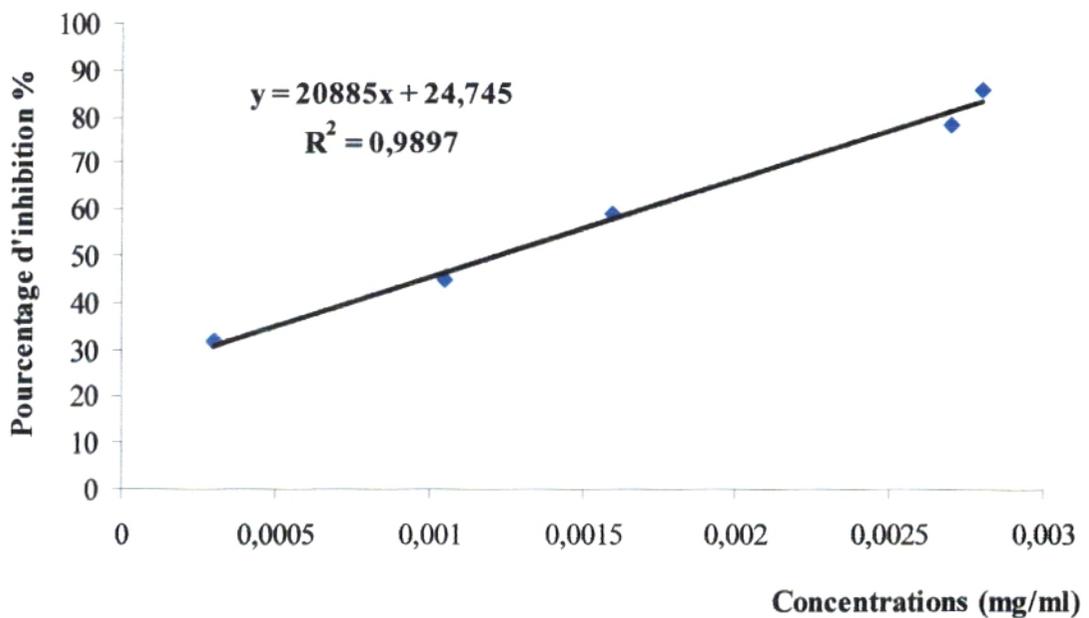


Figure 44 : Représentation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.

Les IC₅₀ ont été calculée comme précédemment par les régressions linéaires. Le tableau 15 rapporte les valeurs des IC₅₀ et le pouvoir anti-radicalaire des huiles essentielles de *Schinus molle*.

Tableau 15 : Valeurs des IC₅₀ et le pouvoir anti-radicalaire (ARP) de l'huile essentielle de *Schinus molle* .

Plante	Partie étudiée	IC ₅₀ (mg/ml)	ARP
<i>Schinus molle</i>	Feuilles	511,53	0,0018
	Fruits	274,77	0,003
Acide ascorbique		0,0012	833,33

L'ensemble des résultats nous amènent à déduire que nos huiles essentielles ne possèdent aucune activité anti-radicalaire et ceci en raison des très faibles ARP. Nos résultats ne conforment pas avec ceux de la littérature où certains auteurs avancent que les huiles essentielles ont un pouvoir antioxydant important (Candan *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2008).

V. Pouvoir antimicrobien

V.1. Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme s'est soigné avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Pour cela, les plantes ou leurs huiles essentielles sont utilisés pour leur capacité à lutter contre les bactéries.

Notre étude porte sur quelques plantes appartenant à la famille des anacardiées, qui présente plus ou moins une activité antimicrobienne.

Pour *Schinus molle*, nous avons déterminé le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts. Par contre, pour *Pistacia vera*, vue sa très faible teneur en huile essentielle, nous avons déterminé uniquement l'activité antimicrobienne des extraits bruts des feuilles.

V.2. Pouvoir antimicrobien des antibiotiques

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les mesures de celles-ci sont présentées dans la figure ci-dessous (**Figure 45**):

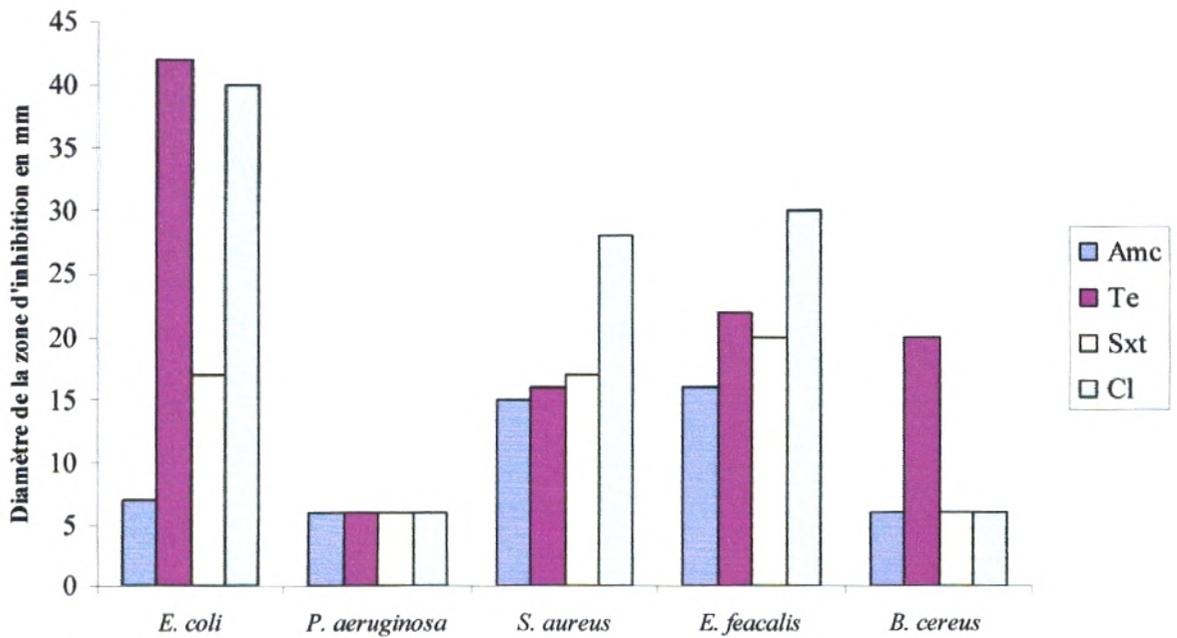


Figure 45 : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes.

Les souches ont montré des sensibilités vis-à-vis des antibiotiques à l'exception de l'amoxicilline + acide clavulanique. La figure montre que l'action de tétracycline sur *E. coli*, présente la zone d'inhibition la plus élevée suivi de céfalexine.

Nous remarquons également que la souche *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance à tous les antibiotiques. Par contre, *Bacillus cereus* s'est avérée sensible qu'à la tétracycline.

V.3. Pouvoir antimicrobien de l'antifongique

Nous avons testés l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de quatre moisissures. La figure (46) présente le pourcentage d'inhibition déterminé à partir des diamètres des zones d'inhibition.

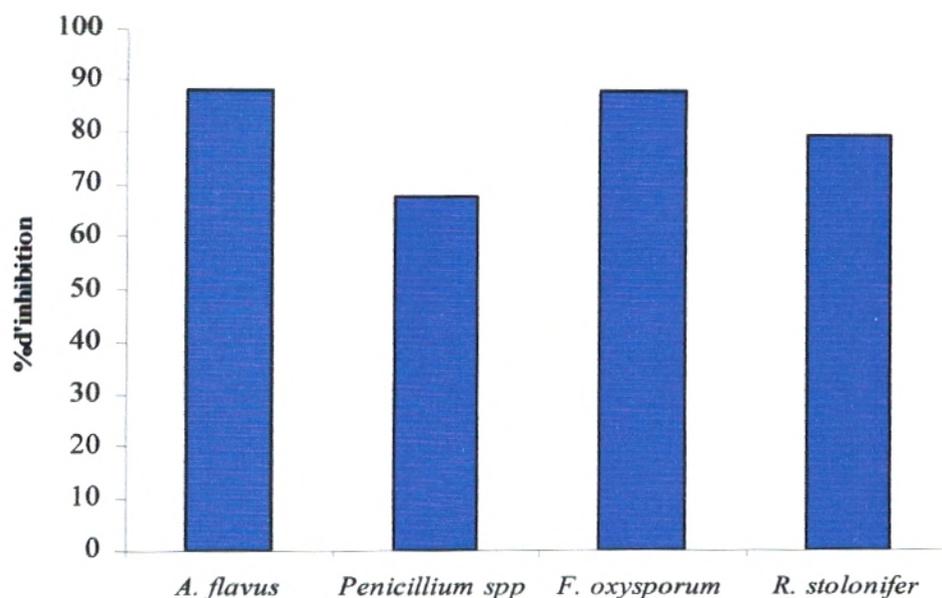


Figure 46 : Pourcentage d'inhibition de l'amphotéricine B relatif aux différentes souches fongiques.

Nous signalons que cet antifongique agit de façon active sur la croissance des colonies mycéliennes. En effet, il réduit fortement le taux de croissance de la colonie mycélienne d'environ 88,10% pour *F.oxysporum*, 88,12% pour *A. flavus* et 79,64% pour *Penicillium spp*.

Cependant, il s'est manifesté avec un taux d'inhibition légèrement plus important, soit de l'ordre de 68% vis-à-vis de *R. stolonifer*.

V.4. Pouvoir antimicrobien des extraits

V.4.1. Activité antibactérienne des extraits

V.4.1.1. Activité antibactérienne des extraits testée par la méthode de diffusion par disque (Aromatogramme)

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition des différents extraits ont été mesurées.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (47).

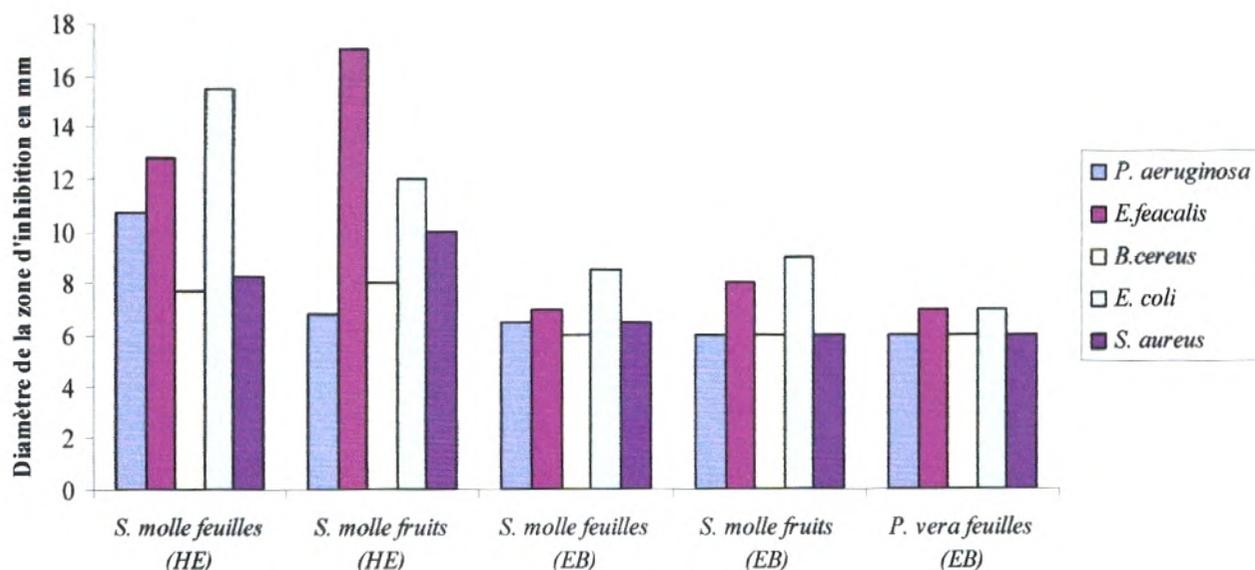


Figure 47 : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles et des extraits bruts relatives aux différentes souches bactériennes.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15mm (Rossi, 2003).

Nous constatons, d'après les valeurs figurant dans l'histogramme que les huiles essentielles présentent des zones d'inhibition plus intéressantes que celles des extraits bruts.

Nous pouvons déduire donc que ces extraits bruts sont inactifs, ils ne possèdent aucune activité antibactérienne sur ces souches. Par ailleurs, Molina-salinas et al., 2007, avancent que la souche *Streptococcus pneumoniae* s'est montrée la plus sensible vis-à-vis de l'extrait hexanique des fruits de *Schinus molle*.

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des huiles essentielles montrent clairement que les germes testés sont plus ou moins sensibles.

Nous remarquons une sensibilité faible des souches *E. coli* et *E. feacalis* aux essences. Cependant, les souches *P. aeruginosa*, *S. aureus*, et *B. cereus* se sont avérées résistantes à ces huiles.

La souche *E. feacalis* s'est avérée la plus sensible vis-à-vis de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle* avec un diamètre de l'ordre de 17mm. Par contre, *E. coli* est la plus sensible vis-à-vis des feuilles de *Schinus molle* avec un diamètre d'environ 15,5mm.

En comparaison des résultats obtenus de nos huiles à ceux des antibiotiques, nous pouvons déduire que nos huiles ne présentent aucune activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les bactéries testées, à l'exception *E. coli* et *E. feacalis* qui se sont manifestées sensibles aux antibiotiques suivant : le Triméthoprim-Sulfamide et l'Amoxicilline-Ac Clavulanique.

Nos résultats concordent avec ceux de **Gundidza ; (1993)** qui ont trouvés une activité modérée de l'essence des feuilles de *Schinus molle* sur plusieurs germes bactériens, parmi eux ceux utilisés dans notre étude.

Nous pouvons déduire que l'huile essentielle de *Schinus molle* (feuilles et fruits) a une activité antibactérienne remarquable à l'exception de quelques souches.

V.4.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

D'après les résultats obtenus par l'aromatogramme, nous avons jugé intéressant de déterminer la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle* sur les souches *E. coli* et *E. feacalis*. (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle* sur les souches *E. coli* et *E. feacalis*.

Concentration en µg/ml	HE des feuilles (<i>E. coli</i>)	HE des fruits (<i>E. feacalis</i>)
0,2	+	+
0,3	+	+
0,4	+	+
0,5	+	+
0,6	+	+
0,7	+	+
0,8	-	+
0,9	-	-
1	-	-

- : pas de croissance + : croissance

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'aromatogramme. En effet, ces souches sont inhibées à des CMI très importantes de l'ordre de 0,8µg/ml pour *E. coli* et 0,9µg/ml pour *E. feacalis*.

V.4.2. Activité antifongique des extraits testée par la méthode de contact direct

Après 5 jours d'incubation, les diamètres d'inhibition de la croissance des souches fongiques ont été mesurés.

Rappelons que la méthode employée est celle de contact direct.

Nous avons mis en évidence l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles et fruits du *Schinus molle* et ses extraits bruts ainsi les extraits bruts de *Pistacia vera*.

Mais il s'avère que les extraits bruts des deux plantes n'ont aucune activité sur les moisissures. Pour cela, nous avons étudié l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle*.

Les résultats obtenus de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Schinus molle* sont représentés dans la figure (48).

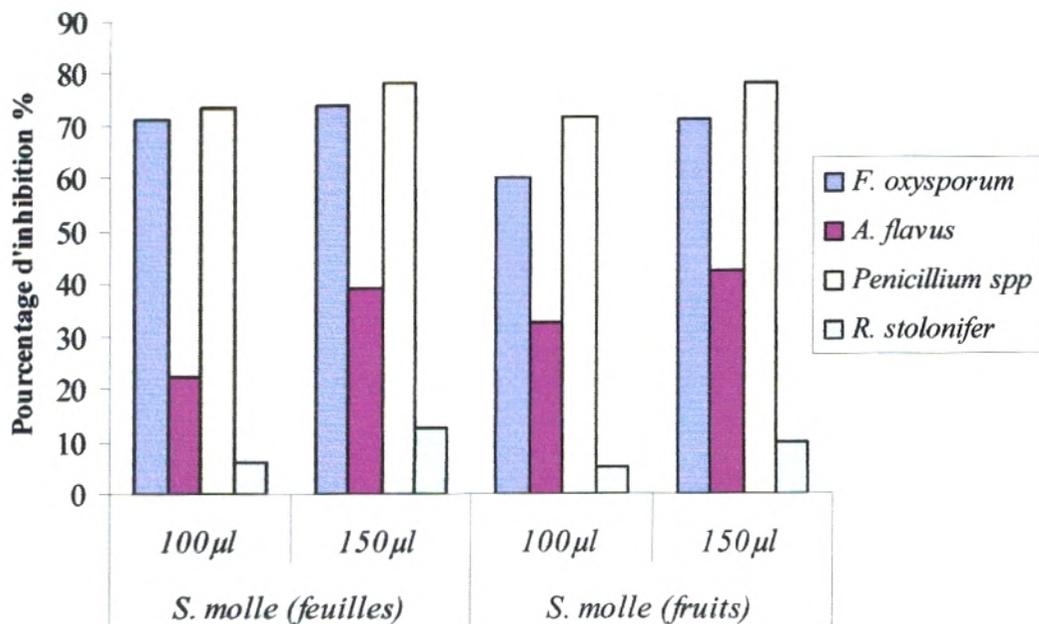


Figure 48 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de *Schinus molle* relatif aux différentes souches fongiques.

Les souches se sont montrées sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle de feuilles et de fruits à l'exception *Rhizopus stolonifer* qui s'est avérée très résistante.

Nous signalons que les feuilles et les fruits présentent quasiment les mêmes taux d'inhibition vis-à-vis de toutes les souches. Ceci peut être expliqué par la composition chimique semblable des deux parties (feuilles et fruits).

La souche *Penicillium spp* (environ 75%) est la plus sensible, suivi de *F. oxysporum* (70%). Par contre, *A. flavus* s'est avérée plus résistante avec un pourcentage d'inhibition variant entre 20 et 40%.

Conclusion générale

La découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

A travers la présente étude, nous avons recherché l'activité antimicrobienne et anti-oxydante des deux espèces de la famille des anacardiacees, *Schinus molle* et *Pistacia vera*, poussant dans la région de Tlemcen. Nous avons présenté les résultats de l'étude phytochimique de ces deux plantes, ainsi que leurs propriétés biologiques (antimicrobienne et anti-oxydante) de leurs essences et leurs extraits bruts.

Ces deux plantes présentent différentes classes de familles chimiques telles que les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes. Nous nous intéressons tout particulièrement aux essences et aux flavonoïdes de ces deux espèces.

Dans la première étape, nous avons procédé à l'extraction sélective des huiles essentielles. L'espèce *Schinus molle* présente une teneur en huiles essentielles appréciable dans les feuilles (1,11%) et dans les fruits (0,11%), tandis que les feuilles de *Pistacia vera* sont caractérisées par un très faible rendement de l'ordre de 0,004%.

L'analyse des huiles essentielles des deux parties de la plante *Schinus molle* a été effectuée par CPG/SM. Elle a permis l'identification de 31 constituants pour les feuilles dont deux composés majoritaires (l'alpha-phellandrène, 32,24% et le bêta-phellandrène, 23%) et 27 constituants pour les fruits dont quatre composés majoritaires (l'alpha-phellandrène 20,19%, le limonène 14,21%, le myrcène 13,61% et le para-cymène 12,20%).

Dans la deuxième étape des travaux, nous avons également procédé à l'extraction des flavonoïdes. Le rendement des extraits bruts est plus important dans les feuilles de *Pistacia vera* (29,50%) que dans les feuilles de *Schinus molle* qui est de l'ordre de 15,50% ; il est comparable à celui des fruits de cette dernière espèce (26%).

Par contre, la teneur en phénols totaux est plus importante dans les feuilles de *Schinus molle* (145,14mg/g) que dans les fruits (40,61mg/g) et dans les feuilles de *Pistacia vera* (30,22mg/g).

Les feuilles de *Schinus molle* sont riches en flavonoïdes (91,84mg/g). Néanmoins, les teneurs en flavonoïdes des fruits de *Schinus molle* (13,18mg/g) et des feuilles de *Pistacia vera* (13,45mg/g) sont proches.

L'analyse par CCM, nous a permis de mettre en évidence un acide phénol (acide gallique) et un flavanol (catéchine) dans les feuilles de *Schinus molle* et une flavone (rutine)

dans les fruits. Deux composés phénoliques ont été identifiés dans l'espèce *Pistacia vera* : le résorcinol et l'acide para-coumarique.

Dans la troisième étape, nous avons évalué les capacités anti-oxydantes des flavonoïdes et des huiles essentielles par leur action anti-radicalaire contre le radical DPPH. Les résultats du pouvoir anti-radicalaire des flavonoïdes se sont avérés intéressants. Les valeurs des ARP trouvées, dans l'ordre du pouvoir antioxydant, était : fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Pistacia vera* (3,03) > fraction n-butanol des feuilles de *Pistacia vera* (1,63) > fraction d'acétate d'éthyle des feuilles de *Schinus molle*(0,97) > fraction acétate d'éthyle des fruits de *Schinus molle* (0,52) > fraction n-butanol des feuilles de *Schinus molle*(0,30) > fraction n-butanol des fruits de *Schinus molle* (0,10). Cependant, les huiles essentielles de *Schinus molle* se sont montrées inactives.

Dans la quatrième étape, nous avons également évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits bruts vis-à-vis de cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*) et quatre souches fongiques (*Aspergillus flavus*, *Penicillium spp*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer*). Les résultats obtenus nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- Les huiles essentielles présentent un pouvoir antimicrobien plus ou moins important que celui des extraits bruts. Ces derniers se sont avérés inactifs sur les souches testés.
- Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des huiles essentielles montrent que les souches *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* sont plus ou moins sensibles. Cependant, les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* se sont avérées résistantes à ces huiles essentielles.
- Les souches fongiques se sont avérées sensibles aux huiles essentielles à l'exception *Rhizopus stolonifer*.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substance de source naturelle biologiquement active.

Des essais complémentaires seront nécessaires comme la détermination des composés volatils de *pistacia vera* malgré le faible rendement et aussi de Réaliser l'identification des molécules isolées des phases acétate d'éthyle et n-butanol par divers techniques chromatographiques, dont la chromatographie liquide haute performance (HPLC analytique et préparative) et des méthodes adaptées de RMN pour l'élucidation structurale

puis de s'orienter vers les composés phénoliques qui possèdent de nombreuses propriétés thérapeutiques en réalisant des tests d'activités biologiques *in vitro* et éventuellement *in vivo*.

Références bibliographiques

Adams R. P. ; (1995).

In identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography (Mass Spectroscopy Allured).

Publishing : Carol Stream, IL.

AFNOR ; (1989).

Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes françaises. 3^{ème} Edition. AFNOR, Paris.

Allinger N.L., Cava P.M., Dejoule C.R., Jonhson C.R., Lebel N.A., Stevens C.L. ; (1975).

Chimie organique.

Ed. Science Mc Graw.Hill. Paris. 813.

Ardestani A., Yazdanparast R. ; (2007).

Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation.

Food and Chemical Toxicology ; 45 ; 2402–2411.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. ; (1995).

Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.

Ed. Masson. Paris.

Atik Bekkara F., Benhammou N., Panovska K. T. ; (2008)

Biological activity of essential oil and the extract of the phenolic compounds of *inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria).

Advances in Food Science (AFS) ; 30 ; 132-139.

BACIS (Boelens Aroma Chemical Information Service) ; (1999).

ESO 2000, the complete database of essential oils. M. H. Boelens : the Netherlands.

Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P., Angioni A. ; (2007).

Characterization of the Volatile Constituents in the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Different Origins and Its Antifungal and Antioxidant Activity.

J. Agric. Food Chem. ; 55 ; 7093-7098.

Barrachina M.D., Bello R., Martinez-Cuesta M.A., Primo-Yúfera E., Esplugues J. ; (1997).

Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytother. Res.* ; 11 ; 317–319.

Baser K. H. C., Kurkcuoglu M., Demircakmak B., Ulker Nasuh, Beis Sedat H. ; (1997).

Composition of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Turkey.

Journal of Essential Oil Research ; 9(6); 693-696.

Baytop T. ; (1999).

Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), Istanbul University Publications No.: 3255. Nobel Presshouse, Istanbul.

Becker M., Picard J.F. et Timbal H. ; (1982).

Larousse des arbres, des arbustes et des arbustaux. Librairie Larousse. 315.

Bekhechi C., Atik Bekkara F., Abdelouahid D.E, Tomi F., Casanova J. ; (2007).

Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. From Algeria.

J. Essent. Oil Res. ; 19 ; 594-596.

Bekkara F., Jay M., Viricel M.R., Rome S. ; (1998).

Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation.

Journal Plant and Soil ; 203 ; 27-36.

Belaïche P. ; (1979).

Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, l'aromatogramme.

Ed. Maloine tome 1. Paris.

Belarbi M., Vassilev N., Mashev N. ; (2007).

Contribution to the investigation of food and antioxidant value of acorns of various oak species in the Algerian region.

Oxidation Communication ; 29(3); 35-42.

Bello R., Barrachina M.D., Moreno L., Primo-Yúfera E., Espluges J. ; (1996).

Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus molle* L. in rats.

Phytother. Res. ; 10 ; 05-634.

Bello R., Beltrán B., Moreno L., Calatayud S., Primo-Yúfera E., Espluges J. ; (1998).

In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L.

Phytother. Res. ; 12 ; 05-523.

Belot A. ; (1978).

Dictionnaire des arbres et arbustes de jardins.

Ed. Bordas, Paris. 383.

Bendimerad N., Taleb Bendiab S.A., Benabadji A.B., Fernandez X., Valette L., Lizzani-Cuvelier L. ; (2005).

Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder essential oil from Algeria.

J. Agric. Food Chem. ; 53 ; 2947-2952.

Bendimerad N., Taleb Bendiab S.A., Breme K., Fernandez X. ; (2007).

Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria.

J.E.O.R. ; 19 ; 206-208.

Benhammou N. ; (2006).

Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences.117.

Benhammou N., Atik Bekkara F., Panovska T.K. ; (2007).

Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf.

Advances in Food Sciences ; 29 (3) ; 155-161.

Benhammou., Atik Bekkara F., Panovska K. T. ; (2008).

Antioxydant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts.

African Journal of Pharmacy and Pharmacology ; 2 ; 22-28.

Bergogne-Bérézin E., Brogard J.M. ; (1999).

Bases biologiques de l'antibiothérapie.

Ed. Masson. Paris. 27.

Berrin O, Aslanb M., Orhanb I., Karaoglu T. ; (2005).

Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*.

Microbiological Research ; 160 ; 159-164.

Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., Mc Analley S., Mc analley B. ; (2003).

Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé.

GlycoScience et nutrition ; 6 ; 04-07.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. ; (1995).

Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.

Lebensmittel – Wissenschaft and Technology ; 28 ; 25-30.

Brasseur T. ; (1989).

Anti-inflammatory properties in flavonoids.

J. Pharm. Belg. ; 44 ; 235-241.

Bruneton J. ; (1993).

Eléments de phytochimie et de pharmacologie.

2^{ème} Ed. Lavoisier. Technique et documentation. Paris. 405-426.

Bruneton J. ; (1999).

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.

3^{ème} Ed. Lavoisier. Technique et documentation. Paris. 370-388.

Buchbauer G., Jirovetz L. ; (1994).

Aromatherapy- use of fragrances and essential oils as medicaments.

Flavour and Fragrance J. ; 9 ; 217-222.

Burt S.A. ; (2004).

Essential oils : their antibacterial properties and potentiel applications in foods-a rewiew.

J. of Food Microbiology ; 94 ; 223-253.

Bustaf F., FoeGeding P.M. ; (1983).

Chemical food preservatives in S. blok.

Ed. Lea and Febiger. Eds Philadelphia U.S.A. 656-694.

Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H. A. ; (2003).

Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae).

Journal of Ethnopharmacology ; 87 ; 215-220.

Capo M., Courilleau V., Valette C. ; (1990).

Chimie des couleurs et des odeurs.

Culture et techniques. 204.

Carré P. ; (1953).

Précis de technologie et de chimie industrielle.

Tome 3. Ed. Ballière J.B. et fils. 124-135.

Cavé A. ; (1993).

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.

2^{ème} Ed, Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. 274-285.

Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. ; (2001).

Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*.

J. of Ethnopharmacology ; 77 ; 123-127.

Connolly J.D., Hill R.A. ; (1991).

Methods in plant biochemistry.

Triterpenoids ; 7 ; 331-351.

Constantin E. ; (1996).

Spectrométrie de masse.

Ed. Lavoisier Tech. et Doc. Paris. 1-14.

Cooper J.W. ; (1980).

Spectroscopic Techniques for Chemistry Research.

Ed. John Wiley & Sons, New York.

Costa M., Nogueira J.M.F., Miguel M.G. , Romano A. ; (2003).

In vitro mass clonal propagation of *Dittrichia viscosa* subsp. *Revoluta* and analysis of its secondary metabolites.

Journal of Horticultural Science and Biotechnology ; 78(3) ; 310-314.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. ; (2000).

The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alterniflora* (tea tree oil).

J. of Applied Microbiology ; 88 ; 170-175.

Cuyckens F., Claeys M. ; (2004).

Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.

Journal of Mass Spectrometry ; 39(4) ; 01-15.

Da Silva E.J.A., Oliveira A.B., Lapa A.J. ; (1994).

Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice.

J. Pharmacol. ; 46(2) ; 118-22.

De Rijke E., Out P., Niessen W.M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A. ; (2006).

Analytical separation and detection methods for flavonoids.

Journal of Chromatography A ; 1112 ; 31-63.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. ; (1999).

Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs.

Life Sciences ; 65(4) ; 337-353.

Dubey V.S., Bhalla R., Luthra R. ; (2003).

An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants.

J. Biosci. ; 28 (5) ; 637-646.

Duru M.E., Cakir A., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S., Hirata T.; (2003).

Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species.

Fitoterapia ; 74 ; 170-176.

Dwivedi S.K., Singh K.P. ; (1998).

Fungitoxicity of some higher plant products against *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid.

Flavour and Fragrance J. ; 13 ; 397-399.

Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S., Scio E. ; (2009).

Mitracarpus frigidus aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects.

Bioresource Technology ; 100 ; 428-433.

Facino R.M., Carini M., Stefani R., Aldini G., Saibene L. ; (1995).

Anti-Elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenines from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum* and *Ruscus aculeatus* : factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency.

Arch. Pharm. ; 328 ; 720-724.

Fandohan P., Gbenou J.D., Gnonlofin B. ; (2004).

Effet of essential oils on the growth of Fumonisin contamination in corn.

J. Agric. Food Chem. ; 52 ; 6824-6829.

Favier A. ; (2003).

Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.

L'actualité chimique. 108-115.

Ferei B., Stocher R., Angleterre L., Ames B.N. ; (1990).

Ascorbate : Antioxydant le plus efficace dans le plasma sanguine humain.
Biol. D'Exp. Médi. D'Adv. ; 264 ; 63-155.

Galati E.M., Monforte M.T., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Trovato A., Tripodo M.M. ; (1994).

Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity.
Farmacol. ; 40(11) ; 709-12.

Garnero J. ; (1985).

Aspects pratiques de la fabrication du menthol lévogyre.
Phytochemistry ; 13 ; 5.

Gaston B. ; (1990).

La grande flore en couleurs.
Edition Belin. Paris. 214-215.

Guignard J.L. ; (1979).

Abrégé de biochimie végétale.
2^{ème} Ed. Masson. Paris. 84.

Gundidza M. ; (1993).

Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* L.
The Central African journal of medicine ; 39(11) ; 231-4.

Gurib-Fakim A. ; (2006).

Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.
Molecular Aspects of Medicine ; 27 ; 1-93.

Gutteridge J.M. ; (1993).

Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence.
Free Radic. Res. Commun ; 19 ; 141-158.

Hakki Alma M., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Tuncay Efe F., Yilmaz N. ; (2004).

Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.).
J. Agric. Food Chem. ; 52 ; 3911-3914.

Harborne J.B. ; (1988).

The flavonoids, Advances in research since 1980.
Ed. Chapman & Hall. London.

Hatanaka A., Kajiwara T., Sekiya J. ; (1987).

Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves.
Chem. Phys. Lipids ; 44 ; 341-361.

Hayouni E., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J-Y., Hammami M., Hamdi M. ; (2008).

Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat.

International Journal of Food Microbiology ; 125 ; 242-251.

Heilerova L., Buckova M., Tarapcik P., Silhar S., Labuda J. ; (2003).

Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extrats of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor.

Czech J. Food Sci. ; 21(2) ; 78-84.

Heimeur N., Idrissi Hassani L.M., Amine serghini M. ; (2004).

Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae).

Reviews in Biology and Biotechnology ; 3(1) ; 37-42.

Heller W., Forkmann G. ; (1993).

Biosynthesis of Flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in research since 1986*.

Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. 499.

Hennebelle T. ; (2006).

Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants.

Thèse pour l'obtention de Docteur en Chimie Organique et Macromoléculaire.

Université des sciences et technologie de Lille-Lille1, Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement ; 304.

Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. ; (1993).

Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.

Lancet. 342 ; 1007-1011.

Hollman P.C.H., Katan M.B. ; (1997).

Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man.

Biomedicine and Pharmacotherapy ; 51(8) ; 305-310.

Hostettmann K., Potterat O., Wolfender J.-L. ; (1998).

The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs.

Chimia. ; 52 ; 10-17.

Hoult J.R.S., Paya M. ; (1996).

Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins : natural products with therapeutic potential.

Gen. Pharmacol. ; 27 ; 713-722.

Huaman Y., de la Cruz O.A., Bosilcov A., Batiu I. ; (2004).

Essential oil from the fruits of *Schinus molle* L. from Peru.

Journal of Essential Oil-Bearing Plants ; 7(3) ; 223-227.

Ibrahim Magda T., Fobbe R., Nolte J. ; (2004).

Chemical composition and biological studies of Egyptian *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* raddi oils.

Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University) ; 42(2) ; 289-296.

Jackman R.L., Smith J.L. ; (1996).

Anthocyanins and betalains in « Natural Food Colorants ».

Eds. Hendry G.A.F. and Houghton J.D., Blackie Academic and Professional. London. 244-309.

Jennings W., Shibamoto T. ; (1980).

In qualitative analysis of flavor and fragrance volatils by Glass Capillary Gas chromatography.

Academic Press. New York.

Joffin J.N., Leyral G. ; (2001).

Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques.

3^{ème} Ed. Biologie technique, 58.

John Goad L. ; (1991).

Methods in plant biochemistry.

Phytosterols ; 7 ; 369-371.

Joulain D., König W. A. ; (1998).

The atlas of spectra data of sesquiterpene hydrocarbhone.

E. B.-Verlag : Hambourg.

Joulain D., König W.A., Hochmuth D.H. ; (2001).

Terpenoids and related constituents of essential oils.

Library of Mass Finder 2.1.

Judeinstein P., Berdague P., Bayle J.P., Rogalska E., Rogalski M., Petit Jean D., Guermouche M.H. ; (1999).

Thermodynamic parameters, stationary phases, GC, liquid crystals.

J. of chromatography ; 859 ; 59-67.

Kamm W., Dionisi F. ; (2001).

Analysis of steryl in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography.

Journal of chromatography A ; 918 ; 341-349.

Kováts E. ; (1965).

Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System.

Advances in Chromatography ; 1; 229-247.

Lafon J.P., Thorand Prager C., Levy G. ; (1988).

« Biochimie structurale » Biologie des plantes cultivées (tome 1).

Ed.Lavoisier. Paris.

Lahlou M. ; (2004).

Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils.
Phytotherapy Research ; 18 ; 435-448.

Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.P. ; (1994).

Biogénèse des monoterpènes.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux ; 133 ; 69-118.

Larousse ; (2001).

Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. 14-16.

Lawrencet B.M. ; (2000).

Essential oils from agriculture to chemistry.
The international Journal of Aromatherapy ; 10 ; 82-98.

Leong L. P. & Shui G. ; (2002).

An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets.
Food Chemistry ; 76 ; 69-75.

Lesueur D., de Rocca Serra D., Bighelli A., Hoi T. M., Ban N. K., Thai T. H., Casanova J. ; (2007).

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam.
Flavour and Fragrance Journal ; 22 : 317 – 321.

Linden G., Lovient D. ; (1994).

Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole.
Ed. Masson. Paris. 104-109.

Longevialle P. ; (1981).

Spectrométrie de masse des substances organiques.
Ed. Masson. Paris. 3-98.

Males Z., Medic-Saric M. ; (2001).

Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis ; 24 ; 353-359.

Marfak A. ; (2003).

Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etudes de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides.
Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de Docteur à l'Université de Limoges ; France.
Spécialité : Biophysique ; 187.

Marongiu B., Porcedda A.P.S., Casu R., Pierucci P. ; (2004).

Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L.
Flavour and Fragr. J. ; 19 ; 554-558.

Mc Lafferty F. W., Stauffer D. B. ; (1989).

The Wiley NBS Registry of Mass Spectral Data.
J. Wiley & Sons. New York.

Mejholm O., Dalgaard P. ; (2002).

Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products.

Letters in Applied Microbiology ; 34 ; 27-31.

Memelink J., Verpoort R., Kijine J.W. ; (2001).

Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

Trends in Plant Science ; 6 ; 212-221.

Mensor L.L., Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S., Leitao S.G. ; (2001).

Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method.

Phytother. Res. ; 15 ; 127-130.

Merken H.M., Beecher G.R. ; (2000).

Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review.

Journal of Agricultural and Food Chemistry ; 48(3) ; 577-599.

Middleton E. J., Drzewiecki G. ; (1984).

Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents.

Biochem. Pharmacol. ; 33(21) ; 08-333.

Middleton E.J. ; (1996).

Biological properties of plant flavonoids: an overview.

Int. J. Pharmacol. ; 34(5) ; 344-348.

Molina-Salinas G.M., P´erez-L´opez A., Becerril-Montes P., Salazar-Aranda R., Said-Fern´andez S., Waksman de Torres N. ; (2007).

Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity.

Journal of Ethnopharmacology ; 109 ; 435-441.

Mookerjee B.K., Lee T.P., Logue G.P., Lippes H.A., Middleton E. ; (1986).

The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses.

Prog. Clin. Biolo. Res. ; 213 ; 20-511.

Motiejūnaite O., Pečiulytė D. ; (2004).

Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality.

Medicina (Kaunas) ; 40(8) ; 787-794.

Namba T., Morita O.S., Huang S.L., Goshina K., Hattori M., Kakiuchi N. ; (1988).

Studies on cardio-active crude drugs. Effects of coumarins on cultured myocardial cells.

Planta medica ; 54 ; 277-282.

Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P. ; (1994).

Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture.

Life Sci. ; 54(5); 20-313.

- Olafsson K., Jaroszewski J.W., Smitt U.W., Nyman U. ; (1997).**
Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*.
Planta Med. ; 63 ; 352-355.
- Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. ; (2006).**
Mechanism of Action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils on
Escherichia coli O157 : H7 and *Listeria monocytogenes*.
J. of Food Protection ; 69 ; 1046-1055.
- Paris M., Hurabielle M. ; (1981).**
Abrégé de matière médicale « pharmacognosie ». Tome 1. Généralités, morphologie.
Ed. Masson. Paris. 182-216.
- Pietta P. ; (2000).**
Flavonoids as Antioxidants.
Journal of Natural Products ; 63(7) ; 1035-1042.
- Quezel P., Santa S. ; (1963).**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques.
Editions du centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 401.
- Quiroga E.N., Sampietro A.R., Vattuone M.A. ; (2001).**
Screening antifungal activities of selected medicinal plants.
J. Ethnopharmacol. ; 74 ; 89-96.
- Rai M.K., Acharya D., Wadegaonkar P. ; (2003).**
Plant derived-antimycotics : potential of Asteraceous plants, In plant-derived antimycotics :
Current Trends and Future prospects, Haworth press, New-York, London, Oxford. 165-185.
- Read M.A. ; (1995).**
Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular.
Am. J. Pathol. ; 147(2) ; 07-235.
- Richter G. ; (1993).**
« Métabolisme des végétaux ». Physiologie et Biochimie.
Presses polytechniques et universitaires. Romandes. 292.
- Rogalska E., Rogalski M., Judeinstein P., Bayle J.P., Guermouche M.H. ; (2001).**
Thermodynamic and interfacial study of two liquid crystals substituted with polyethylene
oxide (POE) chains.
J. Molecular liquids ; 94 ; 220-231.
- Rose A.E. ; (1965).**
Technique of organic chemistry.
2nd Edition, Vol. IV Distillation by John Wiley and sons, New York.
- Rossi P.G. ; (2003).**
Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des
huiles essentielles. *Université de corse*, 2.

Rossini C., Menendez P., Dellacassa E., Moyna P. ; (1996).

Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan Origin.
Journal of Essential Oil Research ; 8(1) ; 71-3.

Ruffa M.J., Ferraro G., Wgner M.L. Calcagno M.L., Campos R.H., Cavallaro L. ; (2002).

Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line.
J. Ethnopharmacol. ; 79 ; 09-335.

Sallé J-L. ; (1991). « Les huiles essentielles », Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie.

Edition. Frison-Roche. Paris. 21.

Sannomiya M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A., Vilegas W. ; (2005).

Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu.
Rapid Communications in Mass Spectrometry ; 19(16) ; 2244.

Scalbert A. ; (1991).

Antimicrobial properties of tannins.
Phytochemistry ; 30 ; 3875-3883.

Schmourlo G., Mendonça-Filho R.R., Alviano C.S., Costa S.S. ; (2005).

Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants.
J. Ethnopharmacol. ; 96 ; 08-563.

Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S., Steiner W. ; (2001).

Isolation of carvacrol Assimilating Microorganisms.
Biotechnology ; 39(4) ; 341-345.

Silverstein R.M., Bassler G.C., Morill T.C. ; (1991).

Spectroscopic identification of Organic Compounds.
5^{ème} Edition, John Wiley & Sons, New York.

Somon A. ; (1987).

Arbes, arbustes et arbissaux en Algérie.
O.P.U, Alger. 143.

Svoboda K., Hampson J.B. ; (1999).

Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.

Tappel A., Moller L. ; (1996).

Glutathion Peroxidase and other Selenoproteinler.
Ed. VAN Nostrand Co. New York. 122-132.

Taylor, L. ; (2005).

The healing power of rainforest herbs. A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals.

Ed. Square One Publishers. New York.

Tian F., Li B., Yang J., Zhang G., Chen Y., Luo Y. ; (2009).

Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities.

Food Chemistry ; 113 ; 173-179.

Tsokou A., Georgopoulou K., Melliou E., Magiatis P., Tsitsa E. ; (2007).

Composition and Enantiomeric Analysis of the Essential Oil of the Fruits and the Leaves of *Pistacia vera* from Greece.

Molecules ; 12 ; 1233-1239.

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. ; (2002).

The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.

Applied and Environmental Microbiology ; 68 ; 1561-1568.

Valnet J. ; (1984).

« Aromathérapie » : Traitement des maladies par les essences de plantes.

Ed. Maloine. S. A n°10.

Van Den Dool H., Kratz P.D. ; (1963).

A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.

J. Chromatog. ; 11 ; 463-471.

Van Hoof L., Vanden Berghe D.A., Hatfield G.M., Vlietinck A.J. ; (1984).

Plant antiviral agents: V-3-Methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis.

Planta Medica ; 50 ; 513-517.

Vandepitte J., Verhaegen J., Engbaek K., Rohmer P., Piote P. ; Heuck C.C. ; (2003).

Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.

2nd Ed. Geneva.

Vansant G. ; (2004).

Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

Vermerris W., Nicholson R. ; (2006).

Chemical properties of phenolic compounds, phenolic compound biochemistry.

Ed. Springer. Florida USA. 35-62.

Wang W., Wu N., Zu Y.G., Fu Y.J. ; (2008).

Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components.

Food Chemistry ; 108 ; 1019-1022.

Yueqin Z., Recio M.C., Mánez S., Giner R.M., Cerdá-Nicolás M., Ríos J. ; (2003).
Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits.
Planta Med. ; 69 ; 08-893.

Zhao J., Lahiri-Chatterjee M., Sharma Y., Agarwal R. ; (2000).
Inhibitory effect of flavonoïd antioxydant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin.
Carcinogenesis ; 21 ; 811-816.

Annexes

Annexes

Annexe A : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau).

Annexe B : Structure de quelques molécules identifiées dans les huiles essentielles de *Schinus molle*.

Annexe C : Rendement des extraits bruts exprimés en pourcentage.

Annexe D : Valeurs des densités optiques de la courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Annexe E : Teneurs en phénols totaux exprimées en mg équivalent acide gallique/g de la plante sèche.

Annexe F : Valeurs des densités optiques de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Annexe G : Teneurs en flavonoïdes exprimées en mg équivalent catéchine/g de la plante sèche.

Annexe H : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits flavonoïques de *Schinus molle*.

Annexe I : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits flavonoïques de *Pistacia vera*.

Annexe J : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide gallique.

Annexe K : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des huiles essentielles de *schinus molle*.

Annexe L : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.

Annexe M : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes.

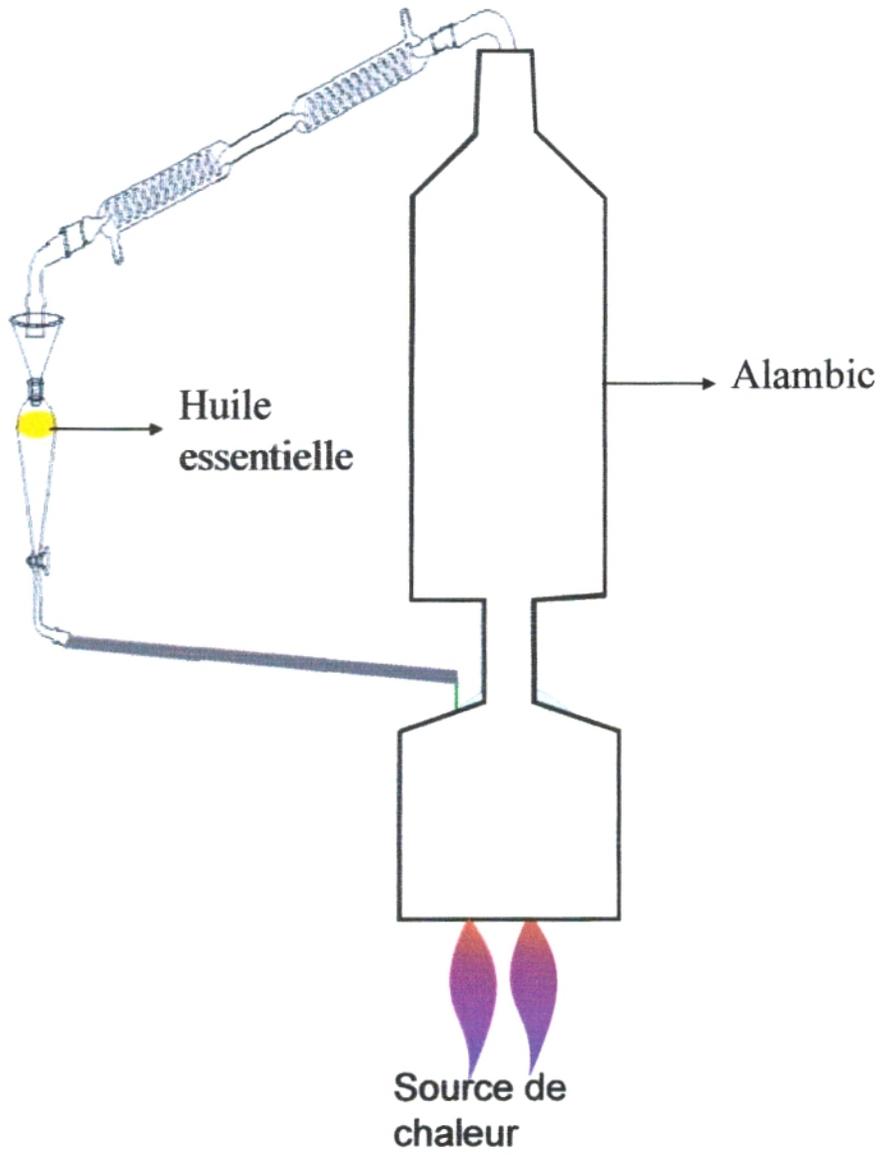
Annexe N : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'activité des huiles essentielles et des extraits bruts.

Annexe O : Pourcentage d'inhibition de l'amphotéricine B relatif aux différentes souches fongiques.

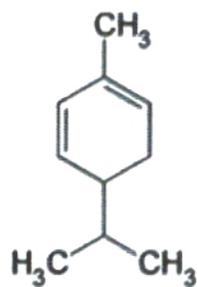
Annexe P : Diamètre (mm) des souches fongiques et pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *Schinus molle*.

Annexe Q : Milieux de culture.

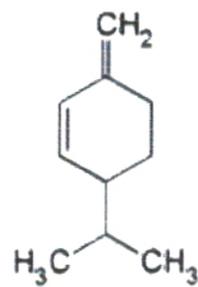
Annexe A : Appareillage d'extraction (entrainement à la vapeur d'eau).



Annexe B : Structure de quelques molécules identifiées dans les huiles essentielles de *Schinus molle*.



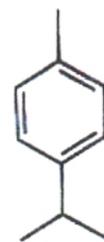
Alpha phellandrène



Béta phellandrène



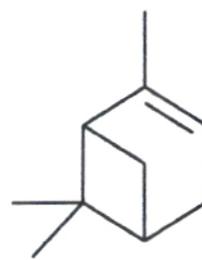
Myrcène



Para cymène



Limonène



Alpha pinène

Annexe C : Rendement des extraits bruts exprimés en pourcentage.

Plantes	Rendement en %
<i>Pistacia vera</i> feuilles	29,50
<i>Schinus molle</i> feuilles	15,50
<i>Schinus molle</i> fruits	26

Annexe D : Valeurs des densités optiques de la courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Concentrations finales acide gallique ($\mu\text{g/mL}$)	D.O			Moyennes
3,181	0,165	0,145	0,185	0,165
5,909	0,242	0,287	0,247	0,258
8,636	0,403	0,452	0,392	0,415
11,363	0,506	0,501	0,499	0,502
14,090	0,725	0,777	0,755	0,752
16,818	0,836	0,886	0,873	0,865
18,181	0,909	0,88	0,94	0,909

Annexe E : Teneurs en phénols totaux exprimées en mg équivalent acide gallique/g de la plante sèche.

Plantes	D.O _m	Concentration à partir de l'équation ($\mu\text{g/mL}$)	1 ^{er} facteur de dilution 1/22 ($\mu\text{g/mL}$)	2 ^{ème} facteur de dilution 1/50 ($\mu\text{g/mL}$)	[C] initiale de l'extrait brut (mg/mL)	[C] phénols (mg/g)
<i>Pistacia vera</i> feuilles	0,82	16,21	356,62	17831	590	30,22
<i>Schinus molle</i> feuilles	1,03	20,45	449,94	44994	310	145,14
<i>Schinus molle</i> fruits	0,8	16	352	17600	433,33	40,61

DO_m : moyenne de trois répétitions

Annexe F : Valeurs des densités optiques de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Concentrations finales catéchine ($\mu\text{g/mL}$)	Densités Optiques		Moyennes
4,637	0,075	0,104	0,090
9,274	0,180	0,192	0,186
13,911	0,259	0,269	0,264
18,548	0,408	0,408	0,408
23,185	0,480	0,507	0,493
27,822	0,611	0,653	0,632
32,459	0,702	0,774	0,738
37,096	0,911	0,956	0,933

Annexe G : Teneurs en flavonoïdes exprimées en mg équivalent catéchine/g de la plante sèche.

Plantes	D.O _m	[C] à partir de l'équation ($\mu\text{g/mL}$)	1 ^{er} facteur de dilution 46/496 ($\mu\text{g/mL}$)	2 ^{ème} facteur de dilution 1/92 ($\mu\text{g/mL}$)	[C] initiale de l'extrait brut (mg/mL)	[C] Flavonoïdes (mg/g)
<i>Pistacia vera</i> feuilles	0,14	8	86,26	7936	590	13,45
<i>Schinus molle</i> feuilles	0,65	28,7	309,46	28470,4	310	91,84
<i>Schinus molle</i> fruits	0,08	5,76	62,10	5713,92	433,33	13,18

Annexe H : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits flavonoïques de *Schinus molle*.

Plantes	Fraction	Concentration (mg/mL)	Moyenne de la densité optique	% d'inhibition
<i>Schinus molle</i> feuilles	Acétate d'éthyle	2,6	0,06	92,25
		2,25	0,12	85,59
		1,9	0,23	72,53
		1,73	0,36	64,21
		1,04	0,39	50,15
		0,52	0,52	37,91
	n-butanol	8	0,07	92,56
		6	0,30	70,73
		5	0,36	64,82
		4	0,39	62,82
		2	0,66	36,6
		1,6	0,69	33,55
		1	1,44	31,17
	<i>Schinus molle</i> fruits	Acétate d'éthyle	3,16	0,07
2,53			0,18	71,12
1,9			0,32	50,15
1,26			0,49	35,26
1,01			0,57	25,8
0,63			0,69	13,27
n-butanol		21,46	0,04	94,45
		18,4	0,13	84,66
		15,33	0,20	76,41
		12,26	0,29	65,56
		9,2	0,43	48,23
		4,9	0,61	27,71
		3,06	0,75	27,27

Annexe I : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits flavonoïques de *Pistacia vera*.

Plantes	Fraction	Concentration (mg/mL)	Moyenne de la densité optique	% d'inhibition
<i>Pistacia vera</i> feuilles	Acétate d'éthyle	0,86	0,06	94,35
		0,65	0,07	93,03
		0,53	0,30	70
		0,43	0,43	62,44
		0,32	0,52	52,32
		0,21	0,66	37,52
		0,1	0,80	24,67
		0,05	0,92	13,37
	n-butanol	1,4	0,07	92,45
		1,17	0,08	80,35
		0,88	0,19	64,01
		0,29	0,66	31,12
		0,14	0,72	25
		0,07	0,74	22

Annexe J : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide gallique.

	Concentration (mg/mL)	Moyenne de la densité optique	% d'inhibition
Acide ascorbique	0,1	0,04	95,89
	0,2	0,17	82,44
	0,3	0,33	65,70
	0,4	0,49	49,58
	0,5	0,54	43,94
	0,6	0,73	24,74

Annexe K : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des huiles essentielles de *Schinus molle*.

Plante	Partie étudiée	Concentration (mg/mL)	Moyenne de la densité optique	% d'inhibition
<i>Schinus molle</i>	Feuilles	856,00	0,24	70,92
		733,70	0,29	63,87
		611,42	0,32	57,31
		489,14	0,34	50,90
		366,85	0,45	42,23
		244,57	0,56	31,42
		122,28	0,63	23,34
		24,45	0,73	11,51
	Fruits	737,14	0,07	91,07
		614,28	0,12	84,68
		491,42	0,20	75,05
		368,57	0,30	63,02
		245,71	0,40	50,66
		122,85	0,56	32,2

Annexe L : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'acide ascorbique.

	Concentration (mg/mL 10 ⁻²)	Moyenne de la densité optique	% d'inhibition
Acide ascorbique	0,28	0,24	86,0
	0,27	0,27	78,2
	0,16	0,30	59,2
	0,10	0,40	45,0
	0,03	0,44	31,8

Annexe M : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes.

	Amc	Te	Sxt	Cl
<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	I	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i>	I	S	S	S
<i>Bacillus cereus</i>	R	S	R	S

Annexe N : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'activité des huiles essentielles et des extraits bruts.

Souches bactériennes	<i>Schinus molle</i> feuilles (HE)	<i>Schinus molle</i> fruits (HE)	<i>Schinus molle</i> feuilles (EB)	<i>Schinus molle</i> fruits (EB)	<i>Pistacia vera</i> feuilles (EB)	Témoins DMSO
<i>P. aeruginosa</i>	10,7	6,8	6,5	6,0	6,0	6,0
<i>E. faecalis</i>	12,8	17,0	7,0	8,0	7,0	6,0
<i>B. cereus</i>	7,7	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0
<i>E. coli</i>	15,5	12,0	8,5	9,0	7,0	6,0
<i>S. aureus</i>	8,3	10,0	6,5	6,0	6,0	6,0

Annexe O : Pourcentage d'inhibition de l'amphotéricine B relatif aux différentes souches fongiques.

	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. stolonifer</i>
Amphotéricine B	88,12	68,00	88,10	79,64

Annexe P : Diamètre (mm) des souches fongiques et pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *Schinus molle*.

	<i>Schinus molle</i> (feuilles)		<i>Schinus molle</i> (fruits)	
	100µL	150µL	100µL	150µL
<i>F. oxysporum</i>	20mm (71,42%)	18mm (74,28%)	28mm (60%)	20mm (71,42%)
<i>A. flavus</i>	46mm (22,42%)	36mm (39,29%)	40mm (32,54%)	34mm (42,66%)
<i>Penicillium spp</i>	10mm (73,91%)	8mm (78,26%)	11mm (71,73%)	9mm (78,26%)
<i>R. stolonifer</i>	75mm (6,25%)	70mm (12,5%)	76mm (5%)	72mm (10%)

Annexe Q : Milieux de culture**Préparation pour un litre****Bouillon nutritif (BN)**

Extrait de viande	5g
Peptone pancréatique	10g
Chlorure de sodium	5g
pH = 7,2 ± 0,2	

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH = 7,2 ± 0,2	

Mueller Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf	300mL
Hydrolysat de caseïne	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
pH = 7,4 ± 0,2	

Potatoes Dextrose Agar (PDA)

Filtrat de pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
pH = 6	