

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

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de Magister

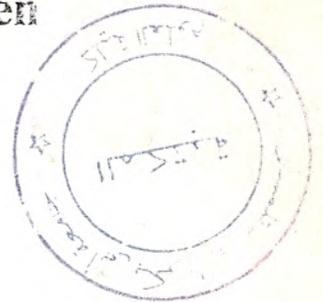
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER

Option : Substances naturelles, Activités biologiques et Synthèse.

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

Présenté par Mlle Nabila BENHAMMOU

Soutenue-le : 21 février 2006



Devant la commission d'examen formée de :

| | | |
|-----------------------|--|--------------|
| M. TALEB BENDIAB S.A, | Professeur à l'université de Tlemcen | Président |
| M. MOUSSAOUI A, | Maître de conférence à l'université de Tlemcen | Examinateur |
| M. BENMANSOUR A, | Maître de conférence à l'université de Tlemcen | Examinateur |
| Mme BELARBI M, | Maître de conférence à l'université de Tlemcen | Examinatrice |
| Mme ATIK BEKKARA F, | Maître de conférence à l'université de Tlemcen | Encadreur |

DEDICACE

A

mes parents ;

mes sœurs : Fatima et Rafika ;

mes frères : Mohammed, Omar, Ghouti et Abdelaziz ;

mes belles sœurs ; Nassira et Yamna ;

Pour leur présence de tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Je n'oublie jamais mes neveux : Samir, Mohammed , Mahdi et Boumediene et mes nièces Zineb et Imane.

NABILA

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé au département de biologie de la faculté des sciences, laboratoire de produits naturels, activités biologiques et synthèses plus particulièrement dans le laboratoire intitulé « étude des composés volatils (huiles essentielles) et les composés phénoliques (flavonoïdes)» sous la responsabilité de madame ATIK BEKKARA F.

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements vont en particulier à :

Mme ATIK BEKKARA F maître de conférence à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, guidée et encouragée scientifiquement tout au long de ce travail. Je la remercie vivement pour son soutien, ses conseils précieux et ses critiques qui m'ont aidés au sein du laboratoire et surtout à distance, ainsi que pour sa présence de tous les instants au téléphone.

M. TALEB BENDIAB S.A professeur à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen pour avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour son aide précieuse.

M. MOUSSAOUI A, maître de conférence à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen pour son aide matérielle, surtout sa grande disponibilité et pour avoir accepté de juger ce travail. J'ai apprécié son humeur toujours joyeuse qui égayait le laboratoire.

Mme BELARBIM, maître de conférence à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen, qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse, pour avoir mis à ma disposition son laboratoire et pour avoir accepté de juger ce travail.

M. BENMANSOUR A, maître de conférence à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre de jury. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

M CASANOVA J et l'équipe de chimie et biomasse de l'université de Corse pour leur aide qu'ils nous ont fournie en effectuant les analyses des huiles essentielles par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la spectroscopie de résonance magnétique du carbone 13 (RMNC¹³).

M. GUERMOUCHE H, professeur à l'université de BAB A ZOUAR pour m'avoir accueillie et accepté de réaliser les analyses des flavonoïdes par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans le laboratoire de chimie.

M. CHABANE SARI D, professeur à la faculté des sciences de l'université de Tlemcen pour son enrichissante critique et ses conseils pertinents. Je le remercie vivement avec mademoiselle SEBBAGH Nabahat pour m'avoir permis de réaliser toutes mes expériences de cette étude dans leur laboratoire, pour avoir animé tout le laboratoire de leur joie et de vivre et pour tous ces instants partagés.

M. BOUABDALLA H, pour m'avoir donnée les coordonnées géographiques de nos stations d'étude.

Mme BEKHECHI née BENHABIB Chahrazed pour m'avoir donnée des souches bactériennes testées.

M.BENKADA D, pour son aide et sa grande disponibilité.

Je remercie tous ceux que j'ai eu l'occasion de côtoyer au cours de ces deux années de magister, dans des sphères universitaires ou associatives mais avant tout amicales.

BELYAGOUBI Larbi pour sa sympathie chaleureuse. Je le remercie d'une façon indéfectible avec monsieur MOUSSAOUI A pour m'avoir donnée des souches de champignons.

GOUZI Hichem pour son aide technique et sa présence avec qui j'ai appris les bases de la manipulation en biochimie.

M. ZAOUI S et son étudiante Nassira pour leur aide matérielle.

Je ne voudrai pas oublier :

Wahiba et sa famille en particulier son père pour leur grande disponibilité dans notre première sortie à Ain Fezza et pour m'avoir orientée sur terrain.

Zohra et ses familles à Oum El Alou pour m'avoir accompagnée durant les sorties de cueillette de *Pistacia lentiscus*.

Asma pour m'avoir aidée dans l'identification des espèces végétales.

Mes collègues d'étude Houria, Wafaa, Sanaa, Mohammed pour m'avoir chacun à sa manière, orientée et aidée vers la voie magistrale.

J'adresse encore mes remerciements à tous les membres du laboratoire de produits naturels qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

ABREVIATIONS

α : alpha

p : para

min : minute

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CPG : chromatographie en phase gazeuse

RMN C¹³: spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone 13

CCM : chromatographie sur couche mince

HE : huile essentielle

DB : département de biologie

ufc/ml : unité formant colonie par millilitre

DO : densité optique

μ s : microseconde

mm : millimètre

DMBA : acide 2,4 diméthylbenzoïque.

CDCl₃ : chloroforme deutéré

HIV : le virus de l'immunodéficience humaine (Human immunodeficiency virus)

LDL : lipoprotéine de faible densité (Low Density Lipoprotein)

ARN : acide ribonucléique

UV-B : rayons ultra violet de 290 à 320 nm

TMS : tétraméthylsilane

RESUME

Dans le cadre de recherches sur les antibiotiques et les antioxydants naturels, il s'est révélé nécessaire de valoriser certains composés de métabolites secondaires chez les plantes médicinales.

Pour cela, la présente étude porte sur l'évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des flavonoïdes de trois plantes, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*, utilisées par une grande popularité en Algérie pour ses propriétés thérapeutiques.

L'extraction par hydrodistillation des feuilles de *Pistacia lentiscus* des deux stations (Oum El Alou et Ghazaouet) nous donne une teneur en huile essentielle ayant un rendement élevé de 0.0731% (station de Ghazaouet) par rapport à celle d'Oum El Alou qui est de l'ordre de 0.0187%. Tandis que l'entraînement à la vapeur d'eau, nous a révélé que la teneur en huile essentielle d'Oum El Alou est plus ou moins supérieure à celle de Ain Fezza, nous obtenons respectivement 0.076% et 0.055%.

L'analyse par CPG/RMN C¹³ des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, nous a séparé 15 composés dans la station de Ain Fezza et 16 composés dans la station d'Oum El Alou. La même analyse des huiles essentielles extraites par hydrodistillation, nous a permis de mettre en évidence 13 et 21 composés dans les deux stations de Ghazaouet et Oum El Alou respectivement. Nous obtenons ainsi 4 chimiotypes qui sont : α -pinène (41%), myrcène (33%), limonène (25,5%) et D-germacrène (13,1%).

En ce qui concerne *Pistacia atlantica*, la teneur en huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau est faible de l'ordre de 0,020%, nous avons identifié 27 composés dont le chimiotype est le β -caryophyllène (12,1%).

Pour *Inula viscosa*, le rendement est aussi faible, il est de l'ordre de 0,0195%.

La teneur en composés phénoliques est élevée chez la plante *Pistacia lentiscus* et est de l'ordre de 12,64% par rapport à *Pistacia atlantica* (8,11%) et à *Inula viscosa* (10,91%).

L'identification des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince nous a révélé deux acides phénoliques qui sont : l'acide gallique et l'acide p-coumarique dans les feuilles des espèces du genre *Pistacia*. Un flavonol qui est le myricétine reste présent dans les feuilles du *Pistacia lentiscus* et absent dans les feuilles de *Pistacia atlantica*. D'autres flavonoïdes comme la rutine, myricétine, résorcinol et pyrocatechol sont mis en évidence dans les feuilles d'*Inula viscosa*.

Les activités biologiques (antifongique et antibactérienne) des huiles essentielles des trois plantes étudiées sont plus actives que celles des extraits bruts des composés phénoliques.

Les huiles essentielles de nos plantes présentent une activité considérable du piégeage du radical DPPH^{*}. Alors que les extraits bruts des composés phénoliques possèdent un pouvoir de réduction de fer élevé, un piégeage des radicaux superoxydes plus ou moins faible et une forte inhibition du radical DPPH^{*}.

Mots clés : *Pistacia lentiscus* ; *Pistacia atlantica* ; *Inula viscosa* ; Huiles essentielles ; Chromatographie en phase gazeuse (CPG) ; Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN C¹³) ; Composés phénoliques ; Flavonoïdes ; Activité antimicrobienne ; Activité antioxydante.

SUMMARY

Within the framework of research on natural antibiotics and antioxidants, it appeared necessary to develop some secondary compounds of metabolites at the medicinal plants.

For that, the present study relates to the evaluation of the activities antimicrobial and antioxidant of the essential oils and the flavonoids of three plants, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* and *Inula viscosa*, used by a great popularity in Algeria for its therapeutic properties.

The extraction by hydrodistillation of the leaves of *Pistacia lentiscus* of the two stations (Oum El Alou and Ghazaouet) gives us a content of essential oil having a high output of 0.0731% (station of Ghazaouet) compared to that of Oum El Alou, which is about 0.0187%. While the steam distillation, reveals us that the content of essential oil of Oum El Alou is more or less higher than that of Ain Fezza, we obtain 0.076% and 0.055%, respectively.

The analysis by CPG/RMN C¹³ of the essential oils of *Pistacia lentiscus* obtained by steam distillation has separated us 15 compounds in the station from Ain Fezza and 16 compounds in the station of Oum El Alou). The same analysis of the essential oils extracted by hydrodistillation, has permitted us to make it possible to highlight 13 and 21 compounds in the two stations of Ghazaouet and Oum El Alou, respectively. Thus, we obtain 4 chimiotypes who are: α -pinene (41%), myrcene (33%), limonene (25,5%) and D-germacrene (13,1%).

With regard to *Pistacia atlantica*, the content of essential oil obtained by steam distillation is weak of about 0,020%; we have identified 27 compounds whose chimiotype is β -caryophyllene (12,1%).

For *Inula viscosa*, the output is also weak, it is about 0,0195%.

Thus, the content of phenolic compounds is high at the plant *Pistacia lentiscus* and is about 12,64% compared to *Pistacia atlantica* (8,11%) and *Inula viscosa* (10.91%).

The identification of the phenolic compounds by thin layer chromatography has revealed us two phenolic acids, which are: gallic acid and p-coumaric acid in the leaves of the species of the *Pistacia* kind. A flavonol, which is the myricetin, remains present in the leaves of *Pistacia lentiscus* and absent in the leaves of *Pistacia atlantica*. Other flavonoïds like rutin, myricetin, resorcinol and pyrocatechol are highlighted in the leaves of *Inula viscosa*.

The biological activities (antifungal and antibacterial) of essential oils of the three studied plants are more active than those of the crude extracts of the phenolic compounds.

Essential oils of our plants present a considerable DPPH[•] radical scavenging activity. Whereas, the crude extracts of the phenolic compounds have a high capacity of reducing power, a more or less weak scavenging of the superoxide free radicals and a strong inhibition of DPPH[•] radical.

Key words: *Pistacia lentiscus*; *Pistacia atlantica*; *Inula viscosa*; Essential oils; Gas chromatography (CPG); Spectroscopy of magnetic resonance nuclear of carbon 13 (NMR C¹³); Phenolic compounds; Flavonoïds; Antimicrobial activity; Antioxidant activity

الملخص

في إطار البحث حول المضادات الحيوية و مضادات التأكسد الطبيعية بدأ لنا من الضروري تقييم بعض المركبات الأيضية الثانوية المستخلصة من النباتات الطبية. ولهذا، الدراسة الحالية اهتمت بتقييم الأنشطة المضادة للمكروبات و المضادة للتأكسد للزيوت الطيارة و الفلافونويدات لثلاث نباتات *Inula viscosa*, *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* المستعملة على نطاق شعبي واسع في الجزائر نظرا لخصائصها العلاجية.

إن الزيوت الطيارة لأوراق *Pistacia lentiscus* المستخلصة بواسطة طريقة التقطير المائي لمنطقتي أم العلو و الغزوات أعطت مردود عالي بلغ 0.0731% لهذه الأخيرة مقارنة بـ 0.0187% في أم العلو. بينما استخلاص الزيوت الطيارة بطريقة بخار الماء أظهر لنا أن المردود لأم العلو يكون أعلى من مثيله لمنطقة عين فزة حيث قدر بـ 0.076% و 0.055% على الترتيب.

بتطبيق كل من طريقة التحليل الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية (CPG) و مطياف الرنين المغناطيسي النووي (^{13}C RMN) للزيوت الطيارة لأوراق *Pistacia lentiscus* المستخلصة بطريقة بخار الماء مكنا من الكشف على 15 مركبا لمنطقة عين فزة و 16 مركبا لمنطقة أم العلو. نفس التحليل للزيوت المستخلصة بطريقة التقطير المائي لمنطقتي الغزوات و أم العلو أعطى 13 و 21 مركبا على الترتيب و بهذا تحصلنا على 4 أنواع كيميائية (chimiotypes) حيث تذكر من بينهم: α -pinène (41%)، myrcène (33%)، D-germacrène (13,1%) و limonène (25,5%).

تحتوي *Pistacia atlantica* على مقدار ضعيف من الزيت الطيار حوالي 0.020% حيث المركب الرئيسي هو β -caryophyllène (12.1%). فيما يخص *Inula viscosa* فإن مردودها ضعيف و يقدر بـ 0.0195%.

تقدر نسبة المكونات الفينولية عند *Pistacia lentiscus* بـ 21.64% مقارنة مع

Pistacia atlantica (8.11%) و *Inula viscosa* (10.91%).

بين الكشف عن المركبات الفينولية بواسطة التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة وجود حمضين فينوليين و هما: حمض غاليك و حمض باراكوماريك في أوراق أنواع الجنس *Pistacia*. على عكس ذلك نجد الفلافونول (myricétine) في أوراق *Pistacia lentiscus* و انعدامه عند

Pistacia atlantica.

بعض الفلافونويدات مثل: pyrocatechol, réSORCINOL, myricétine, rutine وجدت

متمركزة في أوراق و أزهار *Inula viscosa*.

النشاطات البيولوجية (ضد الفطريات و ضد البكتيريا) للزيوت الطيارة عند النباتات المدروسة تكون أكثر فعالية مقارنة مع مستخلصاتهم الخامة للمركبات الفينولية. أما النشاطات المضادة للتأكسد بثبيت جذر DPPH[•] للزيوت الطيارة كانت معتبرة، بينما المستخلصات الخامة تملك قدرة قوية لتثبيط جذر DPPH[•] و إرجاع الحديد بالإضافة إلى تثبيط ضعيف لجذور سو بار أكسيد (O_2^{\bullet}).

الكلمات المفتاحية:

Inula viscosa ; *Pistacia atlantica* ; *Pistacia lentiscus* ; الزيوت الطيارة ; الكروماتوغرافي في المرحلة الغازية (CPG) ; مطياف الرنين المغناطيسي النووي (^{13}C RMN) ; المركبات الفينولية ; الفلافونويدات ; النشاط المضاد للمكروبات ; النشاط المضاد للتأكسد.

LISTES DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Taxonomie d' <i>Imula viscosa</i> (Quezel et Santa (1963)). | 6 |
| Tableau 2 : Taxonomie de <i>Pistacia atlantica</i> Desf et <i>Pistacia lentiscus</i> L. | 9 |
| Tableau 3: Sources alimentaires des flavonoïdes (Marfak .,2003). | 24 |
| Tableau 4 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun.,1997). | 29 |
| Tableau 5 : Situation géographique et bioclimat des différentes stations. | 31 |
| Tableau 6 : Origine des microorganismes testés | 40 |
| Tableau 7 : Les travaux antérieurs sur les rendements en huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Imula viscosa</i> . | 48 |
| Tableau 8 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> de Ain Fezza (A) et <i>Pistacia lentiscus</i> de Gazaouet (G), Ain Fezza (A) et Oum El Alou (OM). | 50 |
| Tableau 9 : Rendements et phénols totaux dans les extraits bruts. | 56 |
| Tableau 10 : Les composés phénoliques de la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol de <i>Pistacia lentiscus</i> (feuilles), <i>Pistacia atlantica</i> (feuilles) et <i>Imula viscosa</i> (feuilles + fleurs) (Système 1). | 59 |
| Tableau 11 : Les composés phénoliques de la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol de <i>Pistacia lentiscus</i> (feuilles), <i>Pistacia atlantica</i> (feuilles) et <i>Imula viscosa</i> (feuilles + fleurs) (Système2). | 61 |
| Tableau 12 : La CCM des témoins des composés phénoliques par le système1 (CMEA). | 63 |
| Tableau 13 : La CCM des témoins des composés phénoliques par le système2 (BAW). | 63 |
| Tableau 14 : Composés identifiés dans les deux systèmes. | 64 |
| Tableau 15 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'effet des huiles essentielles selon la méthode de Vincent | 66 |
| Tableau 16 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'effet des extraits bruts selon la méthode de Vincent. | 69 |
| Tableau 17 : Les indices antifongiques et les diamètres d'inhibition de la croissance des espèces fongiques par les huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Imula viscosa</i> . | 73 |
| Tableau 18 : Les indices antifongiques et les diamètres d'inhibition de la croissance des espèces fongiques par les extraits bruts des composés phénoliques de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Imula viscosa</i> . | 76 |
| Tableau 19 : Pouvoir réducteur en fonction des quantités d'extraits choisies | 82 |
| Tableau 20 : Estimation des paramètres du modèle de Wallach (1996). | 86 |
| Tableau 21 : Activité antioxydante des extraits bruts des composés phénoliques de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Imula viscosa</i> . | 88 |
| Tableau 22 : Comportements cinétiques des extraits bruts et les contrôles. | 95 |
| Tableau 23 : Détermination des concentrations EC ₅₀ et la classification de leurs cinétiques. | 96 |
| Tableau 24 : Efficacités antiradicalaires des extraits bruts des composés phénoliques (<i>P.lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Imula viscosa</i>)et les contrôles (Acide ascorbique et trolox). | 101 |
| Tableau 25 : Résultats de l'essai de l'activité antioxydante. | 104 |
| Tableau 26 : Valeurs de piégeage le radical DPPH [•] exprimées en pourcentage de neutralisation par les huiles essentielles de <i>P.atlantica</i> , <i>P.lentiscus</i> et <i>I.viscosa</i> en fonction des concentrations (g/ml). | 105 |
| Tableau 27 : Valeurs de piégeage le radical DPPH [•] exprimées en en pourcentage de neutralisation par les contrôles (Trolox et Acide ascorbique) en fonction de différents volumes (ml). | 106 |

LISTES DES PHOTOS

| | |
|--|----|
| Photo 1 : <i>Inula viscosa</i> (L) Ait..... | 5 |
| Photo 2: <i>Pistacia atlantica</i> Desf..... | 7 |
| Photo 3: <i>Pistacia lentiscus</i> L..... | 8 |
| Photo 4: Antibio-aromatogramme : <i>Staphylococcus aureus</i> (ST ₁) : EB de <i>Pistacia atlantica</i> / Méthanol ; 5µl..... | 70 |
| Photo 5: Antibio-aromatogramme: <i>Staphylococcus aureus</i> (ST ₁): EB d' <i>Inula viscosa</i> / EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ; 5µl..... | 70 |
| Photo 6: Antibioaromatogramme : <i>Staphylococcus aureus</i> (ST ₁) : EB de <i>Pistacia lentiscus</i> / Méthanol ; 10µl..... | 70 |
| Photo 7: Antibioaromatogramme : <i>Staphylococcus aureus</i> (ST ₁) : EB d' <i>Inula viscosa</i> / EB de <i>Pistacia atlantica</i> ; 10µl..... | 70 |
| Photo 8: Antibioaromatogramme : <i>Candida albicans</i> : EB de <i>Pistacia atlantica</i> / Méthanol ; 5µl..... | 70 |
| Photo 9: Antibioaromatogramme : <i>Candida albicans</i> : EB d' <i>Inula viscosa</i> / EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ; 5µl..... | 70 |
| Photo 10: Antibioaromatogramme : <i>Candida albicans</i> : EB de <i>Pistacia lentiscus</i> / Methanol; 10µl..... | 70 |
| Photo 11: Antibioaromatogramme : <i>Candida albicans</i> : EB de <i>Inula viscosa</i> / EB de <i>Pistacia atlantica</i> ; 10µl..... | 70 |
| Photo 12: Antibioaromatogramme : <i>Enterobacter cloacea</i> (En) : Méthanol / EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ; 10µl..... | 70 |
| Photo 13: Antibioaromatogramme : <i>Enterobacter cloacea</i> (En) : EB de <i>Pistacia atlantica</i> / EB d' <i>Inula viscosa</i> ; 10µl..... | 70 |
| Photo 14: Antibioaromatogramme : <i>Salmonella typhi</i> (SL): EB de <i>Pistacia atlantica</i> / Méthanol ; 5µl..... | 70 |
| Photo 15: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : Contrôle sans l'huile essentielle (HE)..... | 74 |
| Photo 16: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : HE de <i>Pistacia lentiscus</i> d'Oum El Alou ; 100µl..... | 74 |
| Photo 17: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : HE de <i>Pistacia lentiscus</i> de Ain Fezza ; 100µl..... | 74 |
| Photo 18: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : HE de <i>Pistacia lentiscus</i> de Ghazaouet ; 100µl..... | 74 |
| Photo 19: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus): Contrôle sans l'huile essentielle (HE)..... | 74 |
| Photo 20: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus): HE de <i>Pistacia lentiscus</i> de Ghazaouet ; 100µl..... | 74 |
| Photo 21: Antifongigramme : <i>Aspergillus flavus</i> (AF) : Méthanol ; 500µl..... | 77 |
| Photo 22: Antifongigramme : <i>Aspergillus flavus</i> (AF) : Extrait brut (EB) d' <i>Inula viscosa</i> ; 500µl..... | 77 |
| Photo 23: Antifongigramme : <i>Rhizopus stolonifer</i> (O ₁) : Méthanol ; 500µl..... | 77 |
| Photo 24: Antifongigramme : <i>Rhizopus stolonifer</i> (O ₁) : EB d' <i>Inula viscosa</i> ; 500µl..... | 77 |
| Photo 25: Antifongigramme : <i>Aspergillus flavus</i> de référence (AF _R) : Méthanol ; 50µl..... | 77 |
| Photo 26: Antifongigramme : <i>Aspergillus flavus</i> de référence (AF _R) : EB d' <i>Inula viscosa</i> ; 50µl..... | 77 |
| Photo 27: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : Méthanol ; 500µl..... | 77 |
| Photo 28: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : EB d' <i>Inula viscosa</i> ; 500µl..... | 77 |
| Photo 29: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus) : Méthanol ; 1ml..... | 78 |
| Photo 30: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus) : EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ; 1ml..... | 78 |
| Photo 31: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus) : EB de <i>Pistacia atlantica</i> ; 1ml..... | 78 |
| Photo 32: Antifongigramme : <i>Fusarium sp</i> (Fus) : EB d' <i>Inula viscosa</i> ; 1ml..... | 78 |
| Photo 33: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : Méthanol ; 500µl..... | 78 |
| Photo 34: Antifongigramme : <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) : EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ; 500µl..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29 : Antibioaromatogramme : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition des différentes souches à Gram (+), Gram (-) et <i>Candida albicans</i> par l'effet des extraits bruts des composés phénoliques de : <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Inula viscosa</i> | 71 |
| Figure 30 : Antifongigramme : les taux d'inhibition de la croissance fongique par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> | 75 |
| Figure 31 : Antifongigramme : les taux d'inhibition de la croissance fongique par les huiles essentielles d' <i>Inula viscosa</i> et <i>Pistacia atlantica</i> | 75 |
| Figure 32 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut de <i>Pistacia lentiscus</i> | 79 |
| Figure 33 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut de <i>Pistacia atlantica</i> | 79 |
| Figure 34 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut d' <i>Inula viscosa</i> | 79 |
| Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques du <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Inula viscosa</i> | 83 |
| Figure 36 : Réduction de fer par les extraits éthanoliques de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Inula viscosa</i> | 83 |
| Figure 37 : Cinétiques de piégeage les anions superoxydes obtenues par l'inhibition de l'oxydation du pyrogallol par l'effet des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Inula viscosa</i> | 85 |
| Figure 38 : Mécanisme de l'autoxydation du pyrogallol (Henry et al., 1989)..... | 87 |
| Figure 39 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps de l'extrait d' <i>Inula viscosa</i> | 88 |
| Figure 40 : Courbe d'étalonnage du radical DPPH [•] | 89 |
| Figure 41 : Fraction résiduelle du DPPH [•] en fonction du temps de l'extrait brut d' <i>Inula viscosa</i> | 90 |
| Figure 42 : Fraction résiduelle du DPPH [•] en fonction du temps de l'extrait brut de <i>Pistacia lentiscus</i> | 91 |
| Figure 43 : Fraction résiduelle du DPPH [•] en fonction du temps de l'extrait brut de <i>Pistacia atlantica</i> | 92 |
| Figure 44 : Fraction résiduelle du DPPH [•] en fonction du temps de trolox..... | 93 |
| Figure 45 : Fraction résiduelle du DPPH [•] en fonction du temps de l'acide ascorbique..... | 94 |
| Figure 46 : Fractions résiduelles du DPPH [•] (DPPH [•] _{res}) à la phase stationnaire en fonction des concentrations des échantillons (mg d'antioxydant/g DPPH [•])..... | 98 |
| Figure 47 : Détermination du temps nécessaire à aboutir à la phase stationnaire de la concentration EC ₅₀ | 100 |
| Figure 48 : Piégeage du radical libre DPPH [•] par le flavonoïde (Amié et al., 2003)..... | 103 |
| Figure 49 : Composés phénoliques responsables de l'action du piégeage du radical DPPH [•] | 105 |
| Figure 50 : Détermination de la concentration de neutralisation à 50% par la régression linéaire de RSC en fonction des quantités des huiles essentielles et les contrôles (RSC=f(C))..... | 107 |

S o m m a i r e

SOMMAIRE

| | |
|--------------------|---|
| INTRODUCTION | 1 |
|--------------------|---|

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LES ESPECES VEGETALES

| | |
|--|---|
| 1-Présentation des espèces végétales | 5 |
| 1.1- <i>Imula viscosa L</i> | 5 |
| 1.2-les espèces de pistachier : <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Pistacia lentiscus</i> | 7 |

CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES

| | |
|---|----|
| 1-Définition | 11 |
| 2-Localisation et répartition | 11 |
| 3- Fonction | 11 |
| 4-Méthodes d'extraction | 11 |
| 5-Conservation..... | 12 |
| 6-Composition chimique..... | 12 |
| 7-Facteurs de variabilité des huiles essentielles | 13 |
| 8-Biosynthese des huiles essentielles..... | 14 |
| 9-Activites biologiques..... | 14 |
| 10-Pouvoir antioxydant des huiles essentielles | 15 |

CHAPITRE 3 : LES FLAVONOÏDES

| | |
|---|----|
| 1-Introduction | 17 |
| 2-Structure chimique et classification | 17 |
| 3-Biosynthese des flavonoïdes..... | 18 |
| 4-Description de quelques classes des flavonoïdes | 21 |
| 5-Distribution et localisation | 24 |
| 6-Proprietes des flavonoïdes | 25 |
| 7-Flavonoïdes comme produits antioxydants..... | 26 |
| 8-Relation structure-activité antioxydante..... | 27 |
| 9- Activités biologiques des flavonoïdes | 28 |

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : Les huiles essentielles

| | |
|----------------------------|----|
| 1-Matériels végétaux | 31 |
|----------------------------|----|

CHAPITRE 2: Analyse des huiles essentielles par le couplage CPG/RMN C¹³

| | |
|---|----|
| 1-Principe de la technique | 35 |
| 2-Condition opératoire | 35 |
| 2.1-Analyse par RMN C ¹³ | 35 |
| 2.2-Analyse par CPG..... | 36 |

CHAPITRE 3 : Les flavonoïdes

| | |
|--|----|
| 1-Matériel végétal | 37 |
| 2-Préparation des extraits bruts | 37 |
| 3-Calcul le rendement massique des extraits bruts | 37 |
| 4-Méthodes d'analyse des composés phénoliques | 37 |
| 5-Préparation des extraits fractionnés par éthanol | 38 |
| 6-Préparation des extraits fractionnés par méthanol..... | 38 |
| 7-Analyse structurale | 39 |

CHAPITRE 4

Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de :*Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, *Inula viscosa*

| | |
|--|----|
| 1-les huiles essentielles et les extraits bruts des composés phénoliques | 40 |
| 2-les souches microbiennes | 40 |
| 3-Activités antimicrobienne et antifongique..... | 41 |

CHAPITRE 5

Etude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de :*Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, *Inula viscosa*

| | |
|---|----|
| 1-Les extraits bruts des composés phénoliques | 42 |
| 1.1-Reduction de fer | 42 |
| 1.2-Piègeage des anions superoxydes | 42 |
| 1.3-Piègeage du radical libre DPPH* | 43 |
| 1.4-Piègeage du radical DPPH* par les composés phénoliques en utilisant CCM.. | 44 |
| 2-Les huiles essentielles..... | 44 |
| Piègeage du radical libre DPPH* | 44 |
| 3. Etude statistique | 45 |

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 1 : Rendements en huiles essentielles

1-Les rendements en huiles essentielles obtenus par hydrodistillation

| | |
|---|----|
| des différentes stations | 46 |
| 2-Les rendements en huiles essentielles obtenus par entraînement à la vapeur d'eau des différentes stations | 46 |

CHAPITRE 2 : Analyse des huiles essentielles des plantes *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* par CPG/RMN C¹³

| | |
|---|----|
| 1-Identification des constituants des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Pistacia atlantica</i> | 49 |
| 2-Determination des races chimiques | 51 |

CHAPITRE 3

| | |
|---|----|
| 1-Teneurs en phénols totaux des 3 espèces végétales : <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Inula viscosa</i> | 56 |
| 2-Analyse qualitative des composés phénoliques | 58 |

CHAPITRE 4

Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de :*Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*

| | |
|---|----|
| 1-Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques des 3 plantes | 66 |
| 2-Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques des 3 plantes | 73 |

CHAPITRE 5

Pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de :*Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*

| | |
|---|-----|
| 1-Les extraits bruts des composés phénoliques | 82 |
| 1.1-Réduction de fer | 82 |
| 1.2-Piégeage des anions superoxydes | 84 |
| 1.3-Piégeage du radical libre DPPH* (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) | 87 |
| 1.4- Piégeage du radical libre DPPH* par les composés phénoliques en utilisant la CCM | 104 |
| 2-Les huiles essentielles | 105 |
| Piégeage du radical libre DPPH* (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) | 105 |

| | |
|---------------------------|-----|
| CONCLUSION GENERALE | 109 |
|---------------------------|-----|

| | |
|-----------------------------------|-----|
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 112 |
|-----------------------------------|-----|

ANNEXE

Introduction générale

Abu Zarga et al., 1998; Abu Zarga et al., 2002) ont décrit la présence en plus de 14 composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Inula viscosa* de la région jordanienne. 6 nouveaux sesquiterpéniques de type eudesmane qui sont l'acide 3 β -hydroxyilicique, l'acide 3 α -hydroxy-epi-illicique, l'acide 2 α -hydroxyilicique, l'acide 9 β -hydroxy-2-oxoisocostique, l'acide 1 β -hydroxyilicique et l'acide 2 β -hydroxyilicique.

Les espèces du genre *Pistacia* sont utilisées depuis longtemps dans un intérêt économique pour préparer le chewing gum. La substance responsable est une substance visqueuse qui est la résine. *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* font l'objet aussi de notre travail pour deux raisons principales :

- Se sont des plantes souvent utilisées par la population locale ;
- Elles possèdent des activités antioxydante et antimicrobienne.

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* présente divers chimiotypes, nous citons par exemple le chimiotype α -pinène (**Daferea et al., 2002; Wyllie et al., 1990; Castola et al., 2000 in Delazar et al., 2004**), le car-3-ène (**De Pooter et Schapm, 1991**) et le terpinèn-4-ol (**Duru et al., 2003**).

Cependant, d'après nos connaissances, une seule étude récente sur l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia atlantica* a été réalisée par **Barrero et al (2005)**. Ces auteurs ont trouvé que les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés (41%) sont prédominants.

Les composés phénoliques également dénommés les polyphénols sont des molécules spécifiques du règne végétal. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre...).

A l'heure actuelle, plus de 8000 composés naturels ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent dans différentes familles : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols et xanthones. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone, 1993 in Mompon et al., 1996**).

La famille Anacardiacee où appartient les deux espèces du genre *Pistacia*, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* est caractérisée par l'existence des dérivés de myricétine et l'acide gallique (**Umadevi et al., 1988 in Romani et al., 2002**).

Oksus (1977) a mis en évidence pour la première fois trois composés flavoniques dans les fleurs d'*Inula viscosa* qui sont 3-méthoxyquercétine-7-glucoside, 3-méthoxyquercétine et quercétine-3-méthoxyquercétine-7-glucoside.

Costa et al (2003) ont identifié par HPLC, 4 composés nommés hésperétine, naringénine, naringine et quercétine contenant dans le pool flavonique d'*Inula viscosa*.

Les flavonoïdes sont largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, notamment dans les fruits et les légumes. Ils sont également présents dans le vin rouge et le thé. Les céréales, les épices et les herbes aromatiques (persil, thym, céleri) sont considérés aussi comme des sources importantes de flavonoïdes. 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, 1993 in Marfak, 2003). Ces effets sont attribués, en partie, aux concentrations relativement importantes des flavonoïdes présents dans ces aliments.

Les flavonoïdes sont également reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités anti-allergiques, antivirales (Van Hoof, 1984 in Marfak, 2003) et anti-inflammatoires (Brasseur, 1989 in Marfak, 2003). Ces activités sont en général attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélateur les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux.

La réactivité des flavonoïdes avec les espèces réactives de l'oxygène (hydroxyle et superoxyde) a fait l'objet de nombreuses études (Jovanovic, 1994 ; Cotellet, 1996 ; Rice-Evans, 1996 ; Cos, 1998 ; Pietta, 2000 in Marfak, 2003).

Dans ce contexte, notre travail a donc pour objectif d'étudier les activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des flavonoïdes de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen qui sont utilisées pour ses vertus thérapeutiques. Ainsi, cette étude est divisée en deux parties :

Dans la première partie de notre étude, nous rappelons brièvement la description des espèces végétales. Le chapitre 1 porte sur la plante *Inula viscosa* et les plantes du genre *Pistacia* : *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*.

Le chapitre 2 sera consacré aux huiles essentielles, aux méthodes d'extraction, à la biosynthèse et aux activités biologiques.

Dans le chapitre 3, nous abordons l'étude des flavonoïdes, une description générale de différentes classes, leur biosynthèse et leurs activités biologiques et antioxydantes.

Dans la deuxième partie, nous cherchons à réaliser le volet expérimental qui se déroule en deux axes principaux bien séparés.

➤ Le premier axe concernant **les huiles essentielles** est subdivisé en 3 parties suivantes :

Dans la première partie, nous avons envisagé d'effectuer une étude phytochimique dont les étapes sont les suivantes :

- ✓ Obtention des huiles essentielles des 3 espèces de différentes stations ;
- ✓ Détermination des rendements en huiles essentielles ;
- ✓ Analyse des huiles essentielles par le couplage CPG/RMN C¹³.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés au pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de ces espèces végétales.

Dans la troisième partie, nous avons évalué l'activité antioxydante de ces huiles essentielles par la méthode du piégeage du radical libre DPPH*.

➤ Le deuxième axe concernant les **flavonoïdes** regroupe une série des étapes disposées en 3 parties :

Dans la première partie, un essai d'identification du pool flavonique dans les fractions acétates et butyliques de ces 3 plantes a été établi dont les étapes sont les suivantes :

- ✓ Préparation des extraits bruts ;
- ✓ Détermination des rendements des extraits bruts ;
- ✓ Dosage des phénols totaux ;
- ✓ Préparation des extraits fractionnés (n-butanol et l'acétate d'éthyle) par l'éthanol et méthanol ;
- ✓ Analyse structurale des différentes fractions par CCM.

Dans la deuxième partie nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des extraits bruts des composés phénoliques.

La troisième consiste en une étude de l'activité antioxydante se rapportant à :

- ✓ Réduction de fer ;
- ✓ Piégeage des anions superoxydes ;
- ✓ Piégeage du radical libre DPPH^{*} ;
- ✓ Piégeage du radical libre DPPH^{*} par les composés phénolique en utilisant la CCM.

Chapitre 1

LES ESPECES VEGETALES

« La plante joue un rôle d'un agent curatif et de thérapeutique en préservant la santé humaine contre les maladies et l'affaiblissement depuis le début de la vie de l'homme sur la terre ».

Kawsar Uddin et al., 2003

CHAPITRE 1 : LES ESPECES VEGETALES

1-PRESENTATION DES ESPECES VEGETALES :

1.1-*Inula viscosa* (L) Ait :

1.1.1-Description botanique :

Inula viscosa (L) Ait synonyme de *Cupularia viscosa* ou *Dittrichia viscosa* (L) Greuter (Abu Zarga et al., 1998 ; Abu Zarga et al., 2002).

Le nom vulgaire « inule visqueuse » noté « amagramane » ou « Mersitt » est une plante annuelle, herbacée, vivace, visqueuse et glanduleuse, à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées (Composées).

Elle peut atteindre de 50 cm à 1m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreux au sommet de la tige. Cette dernière est frutescente à la base et de 40-100 cm. Les feuilles sont entières ou dentées, aiguës, sinuées ; les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées, les capitules assez gros en longues grappes pyramidales, les ligules dépassent assez longuement l'involucre à folioles extérieures scarieuses (Quezel et Santa, 1963) (Photo 1).

Cette plante fleurit abondamment en septembre et octobre formant de petits buissons dans les endroits incultes et pierreux.



Photo 1 : *Inula viscosa* (L) Ait^{*}

^{*}<http://www.plantencyclo.com>

1.1.2- Habitat :

C'est une plante largement répandue dans le nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen. les rocailles, garrigues, terrains argileux un peu humide et les bords des routes (Benayache et al., 1991).

1.1.3-Systématique du genre *Inula* :

La clé de détermination botanique de l'espèce *Inula viscosa* est donnée par le tableau 1.

Tableau 1 : Taxonomie d'*Inula viscosa* (Quezel et Santa, 1963).

| Taxonomie | Espèce |
|--------------------|---|
| Règne | VEGETALE |
| Sous règne | TRACHEOBIONTA ou PLANTES VASCULAIRES |
| Embranchement | MAGNOLIOPHYTA ou SPERMATOPHYTES |
| Sous embranchement | ANGIOSPERMES |
| Classe | MAGNOLIOPSIDA ou DICOTYLEDONES (GAMOPETALES TETRACYCLIQUES INFEROVARIÉES) |
| Sous classe | ASTERIDAE |
| Ordre | ASTERALES (SYNANTHEREES) |
| Famille | ASTERACEES (COMPOSEES, SYNANTHERACEES) |
| Genre | <i>Inula</i> L |
| Espèce | <i>Inula viscosa</i> (L) Ait |

1.1.4-Usage thérapeutique :

Les effets thérapeutiques de cette plante sont très diversifiés et connus depuis longtemps dans les médications traditionnelles (Susplugas et al., 1980 in Cafarchia et al., 2002) .

Dans la région méditerranéenne, elle est utilisée pour ses activités : anti-inflammatoires (Barbetti et al., 1985 in Al-Dissi et al., 2001), antidiabétiques (Yaniv et al., 1987 in Al-Dissi et al., 2001), antipyrétiques, antiseptiques (Lauro et Rolih, 1990 in Al-Dissi et al., 2001).

En Espagne, *I.viscosa* est utilisé pour traiter les troubles gastroduodénaux (Lastra et al., 1993 in Al-Dissi et al., 2001).

En Jordanie, la médecine traditionnelle a imputé plusieurs usages d'*I.viscosa* : anthelmintique, expectorant, diurétique, traitement de la bronchite, tuberculose, anémie et comme un cataplasme pour les maux rhumatismaux (Al-Dissi et al., 2001).

En ajoutant, elle est prescrite comme un agent promoteur dans l'induction de l'avortement et la stérilité des femelles des rats (Karim et Quraan, 1986 ; Karim et al., 1990 ; Al Khalil et al., 1992 in Al-Dissi et al., 2001).

Il a été reporté par Font Quer (1973), un effet antijaunisse et un agent antiseptique puissant des blessures (Font Quer, 1973 in Costa et al., 2003).

Un effet antiulcérogénique a été attribué à la composition flavonique d'*Inula viscosa* (Alarcon De La Lastra et al., 1993 in Costa et al., 2003) .

L'extrait flavononique et l'huile essentielle d'*Inula viscosa* montrent une activité antifongique contre les dermatophytes et *Candida spp* (Cafarchia et al., 2002).

1.2-les espèces de pistachier : *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* :

Pistacia L est un genre qui appartient à la famille Anacardiacee ou Pistaciacee (Delazar et al., 2004). Il comprend 11 espèces qui sont des plantes dioïques dont la majorité est connue pour leur capacité à produire les oléorésines (Zohary, 1952 in Onay, 2000).

1.2.1-Pistacia atlantica Desf:

1.2.1.1-Description botanique :

Le pistachier de l'Atlas (ou *Pistacia atlantica* Desf) ; elbetoum; botma; betouma ou btouma en arabe local et Iggh en berbère, est un bel arbre à odeur simplement résineuse (Belhadj, 2001 ; Quezel et Santa, 1963) (Photo 2).

Les feuilles sont caduques, composées, imparipennées ; 3 à 5 folioles ovales acuminées.

Les fruits sont appelés Elkhodiri par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur vert foncé à maturité. Ce sont des drupes comestibles de la grosseur d'un pois, légèrement ovales et aplaties, riches en huile dense très énergétique. Ils sont récoltés en septembre-octobre.

L'écorce produit une résine-mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud (Belhadj, 2001).

La floraison a lieu en été en panicule de petites fleurs apétales (1 à 3) et 1 à 5 sépales.

Elle peut atteindre 15 à 20 m de la hauteur dont la croissance est lente et ne produit qu'à partir de 5 à 7 ans (Ozbek, 1978 in Atli et al., 2001).



Photo 2: *Pistacia atlantica* Desf *

* <http://www.plantencyclo.com>

1.2.1.2-Habitat :

Le pistachier de l'Atlas est originaire d'Asie centrale. Il est présent en Turquie 7000 avant JC et en Italie dès le premier siècle après JC.

Par la suite, sa culture s'est étendue aux autres pays méditerranéens. Elle est introduite aux USA en 1854. Il existe à l'état disséminé dans toute l'Algérie : régions semi-arides et arides, dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaad), Laghouat (partie sud) et Ghardaia (dans l'oued m'zab) (Monjauze, 1980 ; Seigne, 1985 in Belhadj, 2001) .

Aussi, il préfère les rocailles, pâturages arides, sauf dans les zones très arrosées (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2- Pistacia lentiscus L:

1.2.2.1-Description botanique :

Le lentisque ou pistachier lentisque ou arbre à mastic (*Pistacia lentiscus* L) ; « Derou », « Tadist » en arabe locale est en général un arbuste de 1 à 8 m de hauteur (Iauk et al., 1996).

Il se distingue des autres pistachiers par :

- Son feuillage persistant ;
- Les feuilles, composées, sont paripennées, autrement dit elles se terminent par une paire de folioles, tandis que celles des autres pistachiers se terminent par une seule foliole, elles sont caduques en hiver vert pale, plus grandes en général;
- Le rachis portant les folioles est ailé (Photo 3).

Les folioles, assez étroites et coriaces, sont ovales à elliptiques, terminées par une petite pointe. Leur nombre varie de 2 à 12.

Les fleurs sont apétales. Les males ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres, les femelles, à 3 ou 4 sépales ont un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates.

Le fruit est une petite drupe arrondie d'environ 5mm. D'abord rouge, elle devient ensuite noire, la graine est identique aux pistachiers, mais beaucoup trop petite pour être consommée. L'inflorescences en grappes composées lâches, aussi longues que les feuilles et la floraison a lieu pendant le mois mars à mai (Quezel et Santa., 1963).



Photo 3 : *Pistacia lentiscus* L⁺

⁺<http://www.plantencyclo.com>

1.2.2.2-Habitat :

On la rencontre dans les garrigues et surtout les maquis du bassin méditerranéen et les forêts (Quezel et Santa, 1963). Elle préfère les endroits pauvres en nutriments, en eau et aussi à une exposition longue des températures et des radiations solaires plus élevées (Margaris, 1981 in Baratto et al., 2003).

1.2.3-Systématique du genre *Pistacia* :

Les espèces *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L sont classées d'après Quezel et Santa (1963) comme suit :

Tableau 2 : Taxonomie de *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L.

| Taxonomie | Espèces |
|--------------------|---|
| Règne | VEGETALE |
| Sous règne | TRACHEOBIONTA -PLANTES VASCULAIRES |
| Embranchement | MAGNOLIOPHYTA ou SPERMATOPHYTES |
| Sous embranchement | ANGIOSPERMES |
| Classe | MAGNOLIOSIDA-DICOTYLEDONES - DIALYPETALES, DISCIFLORES |
| Sous classe | ROSIDAE |
| Ordre | SAPINDALES (RUTALES) |
| Famille | ANACARDIACEES- TEREBINTHACEES |
| Genre | <i>Pistacia</i> L |
| Espèces | <i>Pistacia atlantica</i> Desf <i>Pistacia lentiscus</i> L |

1.2.3-Usages thérapeutiques :

Les espèces du genre *Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique. Les qualités thérapeutiques de ces deux espèces sont connues depuis l'antiquité où les anciens égyptiens ont utilisé le mastic du *P.lentiscus* pour l'embaumement (Uphof,1959 in De Pooter et Schamp, 1991).

P.lentiscus et *P. atlantica* sont considérés comme deux espèces principales de la production d'oléorésine (Papageorgiou et al., 1997 in Delazar et al., 2004).

Cette résine est utilisée comme antiseptique du système respiratoire (Baytop, 1999 ; Tuzlaci et al., 2001 in Duru, 2003).

Elle possède une activité anti-*Helicobacter pylori* et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcère de l'estomac (Al-Said et al., 1986 ; Vandenabeele et al., 2000 in Delazar et al., 2004).

Il est aussi suggéré que l'epilupeol et l'epilupeol acétate trouvés dans la résine de ces espèces ont une activité antivirale contre certains virus dans l'embryon du poulet (Shasbi et al., 1994 in Kordali et al., 2003).

Une activité antidiabétique est notée pour la plante *P.atlantica*, (Williamson et al., 1996 in Hamdan et al., 2004). Cet effet montre une inhibition significative de α -amylase dans une étude réalisée sur des rats (Hamdan et al., 2004) .

L'écorce du *P.lentiscus* est largement utilisé contre l'hypertension dans certaines régions d'Espagne, les gents préparent la partie aérienne de la plante en décoction à 1% et prennent 150ml, une fois par jour à jeun (**Villar et al., 1987**).

La résine de cette plante possède des activités antioxydante et antimicrobienne (**Abdel et al., 1975 ; Magiatis et al.,1999 in Kordali et al., 2003**).

D'autres activités ont été soulignées : dans le traitement d'eczéma, diarrhées, jaunisse, l'asthme, antipyrétique et anti-inflammatoire (**Giner-Larza et al., 2002 ; Mouhajir et al., 2001 in Duru, 2003**).

1.2.4-Autres usages :

La résine, cette substance purement économique, est très utilisée depuis longtemps pour préparer le chewing gum en Iran (**Delazar et al., 2004**).

Elle entre dans la fabrication des dentifrices et des produits destinés au plombage (**Baytop, 1999 in Duru, 2003**).

L'huile essentielle d'oléorésine est aussi utilisée en parfumerie pour fabriquer les déodorants, en cosmétique et comme un agent de flaveur dans les préparations alimentaires (**Delazar et al., 2004**).

CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES

1-DEFINITION :

Lorsque vous pressez une écorce d'orange au-dessus d'une bougie, des centaines de petites étoiles s'allument sur la flamme, c'est de l'huile essentielle. C'est ce produit précieux qui parfume toute l'orange.

L'huile essentielle est le parfum des plantes aromatiques. Elle s'appelle aussi l'essence ou l'huile volatile qui est un produit de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (Bruneton, 1999).

2-LOCALISATION ET REPARTITION :

2000 espèces de plantes sont capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles avec une quantité appréciable. Ce nombre est réparti dans 60 familles. Les Rutaceae, les Lauraceae, les Myrtaceae, les Umbellifereae (Apiaceae), les Labiateae (Lamiaceae), les Compositeae (Asterales) et les Pinaceae sont particulièrement riches en huiles essentielles (Gerhard, 1993).

Dans le cas le plus simple, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules où, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophylle de nombreux pétales (Gerhard, 1993). D'autres structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles. Ces structures regroupent les poils et les canaux secteurs et les poches sécrétrices (Bruneton, 1999).

3- FONCTION :

Le rôle des terpénoides des huiles essentielles demeure le plus souvent obscur. Cependant, à l'appui des expérimentations, certains auteurs remarquent que certains d'entre eux ont un rôle écologique soit dans le domaine des interactions végétales (agent allélopathiques, notamment des inhibiteurs de germination) que dans celui des interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs de la plante (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs.

Pour quelques auteurs, ils pourraient constituer des supports à une « communication » et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de « messages biologiques » sélectifs (Bruneton, 1999).

4-MEHODES D'EXTRACTION :

L'extraction des huiles essentielles se fait par des procédés divers.

4.1-Par distillation à la vapeur d'eau :

4.1.1-Hydrodistillation :

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999).

4.1.2-Entrainement à la vapeur d'eau:

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. La vapeur pénètre les tissus de la plante et vaporise toutes les substances volatiles en éclatant les cellules (Belaïche, 1979).

4.1.3-Hydrodiffusion :

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (<0.1 Bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas (Buchbauer, 2000 in Lahlou, 2004).

4.2- AUTRES PROCÉDES :

➤ **Irradiation micro-onde** (microwave assisted process : MAP) est une technique récemment développée et reportée par plusieurs auteurs. Elle permet l'extraction des huiles essentielles d'une façon à obtenir un bon rendement et au cours d'un temps limité (Paré et al., 1989 ; Collin et al., 1991 ; Bouzid et al., 1997 ; Brosseau, 1997 in Lahlou, 2004).

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle (Bruneton, 1999). Le MAP utilise les micro-ondes pour exciter les molécules d'eau présentes dans les tissus de la plante en causant la rupture des cellules et la libération des huiles essentielles piégées (Belanger et al., 1991 in Lahlou, 2004). Cette technique est appliquée aussi pour l'extraction des saponines à partir de quelques plantes médicinales (Safir et al., 1998 in Lahlou, 2004).

5-CONSERVATION :

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses. Il convient de les éviter en utilisant des flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté antiactinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte). Le stockage se fait à l'abri de la chaleur et de la lumière (Bruneton, 1999).

6-COMPOSITION CHIMIQUE :

Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux grands groupes, les terpénoides d'une part et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

6.1-Dérivés terpéniques :

Les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée sont les mono- et sesquiterpènes qui sont des hydrocarbures avec une formule générale $(C_5H_8)_n$ (Svoboda et al., 1999).

- **Les monoterpènes (C₁₀)** sont issus du couplage de deux unités « isopréniques », ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α - et γ -terpinène, ρ -cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle.
- **Les sesquiterpènes (C₁₅)** dont les variations structurales sont de même nature que les monoterpènes, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents.

L'allongement de la chaîne farnésyl diphosphate (FPP) accroît le nombre des cyclisations possibles, d'où la très grande variété des structures connues (Bruneton, 1999). Il est estimé qu'il y a plus de 1000 structures des monoterpènes et 3000 sesquiterpènes (Svoboda et al., 1999).

6.2-Composés aromatiques :

Ces composés sont des dérivés du phénylpropane ; il s'agit des noyaux aromatiques couplés de chaînes de 3 carbones (C₆-C₃) donnant naissance à de nombreuses molécules chimiques voisines les unes les autres (Anton et Wichtel, 1999).

On trouve également dans les huiles essentielles des composés en C₆-C₁ comme la vanilline.

6.3-Composés d'origines diverses :

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles :

- Composés issus de la dégradation d'acides gras ;
- Composés issus de la dégradation des terpènes ;
- Composés azotés ou soufrés (Bruneton, 1999).

7-FACTEURS DE VARIABILITÉ DES HUILES ESSENTIELLES :

La variation de la qualité des huiles essentielles est une fonction linéaire et proportionnelle aux changements de chaque étape d'obtention des huiles essentielles dès la cueillette jusqu'à la conservation.

7.1-Origine botanique :

La composition varie selon l'espèce productrice (Bruneton, 1987)

7.2-Cycle végétatif :

La production des différents constituants d'une huile essentielle varie au long du développement (Bruneton, 1999).

7.3-Facteurs extrinsèques :

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles.

7.4-Influence de procédé d'obtention :

Vue leur labilité (HE), l'hydrodistillation, par exemple peut induire l'hydrolyse des esters en présence de l'eau et de la température (Bruneton, 1993).

Il faut aussi évoquer, chez certaines Lamiaceae, un stockage de 24 heures suffit pour induire des changements sensibles de composition (Bruneton, 1999).

7.5-facteurs génétiques :

7.5.1-Hybridations : sont à l'origine de l'hétérogénéité dans une population végétale.

7.5.2-Facteurs de mutation : l'apparition d'une nouvelle race chimique par mutation peut provoquer de profondes modifications dans la composition de l'huile essentielle.

7.6-Chimiotypes ou races chimiques :

D'une même espèce botanique peut fournir différentes huiles essentielles (Bruneton, 1999).

8-BIOSYNTHÈSE DES HUILES ESSENTIELLES :

Le point de départ de la synthèse des terpènes est l'isoprène C_5H_8 dont le précurseur est l'acétyl-CoA.

8.1-Biosynthèse de l'isopentényl :

Deux molécules d'acétyl-CoA donnent l'acéto-acétyl-CoA ; une troisième molécule ajoutée par condensation, fait apparaître la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA).

Ce dernier à son tour, par réduction enzymatique se transforme en mévalonate ou l'acide mévalonique (MVA) qui sera converti en isopentényl diphosphate (IPP) (Annexe 1).

8.2-Biosynthèse des terpènes :

L'intervention de l'isopentényl diphosphate- Δ -isomérase assure l'isomérisation d'une molécule d'isopentényl diphosphate en 3,3 diméthylallyl diphosphate (DMAPP) qui est l'amorce indispensable pour la biosynthèse des poly-isoprènes (Annexe 2, 3).

- Couplage tête-queue DMAPP+IPP libère le géranyl diphosphate (GPP), précurseur des monoterpènes (C_{10}).
- Couplage tête-queue GPP+IPP libère le farnésyl diphosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes (C_{15}).
- Couplage tête-queue FPP+IPP libère le géranylgéranyl-diphosphate (GGPP), précurseur des diterpènes (C_{20}).
- Couplage queue-queue du FPP par dimérisation libère les triterpènes (C_{30}).
- Couplage queue-queue de deux molécules GGPP libère les tétraterpènes (C_{40}).
- La formation des polyterpènes (caoutchouc) se traduit par l'addition n fois des unités en C_5 .

9-ACTIVITÉS BIOLOGIQUES :

Due aux microorganismes résistants à des antibiotiques, la recherche d'un nouveau médicament prototype pour combattre ces infections est absolument nécessaire. Plusieurs huiles essentielles offrent un espoir illimité et un grand potentiel à l'égard de ce problème.

En 1977, il est reporté que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés à nos jours sont des inhibiteurs des champignons et 30% des inhibiteurs des bactéries (Chaurasia et al., 1977 in Cowan, 1999).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les microorganismes est complexe et n'est pas clairement expliqué. Il dépend du caractère lipophile de ces substances terpéniques en provoquant l'interruption de la membrane (Cowan, 1999 ; Svoboda et al., 1999).

Ceci est confirmé par les travaux de Mendoza et ses collaborateurs qui ont trouvé que l'augmentation d'hydrophilicité du diterpénoïde « Kaurene » par l'addition du groupe méthyle réduit son activité antimicrobienne (Mendoza et al., 1997 in Cowan, 1999).

L'activité antivirale de l'huile essentielle de *Houttuynia cordata* est testée contre le virus d'influenza et HIV-1 (Hayashi et al., 1995 in Svoboda et al., 1999). L'acide betulinique montre aussi une inhibition vis-à-vis du HIV.

Il est suggéré que cette propriété peut être due à l'interférence avec l'enveloppe des virus (Svoboda et al., 1999).

Les huiles essentielles pures ou diluées dans un produit dispersant, pénètrent rapidement dans les tissus (20 minutes après une onction cutanée d'huile essentielle). L'analyse du sang montre sa présence dans la grande circulation, sans provoquer des phénomènes indésirables. Elles apportent à notre organisme, les concentrés de la nature les plus précieux pour rétablir ou conserver l'équilibre indispensable à notre santé.

Le capsaïcine a une large activité biologique chez l'homme, en affectant les systèmes nerveux, cardiovasculaires et digestifs (Virus et al., 1979 in Cowan, 1999), aussi il est utilisé comme analgésique (Cordell et al., 1993 in Cowan, 1999).

Les terpènes, cette famille biochimique montre des activités hormon-like et plus précisément cortison-like intéressantes dans les états inflammatoires prolongés. Ce sont d'excellents décongestionnants respiratoires et lymphatiques.

Les sesquiterpènes comme le germacrène et le chamazulène ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-allergiques puissantes.

10-POUVOIR ANTIOXYDANT DES HUILES ESSENTIELLES :

Les huiles essentielles comme antioxydants sont très recherchées en détail pour étudier leur rôle protecteur vis-à-vis des lipides insaturés dans les cellules animales (Deans et al., 1993 in Svoboda et al., 1999).

Elles montrent leurs actions comme des agents hépatoprotectives du vieillissement des mammifères. Dans le même contexte, Youdim et Deans (1999 a, b et 2000) in Lee et al (2004) ont trouvé que le régime à base d'huile essentielle de thym et son composé majoritaire maintient des concentrations élevées en acides poly-insaturés, en particulier les chaînes de C₂₀ et C₂₂ dans les fractions phospholipidiques du foie, le cerveau, le rein et le cœur.

En plus, les huiles essentielles possèdent des propriétés hypocholestérolémiantes en protégeant contre le cancer (Craig, 1999 in Lee et al., 2004). Cet effet est expliqué par l'inhibition de l'activité de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CO A) réductase qui est une enzyme hépatique régulateur de la synthèse du cholestérol (Crowell, 1999 in Lee et al., 2004).

Le bornéol, cinéol, citral, géraniol, menthone, menthol, fenchone, alcool fenchyl et α -ionone sont responsables à la suppression de l'activité hépatique de cette enzyme (Middleton et al., 1979 ; Clegg et al., 1980 ; Middleton et Hui, 1982 ; Fitch et al., 1989 ; Yu et al., 1994 in Lee et al., 2004).

Dans la médecine traditionnelle de Mali, la population locale utilise l'écorce d'un arbre, *Ptelopsis suberosa* pour traiter des ulcères gastriques (Cowan, 1999). Les recherches ont montré que les terpénoïdes préviennent la formation des ulcères et diminuent sa sévérité. Ces substances sont capables par leur fraction lipophile de réagir avec les parties lipidiques des membranes cellulaires en stabilisant la fluidité de la membrane par la diminution de sa perméabilité. Grâce à leur propriétés physico-chimiques et les configurations des molécules, elles peuvent influencer les enzymes, les transporteurs, les canaux ioniques et les récepteurs (Svoboda et al., 1999).

Il est suggéré que les huiles volatiles puissent jouer un rôle cytotatique pour les cellules tumorales. L'acide carnosique, carnosol, l'acide carsolique, rosmaridiphénol et l'acide rosmarinique sont doués de cette activité (Svoboda et al., 1999).

Grâce à son activité antioxydante, le thym, l'origan, le marjolaine, la menthe verte, la lavande et le basilic sont utilisés dans l'industrie alimentaire afin de stabiliser certaines denrées alimentaires (**Economou et al., 1991 in Lee et al., 2004**).

Il est reporté que α -cymène-2,3-diol (**Schwarz et al., 1996 in Lee et al., 2004**), thymol et carvacrol (**Aeschbach et al., 1994 ; Aruoma, 1997 ; Baratta et al., 1998 in Lee et al., 2004**) de thym possèdent des propriétés antioxydantes élevées. Cette puissance capacité est due à la présence des groupes phénoliques OH qui sont capables de donner l'hydrogène à des radicaux peroxyde durant le premier stade de l'oxydation des lipides.

Teissedre et Watrhouse (2000) in Lee et al (2004) ont pu démontrer qu'il y a une corrélation élevée ($r = 0.75$) entre les phénols des huiles essentielles et l'oxydation du LDL in vitro.

Chapitre 3

LES FLAVONOÏDES

« flavonoïdes comme des antioxydants »

Wolf Bors et al., 1990.

CHAPITRE 3 : LES FLAVONOÏDES

1-INTRODUCTION :

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux et un groupe vaste connu du produit naturel (Marfak, 2003 ; Medic-Šarić et al., 2003). A l'heure actuelle, 4000 flavonoïdes dans le règne végétal ont été identifiés (Medic-Šarić et al., 2003).

Les flavonoïdes sont diversifiés par l'oxydation, alkylation et la glycolisation (Furusawa et al., 2005). Ils se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides et polymères (Medic-Šarić et al., 2003).

Les flavonoïdes des plantes vasculaires sont localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Marfak, 2003; Medic-Šarić et al., 2003).

Ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Hanasaki et al., 1993).

Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$).

2-STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ de type phényl-2-benzopyrane.

Elle est constituée de deux unités aromatiques, deux cycles en C_6 (A et B), reliés par une chaîne en C_3 (Markham, 1982 ; Bruneton, 1999; Jourdes, 2003) (Figure 1).

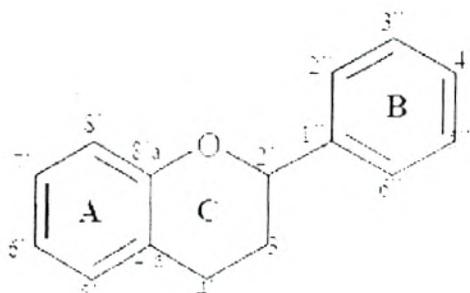


Figure 1 : Structure générale des flavonoïdes

3-BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES :

Leur biosynthèse (Figure 3) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' - tétrahydroxychalcone qui résulte de la condensation entre le 4-coumaryl-CoA et trois unités malonyl-CoA (Figure 2). Cette étape est catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS). Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7) (Figure 3). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélagonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélagonidol-3-glucoside (Figure 3).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

Les groupes majeurs des flavonoïdes sont les flavonols, flavones, et les anthocyanines, flavan-3-ol. Les groupes mineurs sont les chalcones et aurones, isoflavonoïdes, flavanones et autres pigments phénoliques.

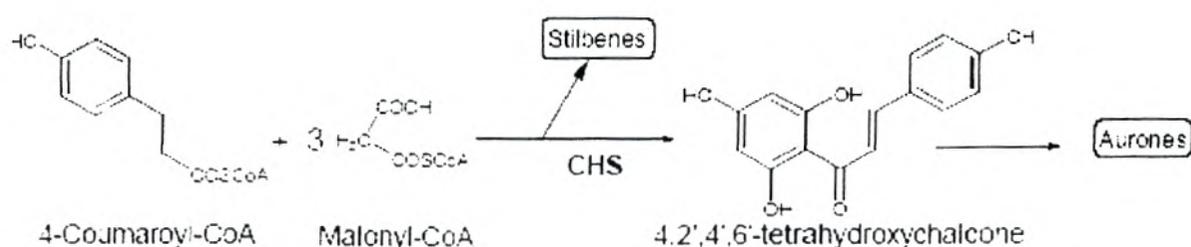


Figure 2 : La biosynthèse de 4, 2', 4', 6' - tétrahydroxychalcone (Bruneton, 1999).

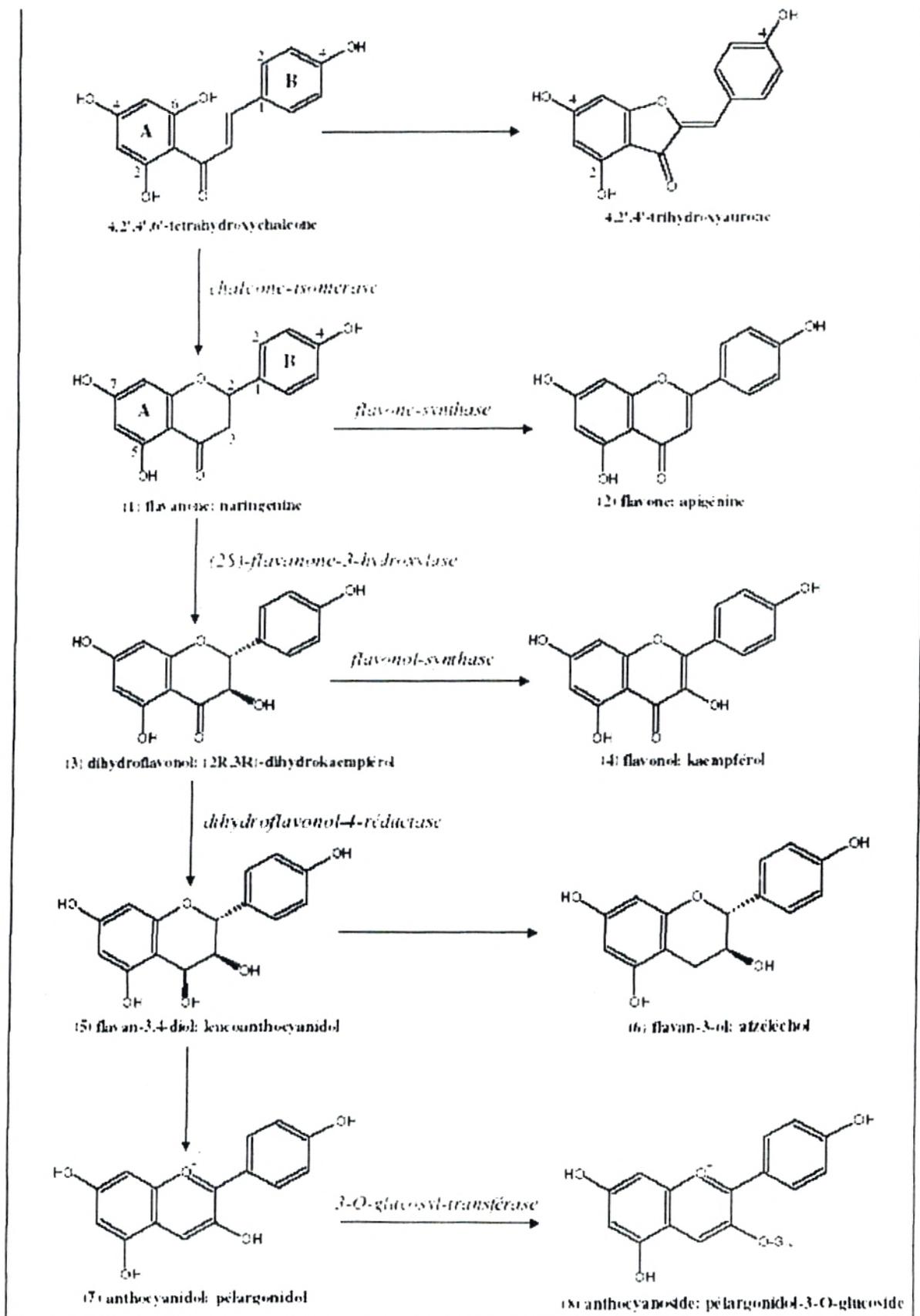


Figure 3 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

3.1-Biosynthèse des anthocyanes :

Le dihydrokaempférol (**9**) est l'intermédiaire à partir duquel le cycle B peut être fonctionnalisé de deux manières différentes, soit hydroxylé en position 3' par la flavonoïde-3'-hydroxylase (F3'H) pour former **10** ou en position 3' et 5' par la flavonoïde-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) pour conduire à **11**. La réduction de la fonction cétone en position 4 de **10** et **11** par la dihydroflavanonol-4-réductase (DFR) conduit à la formation des leucoanthocyanidines **12** et **13**, qui sont les intermédiaires clés conduisant aux flavan-3-ols et aux anthocyanes. Les flavan-3-ols **21**, **22**, **23**, et **24** sont obtenus par l'action de la leucoanthocyanidine 4-réductase (LAR) qui réduit la fonction alcool en position 4 des leucoanthocyanidines **12** et **13**. Les procyanidines et les prodelphinidines sont obtenus par polymérisation des flavan-3-ols correspondant. Les leucoanthocyanidines **12** et **13** peuvent également former sous l'action de la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) les anthocyanidines **14** et **15** qui conduisent aux anthocyanes **16** et **17** après glycosylation en position 3 par action de l'UDP glucose-flavonoïde-3-O-glucosyltransférase (UFGT). Les anthocyanes ainsi formés peuvent subir l'action de la méthyltransférase (MT) au niveau des fonctions hydroxy en position 3' et 5' ce qui conduit à la diversité de fonctionnalisation du cycle B pour obtenir les anthocyanes **18**, **19** et **20** (Figure 4).

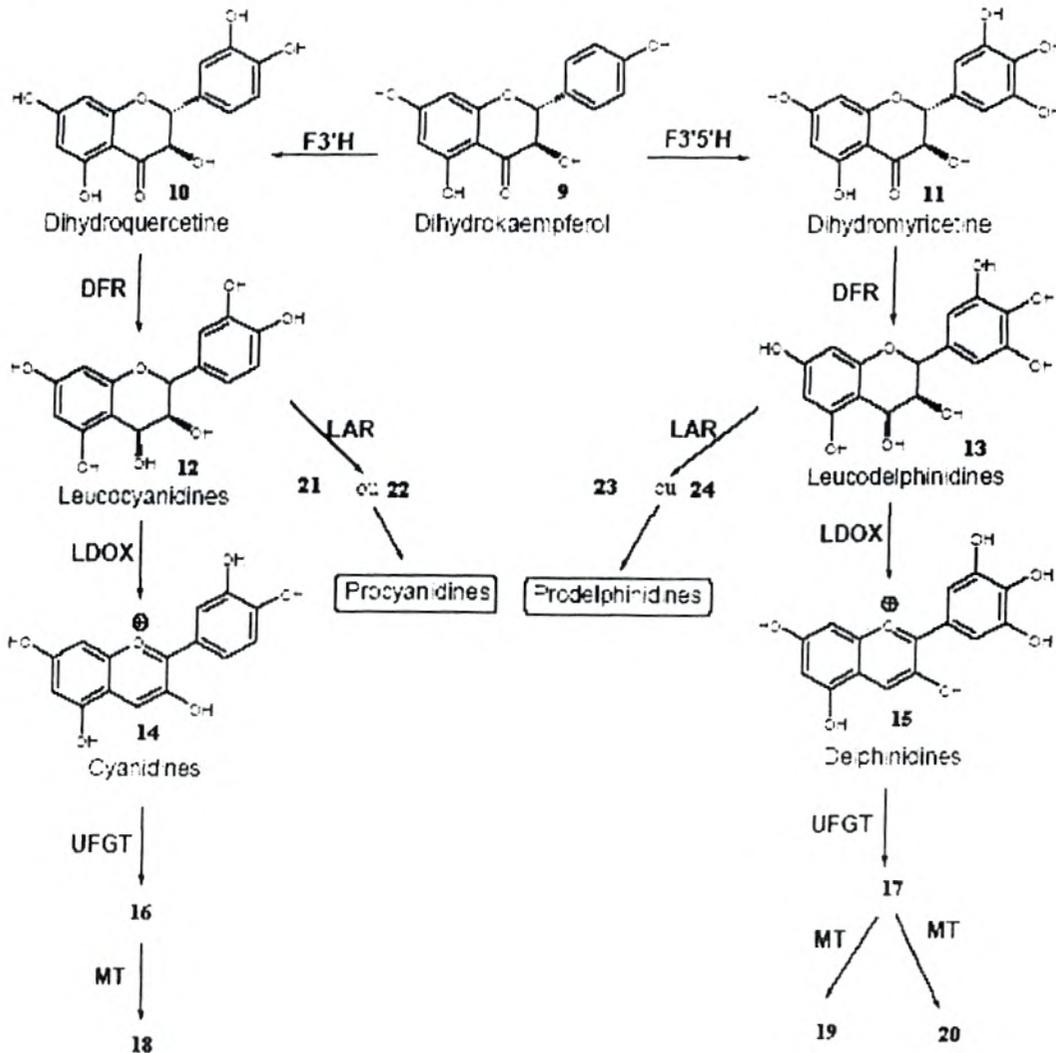


Figure 4 : Mécanisme de formation des différentes anthocyanes à partir de leur précurseur commun le dihydrokaempférol (**9**) (Jourdes, 2003).

4.3- FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOLS :

Ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins catéchiques ou tanins condensés (Figure 7). Cette configuration structurale se fait entre la liaison C-C soit par condensation chimique ou enzymatique.

Parmi ces tannins condensés, deux classes sont distinguées : les procyanidines qui sont des polymères d'unité (+)-catéchine (21) ou (-)-épicatéchine (22), et les prodelphinidines qui elles sont constituées d'unité (+)-gallocatéchine (23) et (-)-épigallocatéchine (24) (Jourdes, 2003) (Figure 6).

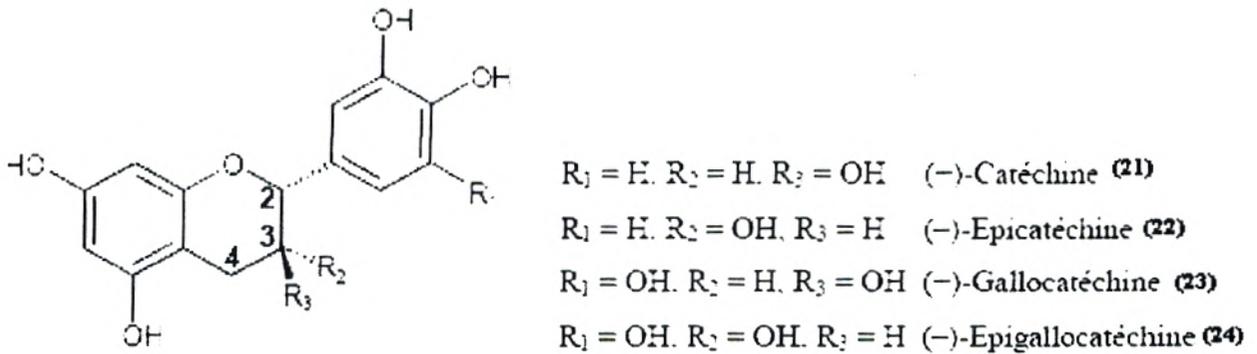


Figure 6 : Structure chimique des principaux monomères des tannins condensés.

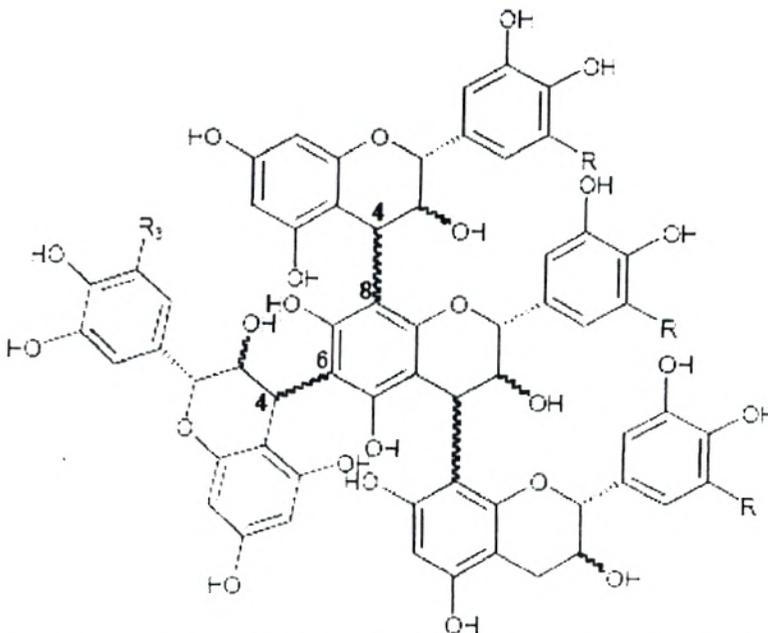


Figure 7 : Structure générale des proanthocyanidines (R= H : procyanidine, R= OH : prodelphinidines) (Jourdes, 2003).

4.4-ANTHOCYANOSIDES :

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kianos* = bleu) font partie de la famille des flavonoïdes et absorbent la lumière dans le visible (Jourdes, 2003).

Ce sont des pigments vacuolaires rouges ou bleus de tous les végétaux (à l'exception de ceux qui contiennent des bétalaïnes) (Gerhard, 1993). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (Figure 8). Parmi ces composés, il y a le pélagonidol-3-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoïde ou kéraçyanine.

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits (Brouillard et al., 1997 in Bahorum, 1997).

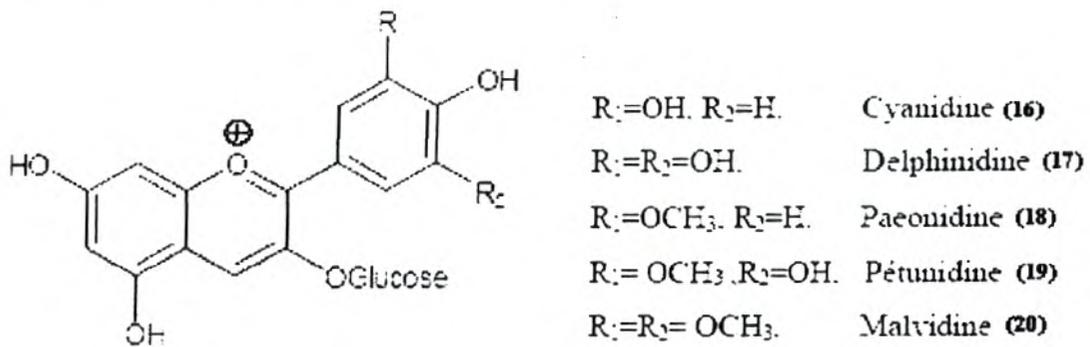


Figure 8 : Structure des principales anthocyanes.

4.5-CHALCONES ET AURONES :

Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α, β -insaturée (Figure 3). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (Figure 3).

4.6-ISOFILAVONOÏDES (ISOFLAVONES) :

Cette catégorie diffère des autres classes de flavonoïdes par la grande variabilité structurale, grande fréquence de substitution d'isoprénoides et sa présence à l'état libre dans la plante plutôt que glycosides. Sa configuration structurale est isomère à celui de flavone mais diffère à la position d'attachement du cycle B par rapport au noyau pyranne central. Par conséquent, le cycle B est lié à la position 3 et non à la position 2 (Figure 9).

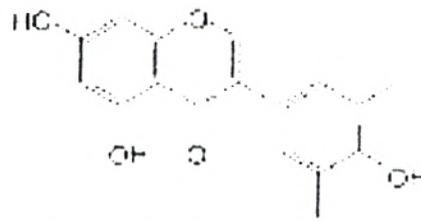


Figure 9 : Structure des isoflavones

A l'heure actuelle, il y a 600 à 700 isoflavonoïdes connus. Les plus fameux sont le diadzeine, genisteine et biochanine A notée pour leurs propriétés oestrogènes.

5-DISTRIBUTION ET LOCALISATION :

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits (Tableau 3).

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Justen, 1998; Bronner, 1995; Hollman, 1996; Crozier, 1997 in Marfak, 2003). Le tableau 3 regroupe la distribution alimentaire de certains flavonoïdes.

Tableau 3: Sources alimentaires des flavonoïdes (Marfak, 2003).

| Flavonoïdes | Aliments |
|-----------------------|---|
| Flavanones | |
| naringénine | fruits du genre <i>citrus</i> |
| Flavones | |
| chrysin | peau des fruits |
| apigénine | persil, thym, romarin, céleri |
| lutéoline | persil, céleri |
| Flavonols | |
| kaempférol | radis, brocoli, thé noir |
| quercétine | oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate |
| myricétine | canneberge, vin rouge |
| Flavan-3-ols | |
| épicatéchine | thé vert, thé noir |
| catéchine | thé vert, thé noir |
| épigallocatechine | vin rouge |
| Anthocyanidols | |
| cyanidol | cassis, myrtilles |
| malvidol | raisins, fraises, cassis |
| apigénidol | framboises, fraises |

Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l'hespéridine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes (Justen, 1998 in Marfak, 2003).

Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de quercétine. Cette dernière se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également largement détecté.

Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois.

Les petits fruits sont extrêmement riches en acide phénolique, comme la myrtille. Les flavonols sont essentiellement apportés par l'oignon, pomme, brocoli, haricots verts, chou petits fruits et thé.

Autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, aïrelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certaines légumes comme le chou rouge et les radis.

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Marfak, 2003).

6-PROPRIÉTÉS DES FLAVONOÏDES :

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les chercheurs des 10-15 dernières années ont démontré que ces composés ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers y compris le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Brzowska et al., 1973).

Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est à dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. C'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose (Zapromietov, 1970 ; Kanash, 1947; Rubin et al., 1951 in Brzowska et al., 1973).

Il aussi reporté que les composés phénoliques ont un rôle important dans le phénomène de la symbiose *Rhizobium-Vicia faba*. Les signaux chimiques émis par les exsudats racinaires et les racines étaient les flavones et les flavanones. Les composés inducteurs de gènes *nod* identifiés dans les exsudats racinaires sont la tricétine (5, 7, 3', 4' pentahydroxy-flavone) et la naringénine (5, 7, 4' trihydroxy-flavone). Dans l'extrait de racine, un seul composé a induit les gènes *nod* de la bactérie c'est le Me-3' ériodictyol (Atik Bekkara, 1999).

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) (Marfak, 2003 ; Bors et al., 1990).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches sont stagnées jusqu'à des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées (Heimeur et al., 2004).

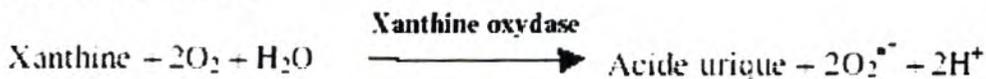
7-FLAVONOÏDES COMME PRODUITS ANTIOXYDANTS :

D'après Halliwell (Halliwell, 1994 in Marfak, 2003), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- ❖ Le piégeage direct des espèces oxygénées activées (ROS).
- ❖ L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- ❖ La protection des systèmes de défense antioxydants.

7.1- INHIBITION ENZYMATIQUE :

La xanthine oxydase (XO) est considérée comme une source enzymatique et biologique importante des ROS in vivo en particulier le radical superoxyde (Sanchez-Moreno, 2002 ; Marfak, 2003). Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique suivant la réaction suivante :



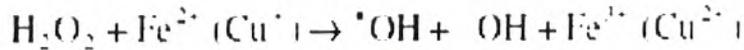
Hansaki et ses collaborateurs, dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Hansaki, 1994 in Marfak, 2003). Ces résultats ont été confirmés par Cos et ses collaborateurs qui ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production d'acide urique (Cos, 1998 in Marfak, 2003).

Les travaux de Raso et ces collaborateurs ont montré que le flavonoïde Morine (3, 3', 5, 5', 7 penta hydroxyflavan) isolé à partir du *Morus tinctoria* est capable de régénérer les mécanismes oxydatifs naturels dans l'organisme par exemple α -tocopherol, acide ascorbique... etc. Il est aussi capable d'inhiber le cyclo-oxygénase, le lipoxygénase et glutathion-S-transférase (Raso et al., 2001; Kaneko et Baba, 1999; Chen et al., 1996 in Bartošikova et al., 2003).

Les flavonoïdes peuvent inhiber l'oxydation du LDL en agissant sur les activités de 5-lipoxygénase et le cyclo-oxygénase (DE Whalley et al., 1990).

7.2- CHÉLATION DES IONS METALLIQUES :

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Marfak, 2003) :



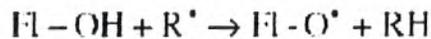
Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris, 1995 in Marfak, 2003; Brown et al., 1998).

Certains d'entre eux sont capables d'inhiber les modifications du LDL par 100 micro-molle Cu^{2+} à une concentration seulement 10 micro-molle (DE Whalley et al., 1990).

7.3- PIÉGEAGE DES RADICAUX LIBRES :

La fonction antioxydante des flavonoïdes in vitro et in vivo pendant les deux siècles passés attire l'attention de la société scientifique (Venskutonis et al., 2004).

En effet, les recherches accrues s'embêtent sans cesse afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Jovanovic, 1994 in Marfak, 2003)



Où R^\bullet représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy (Fl-O^\bullet) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 10).

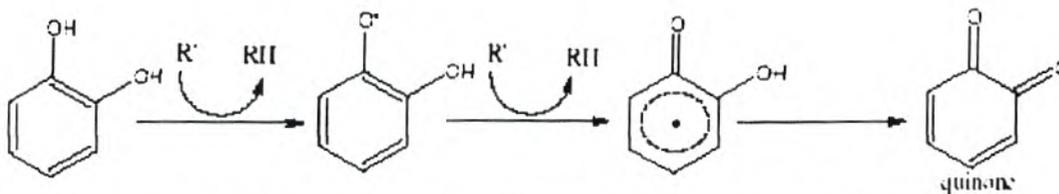


Figure 10 : Piégeage des ROS (R^\bullet) par les flavonoïdes (Marfak, 2003)

8-RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE :

La communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

- 1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- 2. La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3. La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Figure 11).

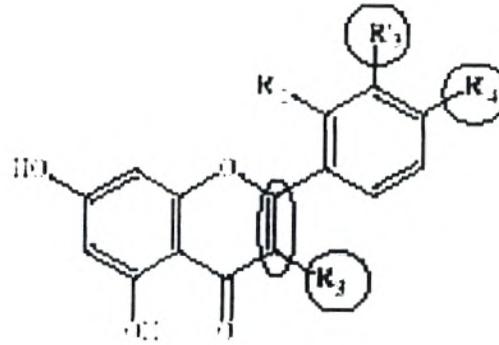


Figure 11 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Notant que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures celle des composés non glycosylés. On signale que les monophénols sont moins actifs que les polyphénols mais l'acide gallique présente une activité élevée grâce de l'effet inductif de 3 groupes hydroxyles (Sanchez-Moreno et al., 1998).

9- ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES :

Les études scientifiques actuelles ont permis de confirmer les propriétés médicinales attribuées aux flavonoïdes : activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses, antithrombotiques et hépatoprotectives (Tableau 4).

Tableau 4 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997).

| POLYPHENOLS | ACTIVITES | AUTEURS |
|---|--|--|
| Acides Phénols (cinnamiques et benzoï ques) | Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes | Didry et al. 1982 Ravn et al. 1984 Hayase et Kato 1984 |
| Coumarines | Protectrices vasculaires et antioedémateuses | Mabry et Ubbelen 1980 |
| Flavonoïdes | Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes | Stavric et Matula 1992 Das et al. 1994 Bider et al. 1987 Bruneton 1995 Armonia et al. 1995 |
| Anthocyanes | Protectrices capillaro-veineux | Bruneton 1995 |
| Proanthocyanidines | Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires | Masquelier et al. 1979 Bahorun et al. 1994, 1996 De Oliveira et al. 1972 Brownlee et al. 1992 Kreofsky et al. 1992 |
| Tannins galliques et catechiques | Antioxydantes | Okuda et al. 1983 Okamura et al. 1993 |

9.1-EFFETS ANTI-ALLERGIQUES :

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Di Carlo, 1999 *in* Marfak, 2003).

9.2-EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES :

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes (Landolfi, 1984 *in* Marfak, 2003).

Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

9.3- EFFETS ANTI-ULCEREUX :

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes (Di Carlo, 1999 *in* Marfak, 2003).

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel (Izzo, 1996 *in* Marfak , 2003). En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

9.4- EFFETS ANTICANCEREUX :

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des animaux suggèrent que les flavonoïdes affectent toutes les étapes de carcinogénèse.

Durant l'étape d'initiation (ADN endommagé), les flavonoïdes peuvent neutraliser l'effet genotoxique par plusieurs mécanismes :

- Inhibition des mono-oxygénases hépatiques impliquant dans l'activation des pro-carcinogènes.
- Activation des enzymes hépatiques de la conjugaison qui sont responsables pour la detoxification des xénobiotiques (Wood *et al.*, 1986 ; Siess *et al.*, 1992 *in* Remesy *et al.*, 1998).
- Piégeage direct des carcinogènes (Stavric *et Matula*, 1992 *in* Remesy *et al.*, 1998).
- Stimulation de l'extraction des carcinogènes en dehors des cellules (Phang *et al.*, 1993 *in* Remesy *et al.*, 1998).

En outre, les flavonoïdes inhibent le développement du cancer par l'interférence avec des mécanismes de transduction des signaux mitogéniques ou par d'autres mécanismes non identifiés (Agullo, 1996 ; Manach *et al.*, 1996 *in Remesy et al.*, 1998).

La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca, 1994 *in Marfak*, 2003).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres (Di Carlo, 1999 *in Marfak*, 2003).

9.5-EFFETS ANTIDIABETIQUES :

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry, 1983 *in Marfak*, 2003). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong, 1997 ; 2000 *in Marfak*, 2003).

D'autres travaux supplémentaires sur des rats montrent que les flavonoïdes et les tannins du *Barleria lupulina* ont une action similaire à celle du glibenclamide. Ce dernier stimule les cellules B à libérer plus de l'insuline et par conséquent un effet antihyperglycémique (Suba *et al.*, 2004).

9.6- D'AUTRES EFFETS BIOLOGIQUES :

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (Hertog, 1993 *in Marfak*, 2003).

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés (Chu, 1992 *in Marfak*, 2003).

Partie expérimentale

CHAPITRE 1 : Les huiles essentielles

1. Matériels végétaux :

1.1 Choix des stations :

L'Algérie comme d'autres pays de la mer méditerranéenne est connue par son tapis végétal très diversifié y compris les plantes alimentaires, médicinales, aromatiques, condimentaires. Cette richesse résulte d'un équilibre délicat entre les différents facteurs environnementaux (la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents). La région de Tlemcen n'exclue pas de cette définition.

Trois plantes médicinales : *Pistacia lentiscus* (feuilles), *Pistacia atlantica* (feuilles) et *Inula viscosa* (feuilles + fleurs) croissantes à l'état spontané sont récoltées dans différentes stations de la région de Tlemcen.

Pistacia lentiscus : trois stations choisies (Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet).

Pistacia atlantica : station de Ain Fezza.

Inula viscosa : station de Sidna Youchaa (Ghazaouet) (Figure 12).

1.2 Description des stations :

Les différentes stations sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5 : Situation géographique et bioclimat des différentes stations (Encarta 2003).

| Stations | Longitude (Ouest) | Latitude (Nord) | Altitude | Etage bioclimatique |
|---------------|-------------------|-----------------|----------|---------------------|
| Sidna Youchaa | 1° 23' | 35° 05' | 40 m | Semi-aride chaud |
| Ghazaouet | 1° 24' | 35° 05' | 80 m | Semi-aride chaud |
| Ain Fezza | 1° 17' | 34° 55' | 730 m | Semi-aride tempéré |
| Oun El Alou | 1° 16' | 34° 54' | 800 m | Semi-aride tempéré |

1.3 Période de la récolte du matériel végétal :

Pour les stations de Ghazaouet et Sidna Youchaa, la récolte du matériel végétal, *Pistacia lentiscus* et *Inula viscosa* a été effectuée au mois de novembre.

Pour les autres stations, la distribution de la récolte est la suivante :

❖ Station de Ain Fezza :

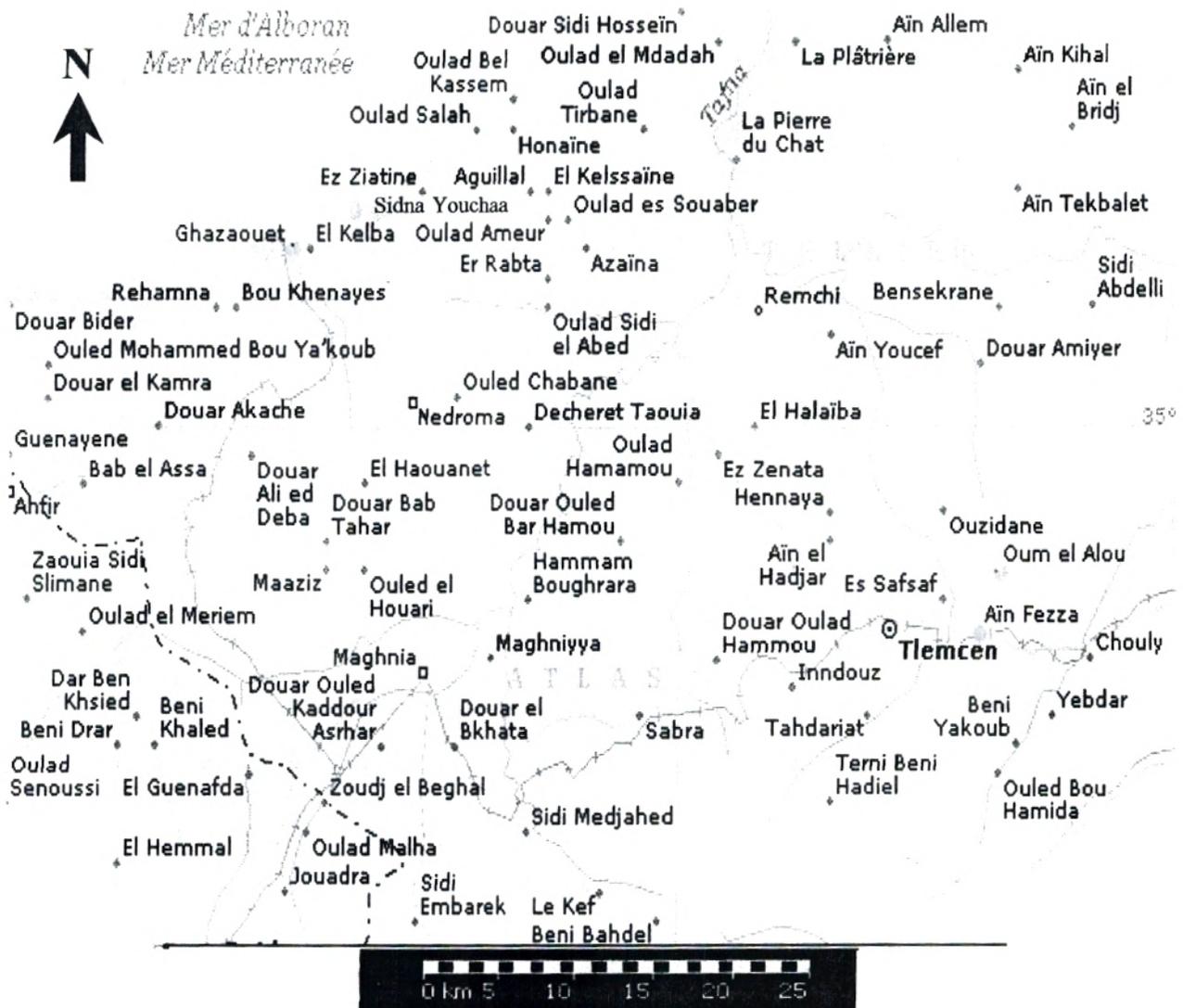
- *Pistacia lentiscus* : janvier et mai.
- *Pistacia atlantica* : novembre, avril et mai.

❖ Station Oum El Alou:

- *Pistacia lentiscus* : janvier et novembre.

1.4 Conservation du matériel végétal :

Une fois la récolte est achevée et après un tri rapide, les différentes plantes sont lavées soigneusement à l'eau froide puis séchées par la suite à l'ombre et à la température ambiante dans une pièce aérée. Les échantillons sont brassés chaque jour, surtout au début du séchage pour faciliter celui-ci. Cette étape séjourne environ 10 jours en moyenne pour les différentes stations, elle poursuit par l'étape de conservation dans des sacs en papier.



Stations d'étude

Figure 12 : Carte géographique des stations d'étude (Encarta, 2003).

1.5 Extraction des huiles essentielles :

Deux méthodes d'extraction sont appliquées :

- Hydrodistillation
- Entraînement à la vapeur d'eau.

1.5.1 Extraction par hydrodistillation :

Cette étape consiste à immerger directement le matériel à traiter dans l'eau distillée qui est portée à ébullition.

Le dispositif utilisé est constitué d'un erlenmeyer à 2 litres en verre, placé au-dessus d'une plaque chauffante contenant l'eau distillée et le matériel végétal réduit en morceaux.

Ce montage est surmonté d'une colonne à distiller en verre qui est lui-même reliée à un réfrigérant. Ce dernier condense les vapeurs d'eau et les gouttelettes d'huile essentielle en les recueillant dans une ampoule à décanter sous forme de distillat (Figure 13).

1.5.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Le dispositif utilisé est un extracteur élaboré par Marcusson et modifié par **Benmansour en 1998**. Il est constitué d'un ballon métallique contenant de l'eau, placé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte également métallique, contenant le matériel végétal, coupé en petits morceaux et placé sur une grille. Cette enceinte est attachée avec d'autre système de réfrigération et le distillat est recueilli dans une ampoule à décanter (Figure 14).

En ce qui concerne les deux méthodes, la durée de l'extraction est de 2 heures et 30 minutes.

1.6 Purification et conservation des huiles essentielles:

Afin d'éliminer toute trace d'eau dans les huiles essentielles (HE), le distillat récupéré est stocké au congélateur (-20°C) durant 24 heures. On obtient ainsi une phase de l'eau congelée et une phase surmontée de l'huile essentielle.

Cette dernière est transférée vers d'autres tubes en verre, stériles enveloppés et gardés au réfrigérateur à 4°C.

1.7 Détermination du rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétal à traiter (**Carré P, 1953**).

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

Où :

m : représente la masse en gramme de l'huile essentielle.

m₀ : représente la masse en gramme du matériel végétal sec.

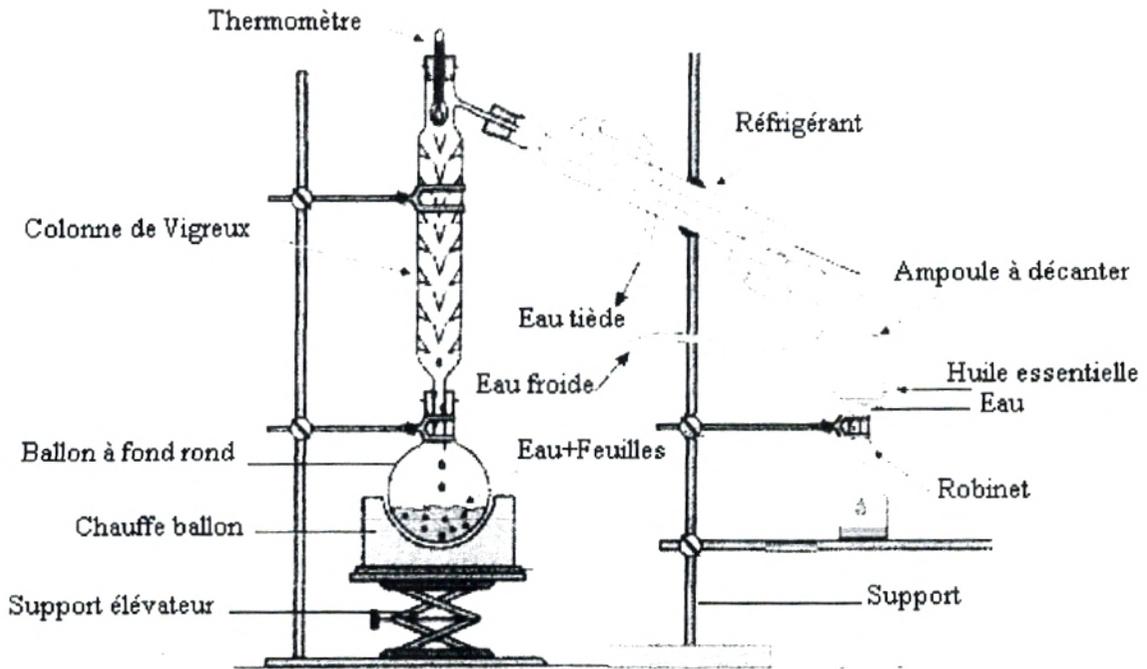


Figure 13 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation.

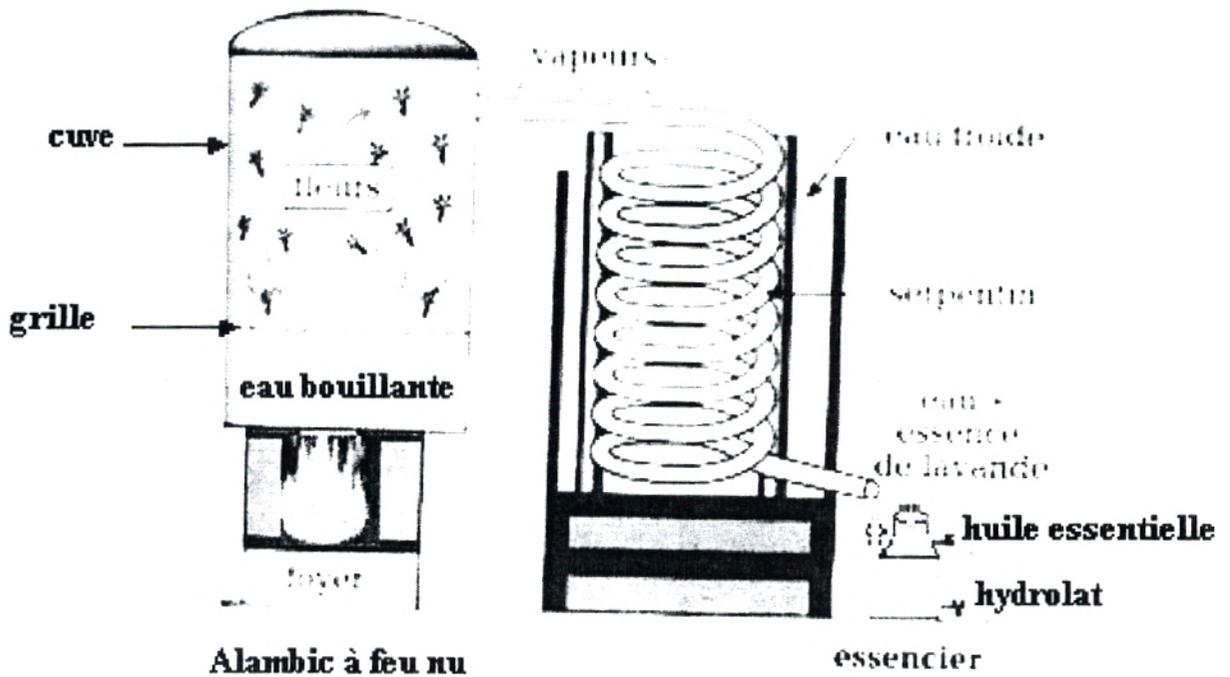


Figure 14 : Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

CHAPITRE 2 : Analyse des huiles essentielles par le couplage CPG/RMN C¹³

Nos échantillons d'HE des plantes médicinales choisies (*Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*) sont destinés à une analyse par CPG/RMN C¹³ en permettant de :

- Définir la nature et la teneur en chacun des constituants des huiles essentielles.
- Mettre en évidence le chimiotype d'HE de ces plantes.

1-Principe de la technique :

D'après Keravis (1997) *in* Lahlou (2004), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les analyses quantitatives et son couplage avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) pour les analyses qualitatives sont deux méthodes intéressantes et performantes pour l'identification chimique des huiles essentielles (Lahlou, 2004)

Dans ce cas, la comparaison des temps de rétention du spectre obtenue par CPG et les données du SM sur les fragmentations des molécules avec un ou plusieurs standards de référence précédemment reportés permet l'identification des composés principaux (Lahlou et al., 2000 b ; 2001 b,d ; Lahlou et Berrada 2003 *in* Lahlou, 2004).

Cependant, ce couplage présente certaines limitations :

- La superposition de plusieurs pics n'est pas exclue lors de la séparation chromatographique ;
- La SM ne suffit pas toujours pour identifier des produits possédant le même squelette hydrocarboné.

Afin de pallier ce problème, l'identification par CPG/SM doit être confirmée par les indices de rétention de Kovats pour deux colonnes de polarité différentes (Lahlou, 2003 *in* Lahlou, 2004) ou bien sur la même colonne mais à différentes températures (Denayer et Tilquin, 1994 *in* Lahlou, 2004).

Il s'est avéré parfois l'impossibilité de séparer de constituants ayant les mêmes temps de rétention en CPG ou avec des molécules structurellement similaires comme par exemple les isomères des composés des HE, la spectroscopie de la résonance magnétique du carbone 13 (RMN C¹³) a eu lieu dans ce cas (Tomi et al., 1997 *in* Lahlou, 2004).

Cette technique est appliquée aussi pour l'étude de la variation intra-chimique des HE (Lahlou, 2004).

2- Condition opératoire :

Les analyses des huiles essentielles (HE) sont effectuées par l'université de CORSE CNRS, équipe de chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134.

2.1-Analyse par RMN C¹³

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker 400 MHz, équipé d'une sonde de 5 mm opérant à 100 MHz pour le carbone-13, dans le chloroforme deutérié. Les déplacements chimiques sont des données en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne. Les spectres RMN du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants: durée de l'impulsion (PW): 2,8 μ s [ou 5 μ s] (angle d'impulsion 45°); temps d'acquisition: 1,3 s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 12 500Hz (250 ppm), Les données du signal de précession libre sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (Line broadening : LB = 1Hz). L'analyse d'un mélange est menée sur échantillon de 70 mg [ou 200 mg] dilué dans 0,5 ml de CDCl₃.

2.2-Analyse par CPG

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 x 0,22 mm d.i.; épaisseur du film: 0,25 mm), polaire (BP20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP1, polydiméthylsiloxane) et de deux détecteurs à ionisation de flamme.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Gaz vecteur: Hélium ;
- Pression en tête de colonne: 20psi;
- Programmation de température: de 60 à 220°C à 2°C/min avec un palier de 20 min à 220°C ;
- Température de l'injecteur: 250°C ;
- Température des détecteurs: 250°C ;
- Injection: mode split.

CHAPITRE 3 : Les Flavonoïdes

1-Matériel végétal :

Cette étude est réalisée sur trois plantes à savoir *Pistacia atlantica* (Ain Fezza), *Pistacia lentiscus* (Oum El Alou) et *Imula viscosa* (Sidna Youchaa).

Les feuilles utilisées pour l'extraction sont séchées à l'air libre et à l'ombre. Elles sont ensuite réduites en poudres à l'aide d'un mortier.

2-Préparation des extraits bruts :

La poudre (50g) pour chaque plante est placée en erlenmeyer dans 200 ml éthanol 96,6° pendant 15 jours. Après filtration, les solutions éthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 70°. Les résidus secs sont pesés et repris par 20 ml du méthanol (Lahouel et al., 2004).

3-Calcul le rendement massique des extraits bruts :

Il est donné par le rapport entre l'extrait sec et la masse initiale de la poudre à traiter fois 100.

4-Méthodes d'analyse des composés phénoliques :

Les deux méthodes classiques de « Folin Denis » et du « Bleu de Prusse » sont des techniques spectrométriques mettant en oeuvre des mesures d'absorbance à 725 et 720 nm. La méthode développée nommée « DMBA » contrairement aux précédentes fait appel, après action des réactifs, à la mesure d'une absorbance à 510nm (Stern et al., 1996). Il est primordial aussi de considérer le dosage qualitatif en polyphénols d'un extrait et non pas seulement quantitatif. La teneur en polyphénols totale d'un extrait peut être forte mais les polyphénols présents sont peu actifs biologiquement. Tandis qu'un extrait très fortement dosé en un seul polyphénol présente une grande activité biologique (Stern et al., 1996).

4.1-Dosage des phénols totaux :

Les quantités des phénols totaux dans les extraits bruts d'*I.viscosa*, *P.lentiscus* et *P.atlantica* sont déterminées par la procédure du « Folin -ciocalteu » (Singleton et Rossi, 1965 in Kähkönen et al., 1999).

Une quantité de 200µl pour chaque extrait brut est introduite dans des tubes à essai ; le mélange (1ml de Folin-ciocalteu dilué 10 fois et 0.8ml du carbonate de sodium à 7,5%) est additionné.

Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes.

L'absorbance est mesurée à 765nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway.6405 UV/Vis. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations de pyrocatechol (4.746mg/l ; 47.47 mg/l ; 63.37 mg/l ; 84.37 mg/l ; 120.5 mg/l et 150mg/l) a été préparée.

Les phénols totaux dans les extraits sont exprimés en milligramme (mg) équivalent en pyrocatechol par gramme (g) du poids de l'extrait méthanolique en appliquant la formule donnée par Folin et Ciocalteu (1927) :

$$C=(c \times V)/m$$

Où :

C : représente les composés phénoliques totaux en mg/g d'extrait de plante.

c : la concentration du pyrocatechol établie à partir de la courbe d'étalonnage.

V : le volume de l'extrait méthanolique.

m : le poids pur de l'extrait méthanolique de la plante en gramme.

5-Préparation des extraits fractionnés par éthanol:

Pour les deux échantillons de pistachier, 10g de poudre est extraite par 150ml d'éthanol absolu.

Par contre 25g du matériel végétal d'*Inula viscosa* est mélangé avec 200ml d'éthanol absolu.

Après 6 jours de conservation à la température ambiante, on a effectué la filtration.

Les solutions éthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite à 70°C et les résidus

secs sont repris dans de l'eau bouillante ; ces solutions filtrées sur papier wattman sont épuisées dans une ampoule à décantation successivement par l'acétate d'éthyle et le n-butanol avec un volume de 50ml.

Les différents extraits obtenus pour les deux fractions et pour chaque plante ont été évaporés à sec au rotavapeur (Laborota 4000-efficient). Les extraits sont récupérés par du méthanol.

6-Préparation des extraits fractionnés par méthanol:

Le même protocole évoqué auparavant est appliqué pour nos échantillons de plantes mais le solvant d'extraction est un mélange du méthanol aqueux (70:30).

Les différentes solutions sont conservées à la température ambiante pendant 72 heures.

Les extraits sont repris par méthanol et sont conservés à 4°C dans des tubes à hémolyse.

Le schéma suivant décrit la méthode d'extraction d'après Bekkara et al (1998).

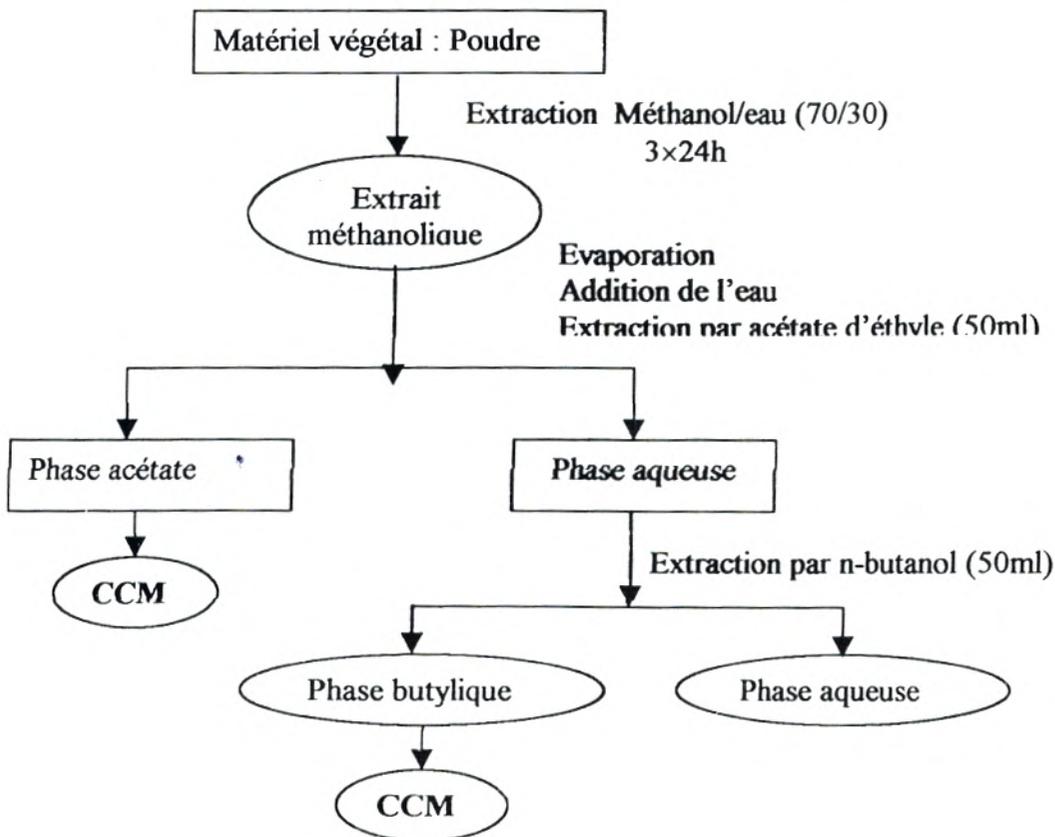


Figure 15 : Schéma d'extraction des flavonoïdes (Bekkara et al., 1998).

7-Analyse structurale :

Traitement des différentes fractions par CCM :

Nous avons utilisé des couches minces 20×20 pour la séparation des aglycones flavoniques de nos fractions d'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Le solvant suivant : chloroforme/méthanol/eau/acide acétique (100/15/0.5/0.3) (Jeffery et Christic Nea, 1983 *in* Heimeur, 2004) est employé pour le support gel de silice.

Dans le cas du support polyamide DC6, le solvant utilisé est le mélange n-butanol/acide acétique/eau : BAW (4/1/5) (Markham, 1982).

CHAPITRE 4 : Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, *Inula viscosa*

Connus depuis l'antiquité, les huiles essentielles et les extraits bruts des composés phénoliques des plantes sont utilisés en médecine pour réduire les atteintes virales et microbiennes en s'opposant au développement des germes et les tuent.

Pour cela nous avons voulu étudier le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits bruts des 3 plantes médicinales : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

1-Les huiles essentielles et les extraits bruts des composés phénoliques:

Dans cette partie, nous nous sommes proposés d'étudier le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de :

- *P.lentiscus* des stations de Ghazaouet, Oum EL Alou et Ain Fezza ;
- *P.atlantica* de station de Ain Fezza ;
- *I.viscosa* de station de Sidna Youchaa.

3 extraits bruts ont été utilisés :

- Extrait brut d'*I.viscosa* de station Sidna Youchaa ;
- Extrait brut de *P.atlantica* de station d'Ain Fezza ;
- Extrait bru de *P.lentiscus* de station Oum EL Alou.

2-Les souches microbiennes :

Les groupes différents de microorganismes : bactéries, levures et moisissures retenus pour cette étude sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Origine des microorganismes testés

| SOUCHES | ORIGINE |
|--|--|
| <u>Bactéries</u> | |
| * Gram négatif | |
| <i>Escherichia coli</i> (E ₁): 5044172 | Laboratoire de microbiologie de Sidi Bel Abes. |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KL ₁): 5215773 | Laboratoire vétérinaire de Tlemcen (L. V. R. T). |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₄): 22212004 | Laboratoire de microbiologie DB (Tlemcen). |
| <i>Salmonella typhi</i> (SL) : 4404540 | Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U). |
| <i>Enterobacter cloacea</i> (En) : 1305573 | Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U). |
| <i>Proteus mirabilis</i> (Pr) : 0536040 | Laboratoire de microbiologie de l'hôpital (C.H.U). |
| * Gram positif | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₁): ATCC 19111 | Laboratoire de microbiologie DB (Tlemcen) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ST ₁): ATCC 601. | Laboratoire de phytopharmacie, Paris 7 (France) |
| <u>Levures</u> | |
| <i>Candida albicans</i> : 444 | Laboratoire de mycologie DB (Tlemcen) |
| <u>Moisissures :</u> | |
| <i>Aspergillus flavus</i> de référence (AF _R) : 99.4294 | Muséum National d'histoire Naturelle (MNHN) Paris (France). |
| <i>Aspergillus flavus</i> (AF). | Laboratoire de mycologie DB (Tlemcen). |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> (O ₁) | Laboratoire de mycologie DB (Tlemcen). |
| <i>Trichoderma sp</i> (R ₃) | Laboratoire de mycologie DB (Tlemcen). |
| <i>Fusarium sp</i> (Fus) | Laboratoire de mycologie DB (Tlemcen). |

2.1-Purification des bactéries :

La purification se fait par l'ensemencement de ces souches sur des milieux spécifiques

- ✓ Milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* ;
- ✓ Milieu Mac Conkey pour les entérobactéries (P₄ ; KL₁ ; SL ; Pr ; En).
- ✓ Milieu Palcam, Oxford pour *Listeria monocytogenes*.

2.2- Milieux de culture :

Les milieux utilisés pour cette activité sont :

- ✓ Mueller-Hinton (M.H) pour les bactéries ;
- ✓ Sabouraud dextrose agar (SDA) pour *Candida albicans* ;
- ✓ Potato dextrose agar (PDA) pour les moisissures.

3-Activités antimicrobienne et antifongique :

3.1- Evaluation de l'activité antimicrobienne :

La méthode adoptée est la méthode de Vincent, elle est appelée aussi technique de l'antibiogramme (Jacob et al., 1979).

On utilise des disques de papier filtre de 6ml de diamètre imprégnés d'huile essentielle et déposés à la surface d'un milieu gélosé, en boîtes de Pétri préalablement ensemencées en surface en nappe à l'aide d'une suspension de germe choisi à raison de 1ml.

Après 18 heures d'incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm.

Notes : Sur des disques stériles, le dépôt s'effectue comme suit :

- Pour les huiles essentielles : 2 et 5 µl ;
- Pour les extraits bruts : 5 et 10 µl.

3.1.1-Préparation de l'inoculum :

La revivification des souches bactériennes et *Candida albicans* a été faite dans du bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures.

Dans tous les cas, la quantité d'inoculum est ajoutée à 10⁸ ufc/ml fixée par la mesure de la densité optique (DO) entre 0.08 et 0.1 (Hernández et al., 2000).

3.2- Evaluation de l'activité antifongique :

La technique adoptée est celle décrit par Chang et al (1999) et Chang et al (2000) in Wang et al (2005).

Les quantités des huiles essentielles ou des extraits bruts sont additionnées à 20ml de PDA stérile. Les mélanges sont coulés sur des boîtes à Pétri. Après, les disques de mycélium de chaque moisissure de 5mm de diamètre coupés du périphérique d'une culture de 7 jours sont inoculés au centre des boîtes puis incubées à 25°C± 2.

Notes : Les quantités additionnées sont :

- Pour les huiles essentielles : 100 et 200µl.
- Pour les extraits bruts : 50µl, 100µl, 500µl et 1ml.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits bruts se fait après 18 heures.

La mesure des diamètres de croissance de l'hyphe par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule suivante de Chang et al (1999) et Chang et al (2000) :

$$\text{Indice antifongique } (I) = \left(1 - \frac{D_a}{D_b}\right) \times 100$$

Où :

D_a : le diamètre de croissance des boîtes traités (mm).

D_b : le diamètre de croissance du contrôle (mm).

Dans ce cas la lecture est suivie jusqu'au huitième jour pour les huiles essentielles et 48 à 96 heures pour les extraits bruts.

CHAPITRE 5 : Etude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*

Quelle que soit la nature des substances, les terpènes et les flavonoïdes sont utilisés pour réduire l'oxydation des cellules et augmentent la vitalité de l'organisme dans ces flux vitaux. Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'activité antioxydante in vitro par des méthodes les plus utilisées.

✧ Pour les extraits bruts, nous avons :

- Réduction de fer ;
- Piégeage des anions superoxydes ;
- Piégeage du radical libre DPPH[•] ;
- Et piégeage le radical libre DPPH en utilisant la CCM.

✧ Pour les huiles essentielles, la technique adoptée est celle du piégeage du radical libre DPPH[•].

1-Les Extraits bruts des composés phénoliques:

1.1-Réduction de fer :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986) in Rajeshwar et al (2005).

Les différentes concentrations des extraits [0.25; 0.5; 0.75; 1; 2; 3 mg] dans 1ml l'eau distillée sont mélangées avec 2.5ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH6.6) et 2.5ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30min. Après, 2.5ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10min.

A la fin, 2.5ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5ml l'eau distillée et 0.5ml FeCl₃ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

1.2-Piégeage des anions superoxydes :

La méthode modifiée de Markulund et Markulund (1974) est adoptée pour ces essais (Ekanayake et al., 2004).

Elle est basée sur l'inhibition de l'autoxydation du pyrogallol par les composés phénoliques.

Le mélange de départ est constitué par 2.6ml d'une solution tampon phosphate (50 Mm, pH 8.22 ± 0.03) et 0.3ml de l'extrait de la plante dilué. La réaction est initiée par l'addition du 0.1ml du pyrogallol fraîchement préparé (3 mM du pyrogallol dans 10 mM HCL).

L'autoxydation du pyrogallol est mesurée à 325nm. L'absorbance de chaque extrait est suivie chaque 30 secondes pendant 10 minutes pour atteindre les points maximums de l'inhibition.

L'activité de piégeage des radicaux superoxydes (O₂^{-•}) est calculée par la formule suivante (Sun et al., 2001) :

$$S = \frac{(K_0 - K_1)}{K_0} \times 100$$

Où : K₀ : le taux d'autoxydation du pyrogallol sans extrait.

K₁ : le taux de l'oxydation du pyrogallol en présence de l'extrait.

1.3-Piègeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (Contreras-Guzman et Strong, 1982 in Sanchez-Moreno, 2002).

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno et ces collaborateurs (1998).

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g/l est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée. L'absorbance à 515nm est mesurée à des intervalles différents de temps (en secondes) jusqu'à l'obtention du plateau.

La concentration du DPPH[•] en g/l dans le milieu réactionnel est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à des concentrations variées du DPPH[•] [0.0125g/l ; 0.0156g/l ; 0.0187g/l ; 0.0237g/l ; 0.0243g/l ; 0.0247g/l] par une régression linéaire.

$$A_{515nm} = a \times [DPPH^{\bullet}]_t + b$$

Où :

[DPPH[•]]_t est exprimé en g/l.

a : représente la pente

b : représente l'intersection de la courbe avec l'axe des y

Le pourcentage du DPPH[•] résiduel (% DPPH[•]_{res}) est calculé par la formule suivante :

$$\% DPPH^{\bullet}_{res} = [DPPH^{\bullet}]_t / [DPPH^{\bullet}]_{t=0}$$

Où/

[DPPH[•]]_{t=0}: représente la concentration initiale du radical stable sans extrait.

[DPPH[•]]_t: est la concentration du radical restant dans la réaction au niveau du plateau.

Les pourcentages du DPPH[•] résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydante nécessaire pour diminuer la concentration DPPH[•] initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace (efficient concentration value) EC₅₀ et parfois notée IC₅₀. Elle est exprimée en gramme d'extrait sec par rapport au gramme DPPH[•] ou moles d'antioxydant par mole DPPH[•] dans le milieu réactionnel (Sanchez-Moreno, 1999).

Le temps nécessaire pour aboutir à cette valeur est noté T_{EC50} (Sanchez-Moreno, 1998).

On peut déterminer un nouveau paramètre noté l'efficacité antiradicalaire (AE), il est donné par la formule suivante :

$$AE = 1 / EC_{50} \times T_{EC50}$$

1.4-Piègeage du radical DPPH[•] par des composés phénoliques en utilisant CCM :

Cette méthode décrite par Oke et Hamburger (2002) et Mimica-Dukić et al (2003) est basée sur la transformation de la couleur violette du DPPH[•] à sa forme réduite diphenylpicrylhydrazine (DPPH-H) de couleur jaune. Ce réactif forme un complexe avec les groupes hydroxyles présents dans l'extrait brut.

Nous avons procédé à une chromatographie sur couche mince CCM. Une quantité de 2µl de chaque fraction est déposée sur la plaque en plastique du support polyamide, le solvant utilisé est un mélange du n-butanol/acide acétique/eau (BAW). Après développement, la révélation s'effectuait à 365 nm. La fluorescence des spots est marquée à cette longueur d'ondes après pulvérisation de la solution méthanolique DPPH[•] (0.025g/l). La lecture de la plaque se traduit par la notation des couleurs des taches. Les composés phénoliques responsables de l'activité de piégeage sont identifiés par la comparaison du chromatogramme DPPH-CCM avec le témoin.

2-Les huiles essentielles :

2.1-Piégeage du radical libre DPPH[•] :

Les trois huiles essentielles étudiées pour leurs activités antioxydantes sont *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* (Ain Fezza) et *Imula viscosa* (Sidna Youchaa).

La méthode appliquée est celle décrite par **Espin et al (2002)** in **Mimica-Dukić et al (2003)**. Une gamme de concentration choisie des huiles essentielles est mélangée avec 1ml d'une solution méthanolique de DPPH[•] (6.33×10^{-5} mol/l) et complétée jusqu'au volume final à raison de 3 ml par le méthanol absolu.

L'absorbance des solutions est mesurée à 515nm après une heure à la température ambiante. L'acide ascorbique et le trolox [6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2 carboxylic acid (C₁₄ H₁₈ O₄) 97%] sont utilisés comme des contrôles positifs.

La capacité à piéger le radical libre (free radical scavenging capacity) (RSC) en pourcentage est calculée par l'équation suivante :

$$\text{RSC (\%)} = 100 \times (A_b - A_e) / A_b$$

Où :

A_b : est l'absorbance du blanc (sans l'huile essentielle)

A_e : est l'absorbance de l'échantillon.

À partir des valeurs du RSC, nous pouvons déterminer les valeurs EC₅₀ qui représentent les concentrations d'huiles essentielles nécessaires à 50% de neutralisation. Ce paramètre est calculé par l'analyse d'une régression linéaire (**Mimica-Dukić et al., 2003**).

CHAPITRE 1 : Rendements en huiles essentielles

1-Les rendements en huiles essentielles obtenus par hydrodistillation des différentes stations :

Les rendements en huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* sont résumés dans la figure 16.

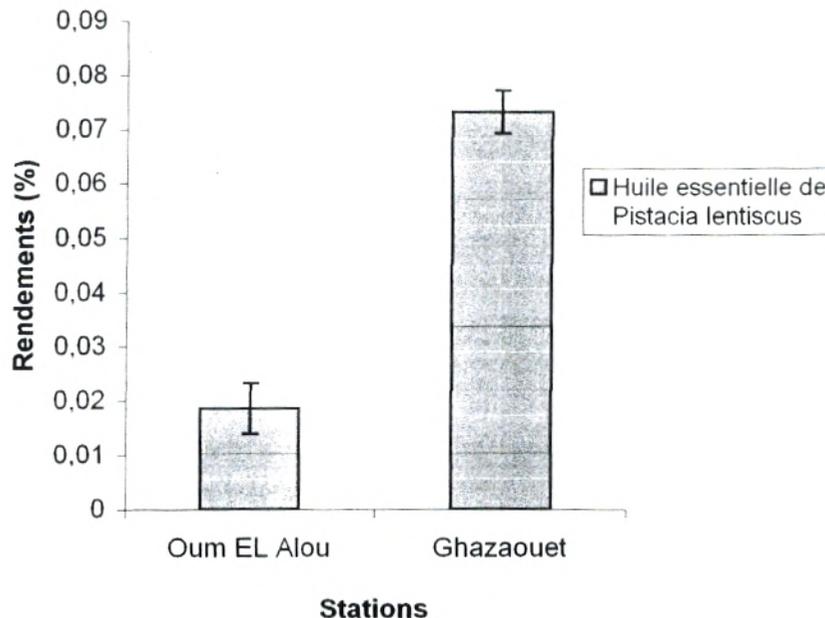


Figure 16 : Les rendements en huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* obtenus par hydrodistillation.

Le rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de la station de Ghazaouet est plus élevé que celle de la station d'Oum El Alou, il est de l'ordre de 0,07% (Figure 16).

L'étage bioclimatique des stations d'Oum El Alou et de Ghazaouet est caractérisé par un climat semi-aride et tempéré et un climat semi-aride et chaud respectivement. Alors que leurs altitudes sont largement différenciées, elles sont de 800m pour la station d'Oum El Alou et 80m pour la station de Ghazaouet (Annexe 4).

2-Les rendements en huiles essentielles obtenus par entraînement à la vapeur d'eau des différentes stations :

Les rendements en huiles essentielles des plantes *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa* sont illustrés dans la figure 17.

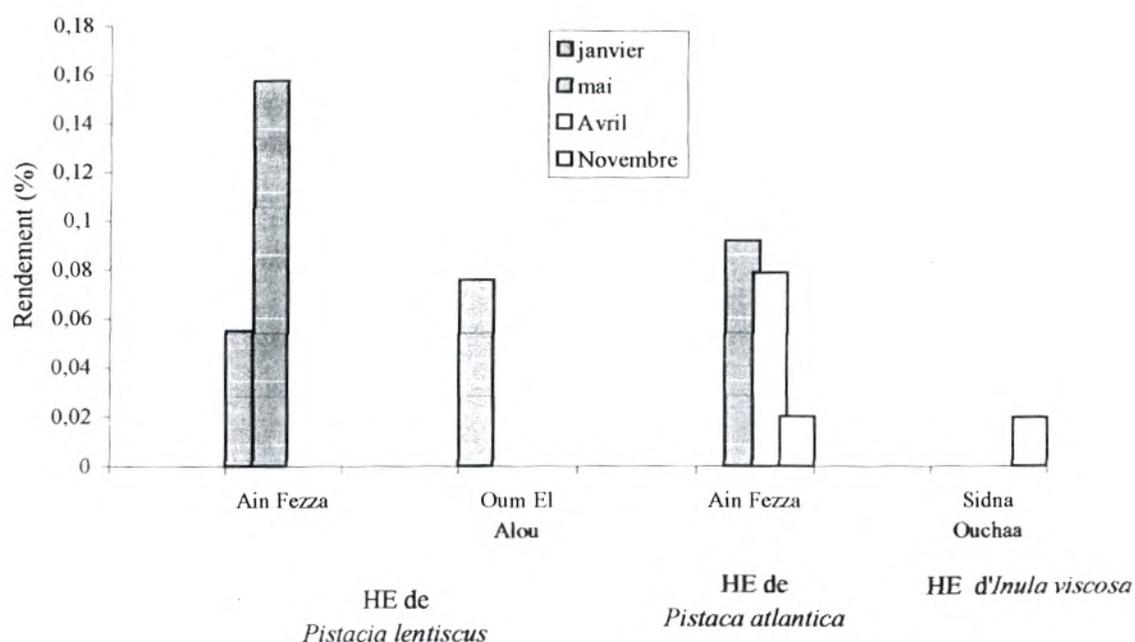


Figure 17 : Les rendements en huiles essentielles de *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* et *Imula viscosa* obtenus par entraînement à la vapeur d'eau.

Nous constatons que le rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de la station d'Oum El Alou égale à 0,07%, il est supérieur à celle de la station d'Ain Fezza qui est de l'ordre de 0,05% pendant la même période du mois de janvier (Figure 17). Cette dernière valeur atteint 0,15% pendant le mois de mai.

Ces deux stations, Oum El Alou et Ain Fezza ont le même climat semi-aride et tempéré avec des altitudes de 800m et 730m respectivement.

Pour la plante *Imula viscosa* de la station de Sidna Youchaa, le rendement en huile essentielle est faible durant le mois de novembre, il est de l'ordre de 0,01%.

Cette station possède un climat semi-aride et chaud et une altitude largement inférieure à ceux des autres stations. Elle est de 40m.

En ce qui concerne la plante *Pistacia atlantica*, nous remarquons une évolution des rendements en huile essentielle depuis le mois de novembre avec un rendement faible de 0,02% qui peut atteindre 0,07% dans le mois d'avril. Cette valeur augmente avec un maximum pendant le mois de mai de l'ordre de 0,09% (Annexe 5).

Ceci implique que la phase de maturité se situe en cette période, c'est à dire le moment de floraison qui a lieu à la fin du printemps.

Ces résultats montrent une différence de l'huile essentielle suivant les étages bioclimatiques, l'altitude, le climat et la période de la récolte de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*.

La comparaison de nos résultats à certains travaux cités dans le tableau 9 nous révèle que les rendements en huiles essentielles de nos échantillons sont nettement inférieurs. Les raisons pour cette variabilité de la quantité en huile essentielle peuvent être expliquées par les différences des conditions environnementales, climatiques, géographiques, la période de la récolte, la technique de distillation (Panizzi et al., 1993 in Lahlou, 2004).

La production des huiles essentielles et aromatiques à partir de la plante résulte d'une série de régulation physiologique, biochimique, métabolique et génétique (Sangwan *et al.*, 2001 *in* Costa *et al.*, 2003; Muller-Riebau *et al.*, 1997 *in* Costa *et al.*, 2003).

Tableau 7 : Les travaux antérieurs sur les rendements en huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa*.

| Plantes | Rendement (%) | | Mois de la récolte | Références |
|--|--|--------------------------|---|--|
| | Hydrodistillation | Entraînement à la vapeur | | |
| <i>P. lentiscus</i> (feuilles) | | 0,5 0,36 2 | Mai Mai -juillet | Magiatis <i>et al</i> (1999) Bonsignore <i>et al</i> (1998) Magiatis <i>et al</i> (1999) ; Wyllie <i>et al</i> (1990); Castola <i>et al</i> (2000) <i>in</i> Delazar <i>et al</i> (2004). |
| | 0,4 - 0,5 0,2 0,05 - 0,1 0,30 | | Juillet Octobre Mars-octobre juillet | De Pooter <i>et al</i> (1991) Boelens <i>et al</i> (1991) Castola <i>et al</i> (2000) Duru <i>et al</i> (2003) |
| <i>P. atlantica</i> (feuilles) | 0,2 | | Juillet | Barrero <i>et al</i> (2005) |
| <i>I. viscosa</i> (Partie aérienne) | | 0,04 0,08 | Novembre Juillet | Spiteri (1998) |
| <i>I. viscosa</i> (feuilles) | 0,18 | | Septembre | Costa <i>et al</i> (2003) |

CHAPITRE 2 : Analyse des huiles essentielles des plantes *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* par CPG/RMN C¹³

Les analyses des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* (station Ain Fezza) et *Pistacia lentiscus* (stations : Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet) sont effectuées par l'équipe de chimie et biomasse, université de CORSE -CNRS.

1-Identification des constituants des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* :

Les huiles essentielles des feuilles de *Pistacia atlantica* de la station de Ain Fezza et *Pistacia lentiscus* des stations de Ghazaouet et d'Oum El Alou durant le mois de novembre sont obtenues par l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation respectivement. Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* des deux stations, Ain Fezza et Oum El Alou sont obtenues par l'entraînement à la vapeur pendant le mois de janvier. Les composés identifiés de deux espèces végétales sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia atlantica* de Ain Fezza (A) et *Pistacia lentiscus* de Ghazaouet (G), Ain Fezza (A) et Oum El Alou (OM).

| Composés identifiés | <i>P.lentiscus</i> | <i>P.lentiscus</i> | <i>P.lentiscus</i> | <i>P.lentiscus</i> | <i>P. atlantica</i> |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | OM (Ent) | OM (Hyd) | A(Ent) | G (Hyd) | A (Ent) |
| | Janvier | Novembre | Janvier | Novembre | Novembre |
| Monoterpènes hydrocarbonés | | | | | |
| α -pinène | 3,9 | 7,8 | 11,0 | 4,4 | 3,6 |
| Camphène | 1,2 | 1,4 | 0,4 | 0,4 | 0,7 |
| sabinène | 2,7 | 1,0 | 9,4 | 0,2 | 4,2 |
| β -pinène | 1,1 | 4,0 | 2,4 | 2,9 | 1,3 |
| myrcène | 33,0 | 3,5 | 2,3 | 1,2 | 0,8 |
| α -phellandrène | 6,2 | 1,3 | 1,0 | - | 0,2 |
| Para cymène | | 1,1 | 1,3 | - | 2,6 |
| Limonène | 5,3* | 3,2 | 3,4 | 15,7 | 0,5* |
| β -phellandrène | 0,9* | - | - | - | 0,6* |
| γ -terpinène | 0,8 | 0,6 | 1,7 | - | 2,0 |
| terpinolène | | 0,5 | | | 0,8 |
| Monoterpènes oxygénés | | | | | |
| Terpinèn-4-ol | 0,5 | 0,8 | 1,6 | - | 2,7 |
| Acétate de bornyle | 1,0 | 2,4 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | | | | | |
| α -copaène | | | | | 0,4 |
| β -caryophyllène | 7,0 | 8,8 | 6,7 | 11,4 | 12,1 |
| β -gurjunène | | | | | 0,6 |
| α -humulène | 1,8 | 2,7 | 0,9 | 2,1 | 1,9 |
| γ -muurolène | 2,3 | 3,0 | - | 1,3 | 1,4 |
| D-germacrène | 11,5 | 13,1 | 8,8 | 19,2 | 7,9 |
| α -muurolène | | | | | 0,9 |
| γ -cadinène | | 2,9 | | | 4,3 |
| Bicyclogermacrène | | | | | 5,0 |
| lédène | | 1,0 | | | 0,9 |
| δ -cadinène | 4,7 | 7,7 | 1,5 | 3,1 | 3,4 |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | | | |
| spathuléol | | | | | 1,1 |
| t-muurolol | | 1,1 | | | 0,3 |
| t-cadinol | | 1,3 | | 1,6 | 1,2 |
| total | 83,9 | 69,2 | 83,3 | 74,2 | 62,3 |

NB : Pour *Pistacia atlantica*, 5 sesquiterpènes entre 1 et 4% (total 15%) n'ont été identifiés. (-) sous forme de trace.

Hyd : représente l'extraction par l'hydrodistillation.

Ent : représente l'extraction par entraînement à la vapeur.

L'analyse de ces huiles essentielles nous a permis d'enregistrer leurs chromatogrammes et l'identification des constituants est effectuée par RMN C¹³.

Nous constatons que pour l'ensemble des échantillons d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, la nature des constituants est quasiment la même à l'exception de certains composés. Cependant, leurs teneurs différent dont 83,9% et 69,2% sont équivalent à l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation respectivement.

La teneur totale en composés dans l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de Ain Fezza égale à 83,3% alors que 74,2% caractérise l'huile essentielle de Ghazaouet. Nous avons pu identifier 13 à 21 composés dans l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* des deux stations différentes, Ghazaouet et Oum El Alou dont les composés majoritaires sont le limonène et D-germacrène respectivement.

En ce qui concerne les échantillons d'huile essentielle par entraînement à la vapeur des stations Ain Fezza et Oum El Alou, nous identifions 15 et 16 composés respectivement, alors que les deux composés majoritaires sont le α -pinène et le myrcène.

Dans l'huile essentielle de *Pistacia atlantica* du mois de novembre, 27 constituants sont mis en évidence dont le total égale à 62,3%, le composé majoritaire est le β -caryophyllène (12,1%).

Nous n'avons pas pu identifier 5 sesquiterpènes entre 1 et 4% qui représentent 15%.

Par ailleurs, 6 composés (γ -muurolène; terpinen-4-ol ; γ -terpinène ; para cymène ; α -phellandrene; β -phellandrene) sont trouvés dans certains échantillons et sont absents dans d'autres, ou bien ils existent sous forme de trace à l'exception du para cymène qui est absent complètement dans l'huile essentielle d'Oum El Alou par entraînement à la vapeur.

2-Détermination des races chimiques :

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce; ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes.

Le mot chémotype - on dit aussi race chimique- est dérivé de chimiotype ou chimiovariété. Cette variation peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou même d'un individu à l'autre et peut être due à des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude et les facteurs endogènes et la composition génétique des individus.

A fin de déterminer la race chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, nous nous sommes basés sur les différentes stations d'étude durant la même période.

Pour cela les résultats obtenus par l'analyse CPG/RMN C¹³ des échantillons d'huiles essentielles extraites des feuilles des différentes stations Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet, nous amènent à supposer que nous sommes en présence de quatre chimiotypes:

- ❖ Station de Ain Fezza :
 - Chimiotype à α -pinène (A) pour l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur (Figure 19).
- ❖ Station d'Oum El Alou :
 - Chimiotype à myrcène (B) pour l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur (Figure 18).
 - Chimiotype à D-germacrène (D) pour l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation (Figure 21).
- ❖ Station de Ghazaouet :
 - Chimiotype à limonène (C) pour l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation (Figure 20).

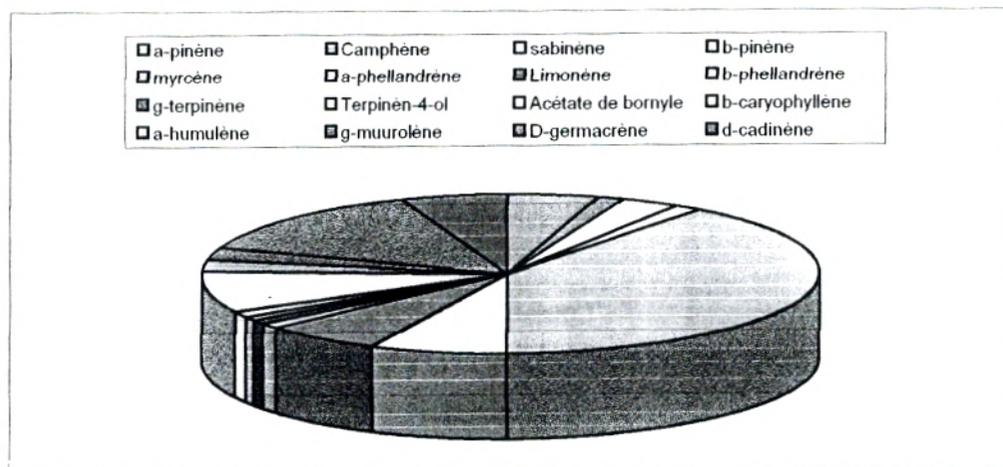


Figure 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* d'Oum El Alou (chimiotype (B) : myrcène)

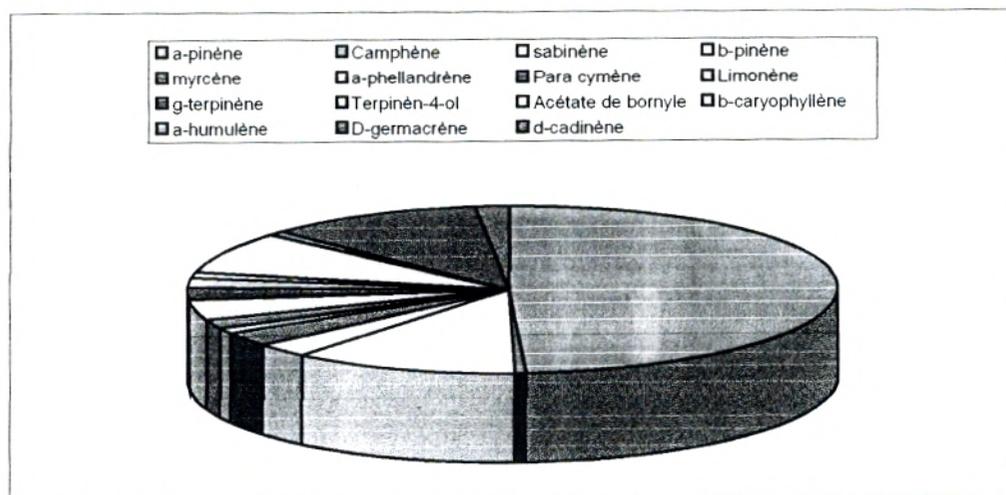


Figure 19 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de Ain Fezza (chimiotype (A) : α -pinène)

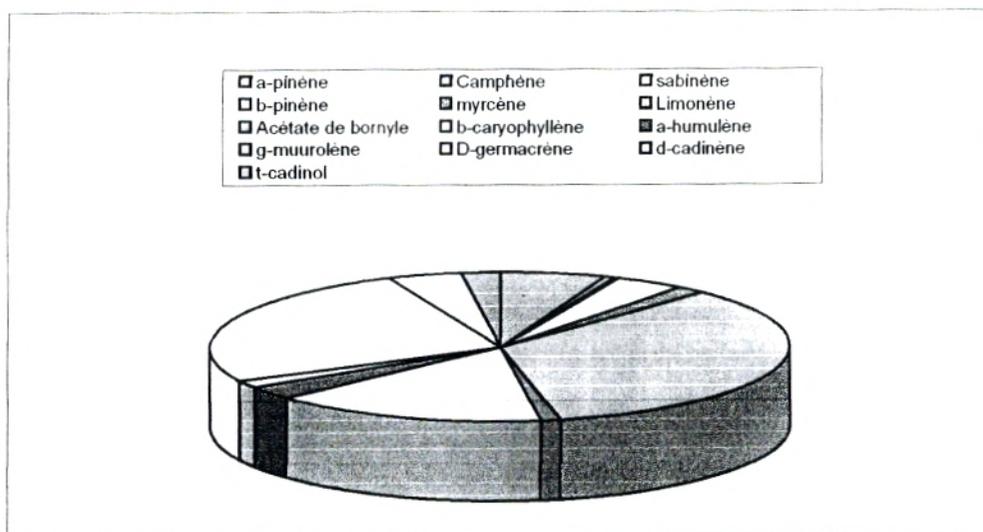


Figure 20 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de Ghazaouet (chimiotype (C) : **limonène**)

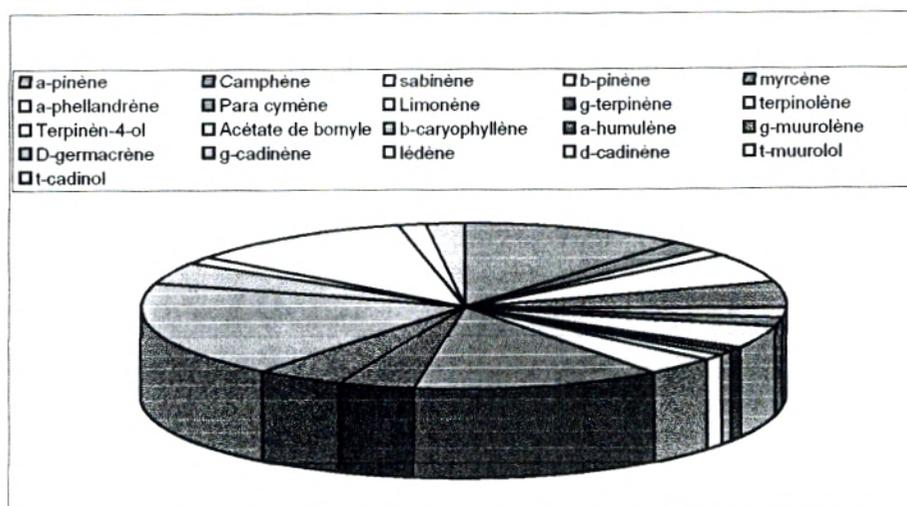


Figure 21 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* d'Oum El Alou (chimiotype (D) : **D-germacrène**)

L'huile essentielle de chimiotype (A) présente une teneur en α -pinène de l'ordre de 41%. Elle renferme également des quantités appréciables en d'autres composés : sabinène (9,4%), D-germacrène (8,8%), β -caryophyllène (6,7%), limonène (3,4%), β -pinène (2,4%) et myrcène (2,3%).

Pour l'huile essentielle de chimiotype (B), le **myrcène** qui est le composé majoritaire présente une teneur de 33%. Elle renferme d'autres composés qui sont : D-germacrène (11,5%), β -caryophyllène (7%), α -phellandrène (6,2%), limonène (5,3%), δ -cadinène (4,7%), α -pinène (3,9%), sabinène (2,7%) et γ -muurolène (2,3%).

L'huile essentielle appartenant au type chimique (C) présente une teneur en principe actif qui est le **limonène** de l'ordre de 25,5% suivi par D-germacrène (19,2%) et β -caryophyllène (11,4%). Elle renferme aussi des quantités moins importantes de α -pinène (4,4%), δ -cadinène (3,1%), β -pinène (2,9%) et α -humulène (2,1%).

En ce qui concerne l'huile essentielle de chimiotype (D), les teneurs en composés sont inférieurs par rapport aux autres huiles essentielles dont le principe actif, **D-germacrène** est représenté par 13,1%. D'autres composés existent en moindres quantités qui sont : β -caryophyllène (8,8%), α -pinène (7,8%), δ -cadinène (7,7%), β -pinène (4%), myrcène (3,5%), limonène (3,2%), γ -muurolène (3%), γ -cadinène (2,9%), α -humulène (2,7%) et acétate de bornyle (2,4%).

Pour l'huile essentielle de *Pistacia atlantica* (Figure 22), nous adoptons un chimiotype à **β -caryophyllène** de l'ordre de 12,1%. Ce type est caractérisé par l'existence d'autres composés, parmi eux, nous citons : D-germacrène (7,9%), bicyclogermacrène (5%), γ -cadinène (4,3%), sabinène (4,2%), α -pinène (3,6%), δ -cadinène (3,4%), terpinèn-4-ol (2,7%), para cymène (2,6%) et γ -terpinène (2%).

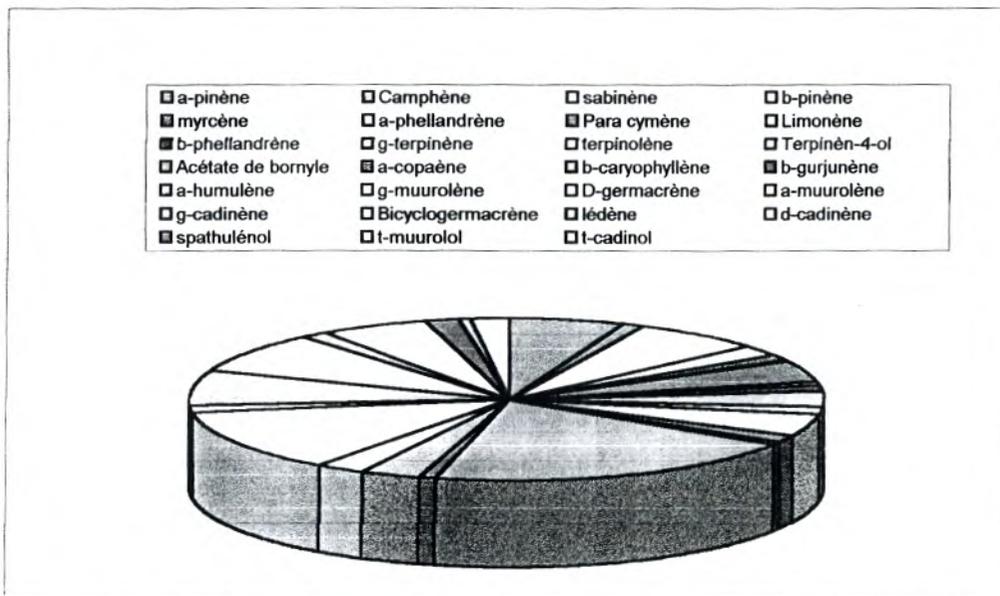


Figure 22 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia atlantica* de Ain Fezza (chimiotype β -caryophyllène).

Dans l'ensemble des chimiotypes (A, B, C et D), d'autre distribution des composés en quantités infimes a été montrée qui varie entre 0,2% et 1,9% et partagée entre les monoterpènes hydrocarbonés, les monoterpènes oxygénés, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés.

Les 4 chimiotypes d'huiles essentielles montrent une différence dans la composition chimique non seulement de la teneur en composé majoritaire mais aussi d'autres composés minoritaires. Cette différence est très claire de nos échantillons d'Oum El Alou, ceci est due probablement à la période de la récolte (janvier et novembre) (Muller-Riebau et al., 1997 in Costa et al., 2003).

La comparaison de nos résultats obtenus par l'analyse des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* des différentes stations par CPG/RMN C¹³ à ceux obtenus avec Magiatis et al (1999) et Boelens et al (1991) par CPG/SM sont conformes en ce qui concerne le chimiotype (B). Ces auteurs ont révélé des teneurs en myrcène de l'ordre de 19,25% (Boelens et al., 1991) et 20,58% (Magiatis et al., 1999) par rapport à 33% dans notre échantillon.

Le chimiotype α -pinène de notre huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est comparable à celui trouvé par certains auteurs (Daferea et al., 2002; Wyllie et al., 1990; Castola et al., 2000 in Delazar et al., 2004). La teneur élevée de ce composé est de l'ordre de 64,43% à 86,3% par rapport à 41% dans notre huile essentielle.

L'étude phytochimique de *Pistacia lentiscus* d'Egypte révèle que l'huile essentielle de cette plante obtenue par hydrodistillation présente de forte teneur de car-3-ène de l'ordre de 65,3% mais ne contienne qu'une faible teneur en α -pinène (1%), myrcène (1,3%) et limonène (4,6%) (De Pooter et Schapm, 1991).

Duru et al (2003) ont mis en évidence, outre le composé majoritaire (terpinèn-4-ol : 29,9%), le α -terpineol (11,6%), le limonène (10,6%) et α -pinène (4,2%).

D'après nos connaissances, une seule étude récente sur l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia atlantica* a été réalisée par Barrero et al (2005). Ils ont trouvé que les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés (41,1%) sont prédominants dont le terpinen-4-ol (21,7%) et l'elemol (20%) sont des composés abondants.

Les huiles essentielles citées par ces derniers auteurs sont de type chimique différent de nos échantillons. Cette différence peut être liée à l'origine botanique de l'espèce productrice, aux conditions environnementaux et au stade de maturité (Muller-Riebau et al., 1997 in Costa et al., 2003).

CHAPITRE 3 :

1-Teneurs en phénols totaux des 3 espèces végétales : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* :

1.1-Rendements des extraits bruts obtenus :

Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits bruts des composés phénoliques du *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* et *Inula viscosa*, nous avons effectué des extractions par l'éthanol. Les extraits bruts éthanoliques sont de couleur verte, peu odorants ayant un aspect visqueux. La quantité des composés phénoliques totaux dans les extraits est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg équivalent pyrocatechol par g d'extrait sec.

L'équation est donnée ci dessous :

$$\text{Absorbance} = 0,0198 X + 0,1283 \quad / \quad R^2 = 0,9917$$

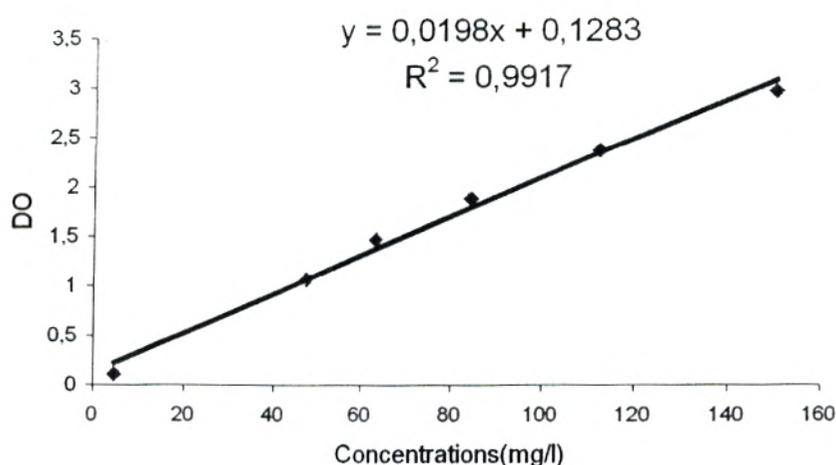


Figure 23 : Courbe d'étalonnage du pyrocatechol.

Le tableau 9 résume les rendements et les teneurs en phénols totaux des extraits bruts de ces plantes.

Tableau 9 : Rendements et phénols totaux dans les extraits bruts.

| Matériel végétal | Origine | Extrait brut (g) | Rendement (%) | Phénols totaux (mg/g) |
|---------------------------|------------------|------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Pistacia atlantica</i> | Ain Fezza | 4,055 ± 1,4 | 8,11 ± 2,9 | 1,96 ± 0,70 |
| <i>Inula viscosa</i> | Sidna Youchaa | 5,455 ± 4,2 | 10,91 ± 8,4 | 1,46 ± 1,13 |
| <i>Pistacia lentiscus</i> | Oun El Alou | 6,32 ± 0,4 | 12,64 ± 0,79 | 0,90 ± 0,05 |

NB : Phénols totaux exprimés en mg équivalent pyrocatechol / g d'extrait sec.

Si on considère seulement la comparaison des rendements, nous constatons que *Pistacia lentiscus* possède un rendement élevé à raison de 12,64%

Les pourcentages 10,91 et 8,11% caractérisent les plantes *Inula viscosa* et *Pistacia atlantica*. En ce qui concerne le genre *Pistacia*, l'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction des feuilles de *P.vera*, *P.terebinthus* et *P.lentiscus* par **Kordali et al (2003)** permet d'obtenir un rendement qui varie entre 11,32 et 16,59% par rapport à 8,11 et 12,64% de nos échantillons.

Nous retrouvons presque les mêmes résultats évoqués par ces auteurs cités auparavant.

1.2-Teneurs en phénols totaux :

Chez les 3 espèces végétales, la quantité élevée de phénols totaux est trouvée dans l'extrait du *Pistacia atlantica* de l'ordre de 1,96 mg/g d'extrait sec.

En effet, les quantités phénoliques d'*Inula viscosa* et *Pistacia lentiscus* sont égales à 1,46 et 0,90 mg/g d'extrait sec respectivement (Tableau 9, Figure 24).

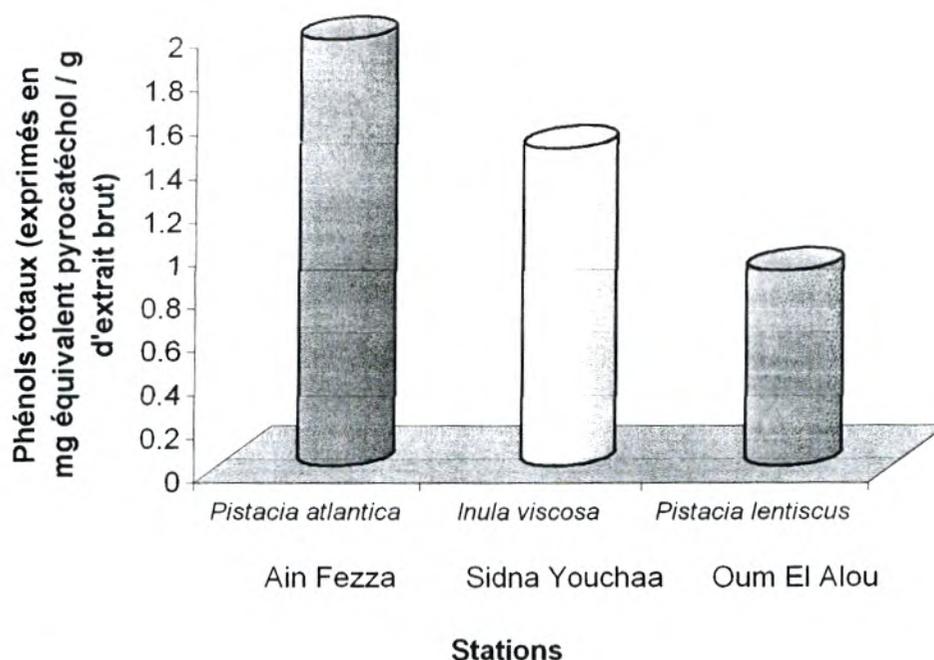


Figure 24 : Les phénols totaux des extraits bruts de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

Il existe très peu de travaux portant sur les composés phénoliques du genre *Pistacia*. Une seule étude a été faite par **Romani et al (2002)** qui ont pu montrer que la quantité des phénols des feuilles de *Pistacia lentiscus* est plus élevée de 7,5%.

Nous avons estimé de comparer nos résultats à certaines plantes de différentes familles. Nous citons à titre d'exemple les composés phénoliques totaux de différentes stations de basilic (*Ocimum basilicum*) étudiés par **Javanmardi et al (2003)**.

Ces auteurs montrent que le taux en phénols totaux de cette plante varie entre 22,9 et 65,5 mg équivalent à l'acide gallique /g d'extrait sec. Cette quantité est supérieure à celle de nos échantillons et aux autres plantes de la famille Lamiaceae comme *Thymus vulgaris* (**Kähkönen et al., 1999 in Javanmardi et al., 2003**), *Mentha piperita*, *Melissa officinalis* et *Rosmarinus officinalis* (**Theng et Wang, 2001 in Javanmardi et al., 2003**).

En effet, les extraits de *P.lentiscus*, *P.atlantica* et *I.viscosa* présentent des quantités des phénols totaux inférieures à celle de l'extrait de thé d'Oolong (Chine) (60,6µg équivalent à l'acide gallique / 200µg d'extrait sec) (Karadeniz et al., 2005).

En ce qui concerne *Inula viscosa*, l'utilisation comme solvant d'extraction d'acétate d'éthyle permet d'obtenir un rendement en mélange flavonique sec de 1,25% (Öksüz, 1977).

2-Analyse qualitative des composés phénoliques :

2.1- Pool flavonique des fractions obtenues par l'acétate d'éthyle et n-butanol :

Les analyses effectuées ont montré sous l'UV différentes fluorescences correspondantes à des flavonols, des flavones et des acides phénols (Mabry et al., 1970 in Heimeur et al., 2004).

2.2-Séparation des composés phénoliques :

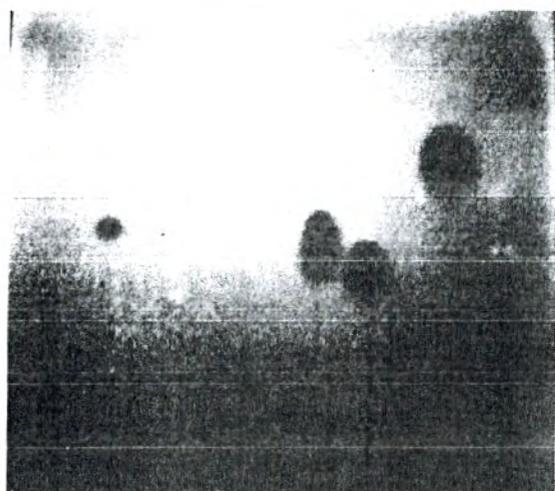
Nous avons utilisé les techniques de séparation par CCM réalisées par Markham (1982) ; Jeffery et Christi Nea (1983) in Heimeur et al (2004) ; Bekkara et al (1998). Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux (10,11) et les figures (25, 26, 27). Cette méthode sépare les composés monomères et dimères en utilisant deux systèmes et supports suivants :

- ❖ Système 1 : Chloroforme/Méthanol/Eau/Acide acétique (CMEA) (100/15/0,5/0,3) pour la plaque de gel de silice.
- ❖ Système 2 : Butanol/Acide acétique/Eau (BAW)(4/1/5) pour la plaque polyamide.

Tableau 10 : Les composés phénoliques de la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol de *Pistacia lentiscus* (feuilles), *Pistacia atlantica* (feuilles) et *Imula viscosa* (feuilles + fleurs) (Système 1).

- ❖ Solvant : Chloroforme/Méthanol/Eau/Acide acétique : 100/15/0,5/0,3.
- ❖ Adsorbant : Gel de silice.

| | Extrait par | Extrait acétate d'éthyle | RF | Révélation UV 365 nm | Révélation UV 254 nm | Extrait n-BUOH | RF | Révélation UV 365 nm | Révélation UV 254 nm | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------|----------------------|----------------------|----------------|------|----------------------|----------------------|--------|
| <i>P. atlantica</i> (Ain Fezza) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,02 | Rouge | | 1 | 0,01 | | Marron | |
| | | 2 | 0,05 | | | 2 | 0,04 | | | Bleu |
| | | 3 | 0,07 | | | 3 | 0,07 | | | Violet |
| | | 4 | 0,96 | | | 4 | 0,12 | | | |
| | | 5 | | | | 5 | 0,26 | | | |
| | | 6 | | | | 6 | 0,56 | | | Jaune |
| <i>P. lentiscus</i> (Oum El Alou) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,02 | Rouge | | 1 | 0,02 | Blanc | Blanc | |
| | | 2 | 0,05 | | | 2 | 0,03 | | | Blanc |
| | | 3 | 0,91 | | | 3 | 0,04 | | | |
| | | 4 | | | | 4 | 0,08 | | | Blanc |
| | | 5 | | | | 5 | 0,10 | | | |
| | Méthanol (Les feuilles) | 1 | 0,01 | Jaune | | 1 | 0,01 | Blanc | Jaune | |
| | | 2 | 0,04 | | | 2 | 0,03 | | | Blanc |
| | | 3 | 0,06 | | | 3 | 0,06 | | | Blanc |
| | | 4 | 0,08 | | | 4 | 0,08 | | | Violet |
| | | 5 | 0,10 | | | 5 | 0,15 | | | Bleu |
| | | 6 | 0,12 | | | 6 | 0,20 | | | |
| 7 | 0,15 | 7 | 0,25 | Marron | | | | | | |
| 8 | 0,24 | 8 | 0,76 | Violet | | | | | | |
| 9 | 0,49 | | | | | | | | | |
| 10 | 0,80 | | | | | | | | | |
| 11 | 0,94 | | | | | | | | | |
| <i>I. viscosa</i> (Sidna Youchaa) | Méthanol (Les feuilles + fleurs) | 1 | 0,03 | Violet | | 1 | 0,02 | Blanc | | |
| | | 2 | 0,06 | | | 2 | 0,20 | | | Bleu |
| | | 3 | 0,15 | | | 3 | 0,73 | | | Bleu |
| | | 4 | 0,23 | | | | | | | |
| | | 5 | 0,24 | | | Jaune | | | | Jaune |
| | | 6 | 0,30 | | | Violet | | | | Violet |
| | | 7 | 0,40 | | | | | | | Violet |
| | | 8 | 0,54 | | | | | | | Blanc |
| | | 9 | 0,58 | | | | | | | Violet |
| | | 10 | 0,65 | | | | | | | Violet |
| | | 11 | 0,73 | | | | | | | Violet |
| | Ethanol (Les feuilles + fleurs) | 1 | 0,57 | Bleu Rouge | | | 1 | 0,95 | Rouge | |
| 2 | 0,95 | | | | | | | | | |

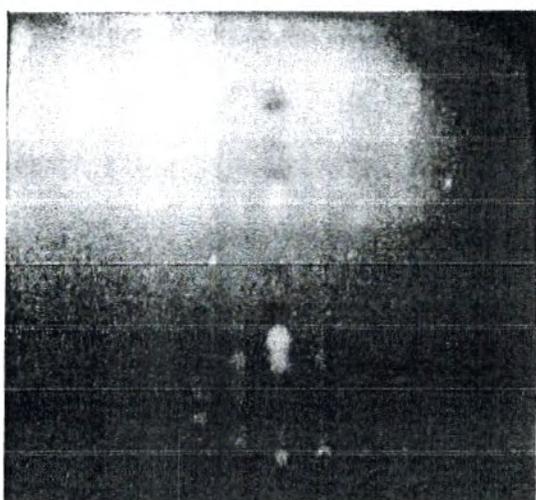


Solvant : Chloroforme/Méthanol/eau/acide acétique (100/15/0,5/0,3)
Adsorbant : Gel de silice.
 UV : 254nm.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

(1) : Rutine ; (2) : Acide vanillique ; (3) : Acide para-coumarique ; (4) : Acide férulique ;
 (5) : Dihydroquercétine ; (6) : Acide syringique ; (7) : Myricétine ; (8) : Résorcinol ;
 (9) : Hydroquinone ; (10) : Phloroglucinol ; (11) : Pyrocatechol ; (12) : Acide gallique ;
 (13) : Quercetagine

Figure 25 : Chromatographie sur couche mince des témoins.



Solvant : Chloroforme/Méthanol/eau/acide acétique (100/15/0,5/0,3)
Adsorbant : Gel de silice.
 UV : 254nm.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

(1) : acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique de *Pistacia atlantica* ; (2) : n-butanol de l'extrait éthanolique de *Pistacia atlantica* ; (3) : acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* ; (4) : n-butanol de l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* ; (5) : acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Pistacia lentiscus* ; (6) : n-butanol de l'extrait méthanolique de *Pistacia lentiscus* ; (7) : acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique d'*Imula viscosa* ; (8) : n-butanol de l'extrait méthanolique d'*Imula viscosa* ; (9) : acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique d'*Imula viscosa* ; (10) : n-butanol de l'extrait éthanolique d'*Imula viscosa* ; (11) : Dihydroquercétine ; (12) : Acide gallique ; (13) : Acide para-coumarique.

Figure 26 : Chromatographie sur couche mince du pool flavonique des deux fractions (Acétate d'éthyle et n-butanol) de *Pistacia lentiscus* (feuilles), *Pistacia atlantica* (feuilles) et *Imula viscosa* (feuilles+ fleurs) (Système 1).

Tableau 11 : Les composés phénoliques de la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol de *Pistacia lentiscus* (feuilles), *Pistacia atlantica* (feuilles) et *Inula viscosa* (feuilles + fleurs) (Système 2).

❖ Solvant : Butanol/acide acétique/eau : 4/1/5.

❖ Adsorbant : Polyamide

| | Extrait par | Extrait acétate d'éthyle | RF | Révélation UV 365 nm | Extrait n-BUOH | RF | Révélation UV 365 nm |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------|----------------------|----------------|------|----------------------|
| <i>P. atlantica</i> (Ain Fezza) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,10 | Violet | 1 | 0,15 | Violet |
| | | 2 | 0,21 | Marron | 2 | 0,25 | Marron |
| | | 3 | 0,44 | Violet | 3 | 0,39 | Bleu -violet |
| | | 4 | 0,54 | Jaune | 4 | 0,46 | Violet |
| | | 5 | 0,70 | Jaune | 5 | 0,54 | Violet |
| | | 6 | 0,80 | Violet | 6 | 0,57 | Jaune |
| | | 7 | | | 7 | 0,70 | Jaune |
| | | 8 | | | 8 | 0,80 | Violet |
| <i>P. lentiscus</i> (Oum El Alou) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,10 | Violet | 1 | 0,12 | Violet |
| | | 2 | 0,17 | Violet | 2 | 0,17 | Marron |
| | | 3 | 0,21 | Marron | 3 | 0,20 | Violet |
| | | 4 | 0,68 | Violet | 4 | 0,23 | Bleu |
| | | 5 | 0,80 | Violet | 5 | 0,39 | Violet |
| | | | | | 6 | 0,50 | Violet |
| | | | | | 7 | 0,55 | Jaune |
| | | | | | 8 | 0,68 | Marron |
| | | | | | 9 | 0,71 | Violet |
| | | | | | 10 | 0,80 | Violet |
| <i>I. viscosa</i> (Sidna Youchaa) | Méthanol (Les feuilles + fleurs) | 1 | 0,28 | Jaune | 1 | 0,25 | Blanc |
| | | 2 | 0,40 | Blanc | 2 | 0,44 | Blanc |
| | | 3 | 0,42 | Jaune | 3 | 0,54 | Jaune |
| | | 4 | 0,58 | Marron | 4 | 0,64 | Blanc |
| | | 5 | 0,62 | Violet | 5 | 0,71 | Blanc |
| | | | | | 6 | 0,78 | Marron |

Nous constatons que le méthanol sépare un maximum de produits dans l'extrait acétate d'éthyle que l'éthanol, il très remarquable dans le cas de *Pistacia lentiscus* et *Inula viscosa* où les taches peuvent atteindre 11 spots dans le cas du système 1 (Chloroforme /Méthanol/ Eau/ Acide acétique).

Pour le système 2 (BAW), les extraits butanoliques de ces trois plantes nous séparent plusieurs composés allant de 6 à 10 composés.

En effet, les deux fractions (n-butanol et acétate d'éthyle) nous révèlent les mêmes composés.

Système 1 (Tableau 10) :

- ★ Pour *P. atlantica*, nous avons mis en évidence par l'extrait éthanolique 4 composés dans l'extrait acétate d'éthyle et 6 composés dans l'extrait butanolique.
- ★ Pour *P. lentiscus*, le nombre de taches varie entre 3 composés (cas d'éthanol) et 11 composés (cas du méthanol) dans l'extrait d'acétate d'éthyle, tandis que l'extrait butanolique nous révèle 5 composés par l'extraction éthanolique et 8 composés par l'extraction méthanolique.

- ★ Pour *I. viscosa*, l'extrait méthanolique présente 11 composés dans l'extrait d'acétate d'éthyle et 3 composés dans l'extrait butanolique.
Par contre, l'extrait éthanolique nous révèle 2 composés dans l'extrait d'acétate d'éthyle et un seul composé dans l'extrait butanolique.

Systeme2 (Tableau 11) :

L'extraction par l'éthanol de *P. atlantica* nous a permis de séparer 6 composés dans l'extrait acétate d'éthyle et 8 composés dans l'extrait butanolique.

L'extrait éthanolique de *P. lentiscus* présente un maximum des produits au nombre de 10 dans l'extrait butanolique et 5 composés dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

L'extrait méthanolique de *I. viscosa* nous permet d'obtenir 5 composés dans l'extrait acétate d'éthyle et 6 composés dans l'extrait butylique.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Solvant : Butanol/acide acétique/eau
(4/1/5).

Adsorbant: Polyamide DC₆

UV: 365nm.

(1) : acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique d'*Imula viscosa*; (2) : n-butanol de l'extrait méthanolique d'*Imula viscosa*; (3) et (5) : acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus*; (4) : n-butanol de l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus*; (6) : acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique de *Pistacia atlantica*; (7) : n-butanol de l'extrait éthanolique de *Pistacia atlantica*; (8) : Acide gallique; (9) : Quercetagétine; (10) : Hydroquinone; (11) : Myricétine; (12) : Rutine; (13) : Acide para-coumarique.

Figure 27 : Chromatographie sur couche mince du pool flavonique des deux fractions (Acétate d'éthyle et n-butanol) de *Pistacia lentiscus* (feuilles), *Pistacia atlantica* (feuilles) et *Imula viscosa* (feuilles+ fleurs) (Systeme 2).

2.3-Essai d'identification des composés phénoliques en utilisant certains témoins de flavonoïdes :

Nous avons comparé nos fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol avec les 13 témoins qui sont les suivants : rutine, acide vanillique, acide férulique, dihydroquercétine, acide syringique, myricétine, résorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, quercétagine, acide gallique, acide para-coumarique et pyrocatechol.

Les tableaux (12, 13) résument les résultats des témoins obtenus avec le système 1(CMEA) et le système 2 (BAW).

Tableau 12 : La CCM des témoins des composés phénoliques par le système1 (CMEA).

| Témoins | RF | Révélation UV 365 nm | Révélation UV 254 nm | Classes phénoliques |
|-------------------------|------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| ✓ Rutine | / | | | Flavone |
| ✓ Acide vanillique | / | | | Acide phénol |
| ✓ Acide para-coumarique | 0,47 | | Violet | Acide phénol |
| ✓ Acide férulique | 0,55 | Bleu | Bleu | Acide phénol |
| ✓ Dihydroquercétine | / | | | Flavonol |
| ✓ Acide syringique | 0,58 | | Bleu-violet | Acide phénol |
| ✓ Myricétine | 0,08 | Jaune | Jaune | Flavonol |
| ✓ Résorcinol | 0,40 | Violet | Violet | Phénol simple |
| ✓ Hydroquinone | 0,36 | Violet | Violet | Phénol simple |
| ✓ Phloroglucinol | 0,08 | Marron | Marron | Phénol simple |
| ✓ Quercétagine | / | | | Flavonol |
| ✓ Acide gallique | 0,05 | Bleu -Violet | Bleu -Violet | Acide phénol |
| ✓ Pyrocatechol | 0,58 | Violet | Violet | Phénol simple |

Tableau 13 : La CCM des témoins des composés phénoliques par le système2 (BAW).

| Témoins | RF | Révélation UV 365 nm | Classes phénoliques |
|-------------------------|------|-------------------------|---------------------|
| ✓ Acide gallique | 0,46 | Violet | Acide phénol |
| ✓ Quercétagine | 0,34 | Marron | Flavonol |
| ✓ Hydroquinone | 0,77 | Violet | Phénol simple |
| ✓ Myricétine | 0,62 | Violet | Flavonol |
| ✓ Rutine | 0,78 | Marron | Flavone |
| ✓ Acide para-coumarique | 0,80 | violet | Acide phénol |

L'identification des composés phénoliques des 3 plantes : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa* est résumée sur le tableau 14.

Tableau 14 : Composés identifiés dans les deux systèmes.

| Systèmes | Extrait par | Système 1 | | | | Système 2 | | | |
|--------------------|-------------|---------------------------|------|--------------------|------|---------------------------|------|--------------------|------|
| | | Fraction acétate d'éthyle | | Fraction butylique | | Fraction acétate d'éthyle | | Fraction butylique | |
| | | Composé | RF | Composé | RF | Composé | RF | Composé | RF |
| <i>P.atlantica</i> | Ethanol | Acide gallique | 0,05 | Acide gallique | 0,05 | Acide p-coumarique | 0,80 | Acide gallique | 0,46 |
| | | | | | | | | Acide p-coumarique | 0,80 |
| <i>P.lentiscus</i> | Ethanol | Acide gallique | 0,05 | | | Acide p-coumarique | 0,80 | Acide p-coumarique | 0,80 |
| | Méthanol | Myricétine | 0,08 | | | | | | |
| <i>I.viscosa</i> | Méthanol | Résorcinol | 0,40 | | | Myricétine | 0,62 | Rutine | 0,78 |
| | | Pyrocatechol | 0,58 | | | | | | |

Dans le système 1 (CMEA), nous avons pu identifier 4 composés phénoliques qui sont : l'acide gallique, la myricétine, le résorcinol et le pyrocatechol.

Le système 2 (BAW) nous révèle 4 composés phénoliques, parmi eux nous avons: l'acide para-coumarique, l'acide gallique, la myricétine et la rutine.

Discussion :

A-Flavonoïdes de *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* :

Peu de travaux ont été réalisés sur l'analyse des composés phénoliques de *P.atlantica* et *P.lentiscus*.

En effet, **Kawashty et al (2000)** ont mis en évidence neuf flavonoïdes glycosides qui ont été isolés à partir de la partie aérienne de 4 espèces de *Pistacia*. Ces composés sont : le kaempférol-3-glucoside ; la quercétine-3-glucoside ; la quercétine-3-galactoside ; la quercétine-3-rutinoside ; la quercétine-3-glucoside-7-galactoside ; la myricétine-3-glucoside ; la myricétine-3-rutinoside et l'apigénine-6-8-di-C-glucoside (Vicenine-2).

Les plantes *P.lentiscus* et *P.atlantica* sont très riches en quercétine-3-glucoside.

Les glycosides, la quercétine-3-galactoside et la vicenine-2 sont plus ou moins dominants dans le pool flavonique de *P.atlantica*. D'autres distributions sous forme de trace de kaempférol-3-glucoside et la quercétine-3-rutinoside ont été signalées dans ces deux espèces.

On note la présence de la quercétine-3-glucoside-7-galactoside chez *P.atlantica* et elle reste absente chez *P.lentiscus*, Cette dernière révèle la présence de la vicenine-2 sous forme de trace (**Kawashty et al., 2000**).

On outre, la famille Anacardiacee est caractérisée par l'existence des dérivés de myricétine et l'acide gallique ce qui est comparables à nos résultats (**Umadevi et al., 1988 in Romani et al., 2002**).

Romani et al (2002) ont mis en évidence trois majeures classes des métabolites secondaires chez la plante *P.lentiscus* :

- * L'acide gallique et les dérivés galloyl du sucre et d'acide quinique ;
- * Les glycosides de flavonols par exemple les glycosides de myricétine et de quercétine ;
- * Les anthocyanes nommés delphinidine-3-O-glycoside et cyanidine-3-O-glycoside. Des quantités minimales de catéchine ont été détectées.

Nous rappelons que l'acide p-coumarique n'a pas été identifié par ces auteurs cités auparavant.

B-Flavonoïdes d'*Inula viscosa* :

Nous n'avons pas pu identifier le maximum de composés chez *I. viscosa* par manque de témoins et d'appareil d'analyse au HPLC.

C'est ainsi, les composés phénoliques mis en évidence sont : la rutine, la myricétine, le résorcinol et le pyrocatechol.

Certains auteurs ont pu identifier neuf flavonoïdes dans l'extrait acétonique d'*Inula viscosa* d'Espagne, de France et de Turquie. Parmi ces composés nous citons : hispiduline, lutéoline, 6-méthoxylutéoline, 7-O-méthylkaempférol (rhamnocitrine), quercétine et ses dérivés et 3,6-di-O-méthylquercétagine (Öksüs,1977; Grande et al.,1985 in Benayache et al.,1991 ; Wollenweber et al.,1991 in Benayache et al.,1991.)

Benayache et al (1991) ont isolé dix-sept flavonoïdes dont six sont reportés pour la première fois pour cette plante, la jacéosidine (6,3-diméthoxyapigénine), deux hétérosides de la quercétine et trois dérivés de la quercétagine dans l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait acétate d'éthyle-benzène(1,1) des parties aériennes.

Öksüs (1977) a aussi mis en évidence pour la première fois trois composés flavoniques des fleurs d'*I. viscosa* qui sont : 3-méthoxyquercétine-7-glucoside, 3-méthoxyquercétine et quercétine-3-méthoxyquercétine-7-glucoside.

La quercétine et l'iso-quercétine ont été séparés à partir d'*I. britannica*. (Dombrowicz et Greiner, 1968 in Öksüs., 1977).

Dans les travaux antérieurs (Grande et al., 1985 ; Martin et al.,1988 in Costa et al.,2003), la présence des flavonoïdes surtout la quercétine dans la partie aérienne de *Dittrichia viscosa* est aussi reportée.

Costa et al (2003) ont identifié par HPLC, 4 composés nommés hésperétine, naringénine, naringine et quercétine contenant dans le pool flavonique d'*I. viscosa*.

**CHAPITRE 4 : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et
des extraits bruts des composés phénoliques de :
Pistacia lentiscus, *Pistacia atlantica*
et *Inula viscosa***

**1-Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des
extraits bruts des composés phénoliques des 3 plantes :**

1.1-Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles et les flavonoïdes sont déposés sur des disques de 6mm de diamètres stériles à des concentrations bien déterminées.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 15.

**Tableau 15 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches
(en mm) de l'effet des huiles essentielles selon la méthode de Vincent.**

| Souches | HE de <i>P. lentiscus</i> | | | | | | HE de <i>P. atlantica</i> | | HE de <i>I. viscosa</i> | | Contrôle |
|-------------------------|------------------------------|------|----------------------|------|--------------------|------|------------------------------|------|----------------------------|------|----------|
| | Ain Fezza (Ent) | | Oum El Alou (Ent) | | Ghazaouet (Hyd) | | Ain Fezza (Ent) | | Sidna Youchaa (Ent) | | |
| | 2µl | 5µl | 2µl | 5µl | 2µl | 5µl | 2µl | 5µl | 2µl | 5µl | |
| ST ₁ | 9,8 | 10 | 8 | 8 | 9,5 | 11 | 10,5 | 14,5 | 9 | 10,5 | ++ |
| L ₁₁ | 7,5 | 10,3 | 8 | 9,5 | 7,5 | 8,8 | 9,5 | 14,8 | 10 | 11 | ++ |
| KL ₁ | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| P ₄ | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 8 | 0 | 0 | ++ |
| SL | 10 | 10,5 | 10,2 | 17,3 | 18,2 | 32,3 | 10 | 11 | 11 | 14,5 | ++ |
| Pr | 0 | 7 | 0 | 7 | 0 | 8 | 7 | 8,1 | 7 | 8,5 | ++ |
| E ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| En | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 10,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| <i>Candida albicans</i> | 8,5 | 8,6 | 6,5 | 8 | 8,5 | 10,5 | 7,5 | 14 | 7 | 7,5 | ++ |

NB :

Ent : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur.

Hyd : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'hydrodistillation.

ST₁: *Staphylococcus aureus* (Gram +).

L₁₁: *Listeria monocytogenes* (Gram +).

KL₁: *Klebsiella pneumoneae* (Gram -).

P₄: *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -).

SL: *Salmonella typhi* (Gram -).

Pr : *Proteus mirabilis* (Gram -).

E₁: *Escherichia coli* (Gram -).

En : *Enterobacter cloacea* (Gram -).



Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de Vincent nous montrent une large variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 0 à 32,3mm selon les souches et en fonction de deux concentrations, 2 μ l et 5 μ l (Tableau 15, Figure 28).

En effet, la comparaison des 3 stations [Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet] nous révèle que l'huile essentielle de *P.lentiscus* de Ghazaouet est plus active, elle présente une sensibilisation plus ou moins modérée de toutes les souches à la concentration 5 μ l à l'exception d'*Escherichia coli* qui est caractérisée par une résistance quelle que soit la station et la nature de l'huile essentielle.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, aucune sensibilisation a été remarquée à 2 μ l. A 5 μ l une légère inhibition allant de 7 à 8 mm a été signalée pour différentes huiles essentielles sauf celle d'*I.viscosa* de la station de Sidna Youchaa et *P.lentiscus* de la station d'Oum El Alou.

Une inhibition très significative de la souche *Salmonella typhi* a été adoptée à l'huile essentielle de *P.lentiscus* de la station du Ghazaouet.

Les huiles essentielles d'*I.viscosa* et *P.atlantica* n'ont aucun effet vis à vis d'*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoneae* à 2 μ l et 5 μ l.

Nous pouvons déduire que l'ensemble des souches à Gram (-) est moins sensible voire résistant aux huiles essentielles de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa* à l'exception de *Salmonella typhi*. Par contre les souches à Gram (+) et *Candida albicans* sont sensibles dont les diamètres varient entre 6,5 et 14,8mm.

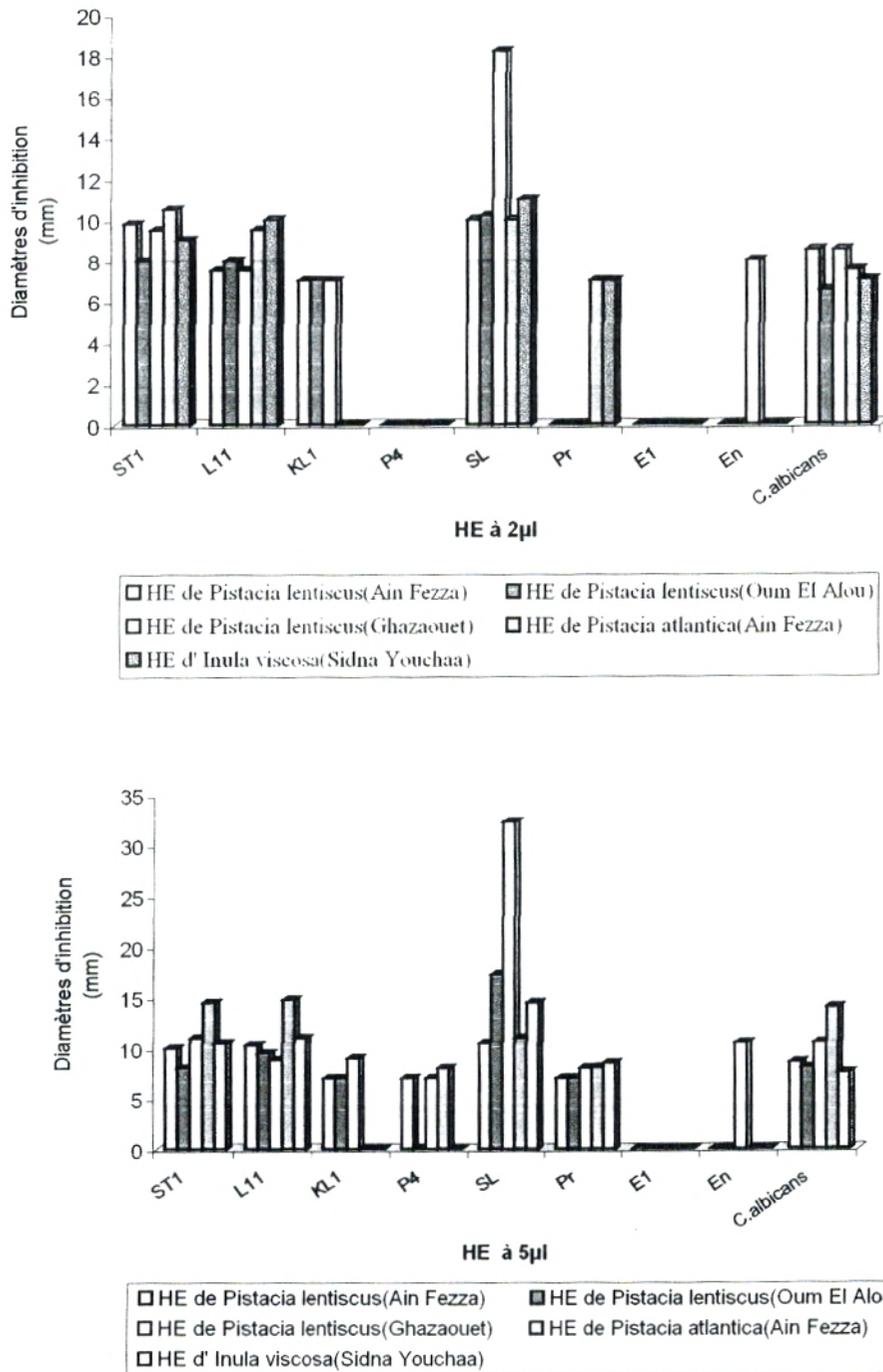


Figure 28 : Antibioaromatogramme : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition des différentes souches à Gram (+), Gram (-) et *Candida albicans* par l'effet des huiles essentielles de : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

1.2-Les extraits bruts des composés phénoliques :

Les résultats de l'effet des extraits bruts des composés phénoliques sont notés sur le tableau 16.

Tableau 16 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) de l'effet des extraits bruts selon la méthode de Vincent.

| Souches | EB de <i>I.viscosa</i> (Sidna Youchaa) | | EB de <i>P.lentiscus</i> (Oum El Alou) | | EB de <i>P.atlantica</i> (Ain Fezza) | | Contrôle (Méthanol) | |
|-------------------------|---|------|---|------|---|------|------------------------|------|
| | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| ST ₁ | 8 | 14 | 11,5 | 21,5 | 13,6 | 16,5 | 6,5 | 9 |
| L ₁₁ | 0 | 9,5 | 11 | 10 | 8 | 9 | 0 | 7 |
| KL ₁ | 7 | 9,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 9 |
| P ₄ | 9 | 1 | 10,5 | 14,5 | 8,5 | 10,5 | 8 | 9,5 |
| SL | 9,5 | 19,3 | 11 | 25,5 | 10 | 21,5 | 7 | 13,3 |
| Pr | 7 | 11,6 | 9 | 13 | 8 | 10 | 7,5 | 9 |
| E ₁ | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 9,5 | 7 | 7,5 |
| En | 8 | 11,3 | 0 | 14,6 | 8 | 12 | 8 | 19 |
| <i>Candida albicans</i> | 9,6 | 11,6 | 12 | 23,5 | 15 | 23,5 | 0 | 11 |

NB : EB représente l'extrait brut.

ST₁: *Staphylococcus aureus* (Gram +).

L₁₁: *Listeria monocytogenes* (Gram +).

KL₁: *Klebsiella pneumoneae* (Gram -).

P₄: *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -).

SL: *Salmonella typhi* (Gram -).

Pr : *Proteus mirabilis* (Gram -).

E₁: *Escherichia coli* (Gram -).

En : *Enterobacter cloacea* (Gram -).

D'après le tableau 16 et la figure 29, nous constatons que *Klebsiella pneumoneae* n'est pas sensible aux extraits bruts des composés phénoliques de *P.lentiscus* et *P.atlantica* à 5µl et 10µl.

Si on considère la dose 5µl, la souche *Escherichia coli* présente le même comportement de la résistance vis à vis des extraits bruts des composés phénoliques des 3 plantes.

Les souches *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* sont sensibles aux 3 types des extraits bruts à 5µl et sont très significatives à 10µl par rapport au contrôle (Méthanol) (Photo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14).

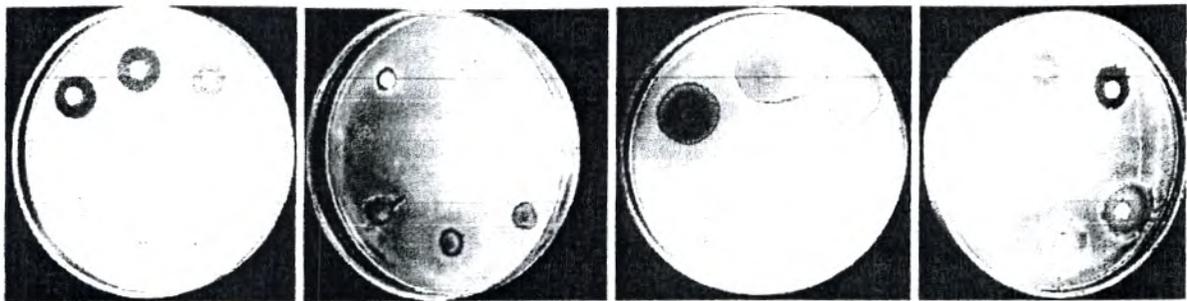


Photo 4

Photo 5

Photo 6

Photo 7



Photo 8

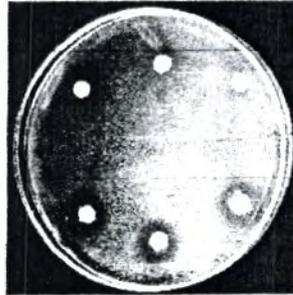


Photo 9

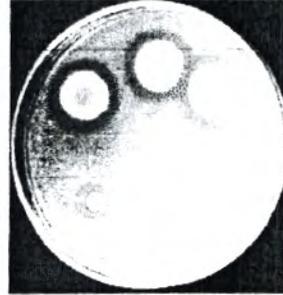


Photo 10

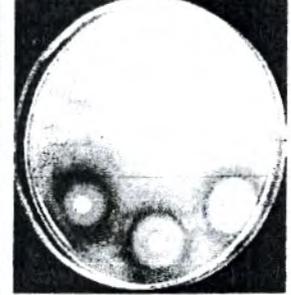


Photo 11

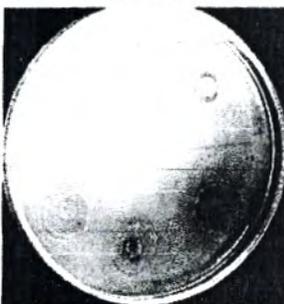


Photo 12

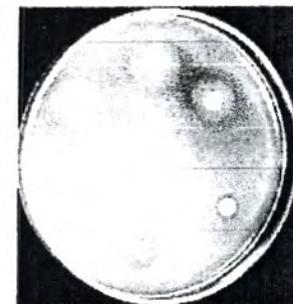


Photo 13

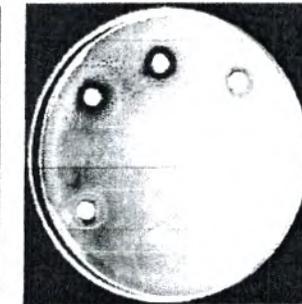


Photo 14

- Photo 4:** Antibioaromatogramme : *Staphylococcus aureus* (ST₁) : EB de *Pistacia atlantica* / Méthanol ; 5µl.
- Photo 5:** Antibioaromatogramme : *Staphylococcus aureus* (ST₁) : EB d'*Imula viscosa* / EB de *Pistacia lentiscus* ; 5µl.
- Photo 6:** Antibioaromatogramme : *Staphylococcus aureus* (ST₁) : EB de *Pistacia lentiscus* / Méthanol ; 10µl
- Photo 7:** Antibioaromatogramme : *Staphylococcus aureus* (ST₁) : EB d'*Imula viscosa* / EB de *Pistacia atlantica* ; 10µl
- Photo 8:** Antibioaromatogramme : *Candida albicans* : EB de *Pistacia atlantica* / Méthanol ; 5µl
- Photo 9:** Antibioaromatogramme : *Candida albicans* : EB d'*Imula viscosa* / EB de *Pistacia lentiscus* ; 5µl.
- Photo 10:** Antibioaromatogramme : *Candida albicans* : EB de *Pistacia lentiscus* / Méthanol ; 10µl
- Photo 11:** Antibioaromatogramme : *Candida albicans* : EB de *Imula viscosa* / EB de *Pistacia atlantica* ; 10µl
- Photo 12:** Antibioaromatogramme : *Enterobacter cloacea* (En) : Méthanol / EB de *Pistacia lentiscus* ; 10µl
- Photo 13:** Antibioaromatogramme : *Enterobacter cloacea* (En) : EB de *Pistacia atlantica* / EB d'*Imula viscosa* ; 10µl
- Photo 14:** Antibioaromatogramme : *Salmonella typhi* (SL) : EB de *Pistacia atlantica* / Méthanol ; 5µl

D'une manière générale, la dose 5µl montre que les huiles essentielles des plantes *I.viscosa*, *P.lentiscus* et *P.atlantica* sont plus actives que les extraits bruts en comparaison avec le méthanol.

Les métabolites secondaires (huiles essentielles et les extraits bruts) du genre *Pistacia* sont actifs que celle d'*I.viscosa* pour la majorité des souches dans cette étude.

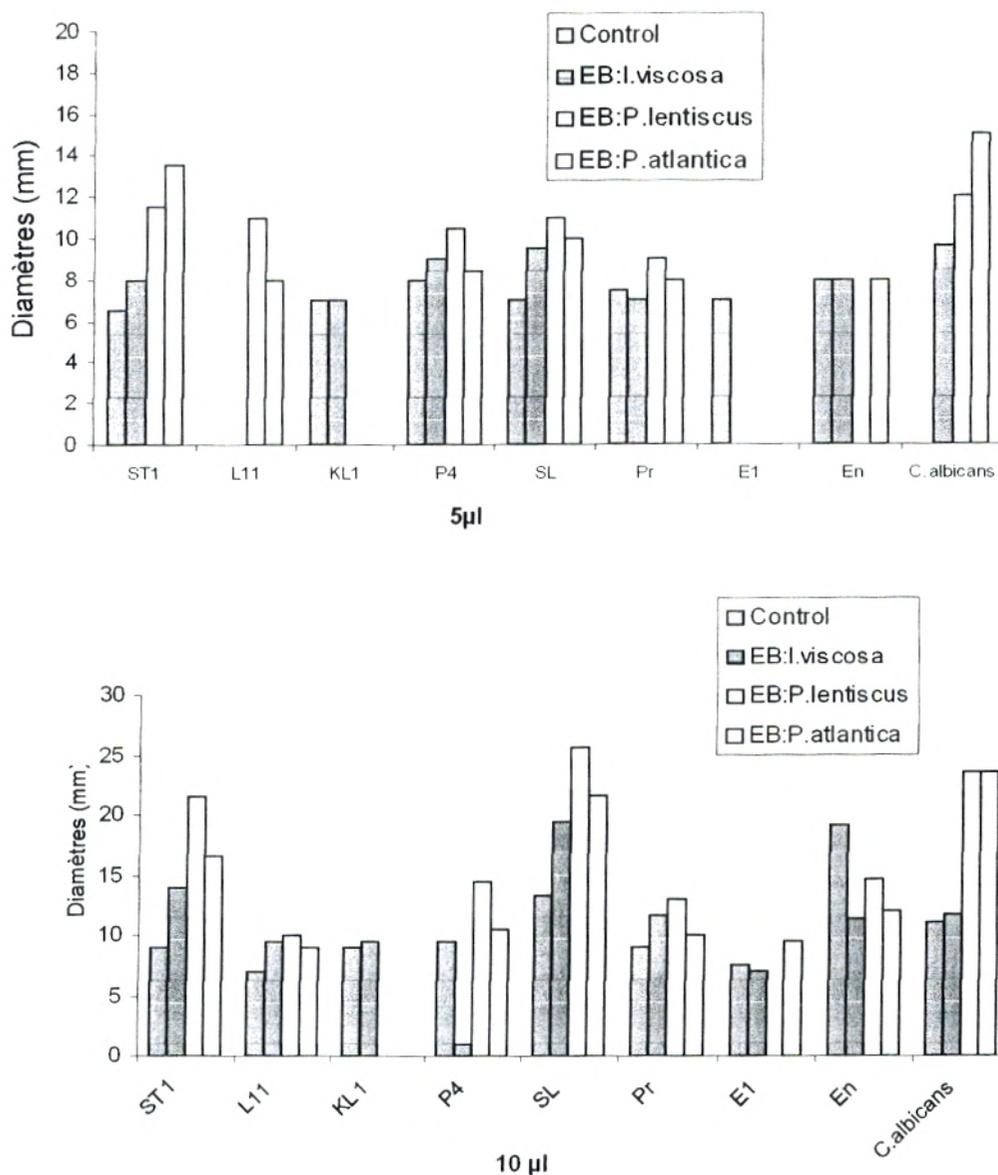


Figure 29 : Antibioaromatogramme : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition des différentes souches à Gram (+), Gram (-) et *Candida albicans* par l'effet des extraits bruts des composés phénoliques de : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

Discussion :

❖ Huiles essentielles :

Nos résultats concordent avec ceux de **Bonsignore et al (1998)**, ils ont pu montrer que l'huile essentielle de la partie aérienne de *P.lentiscus* n'a aucune activité contre les bactéries Gram (-) et Gram (+). D'autres résultats reportés par **Tassou et al (1995)** entrent dans le même contexte. Ils ont noté que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles aux huiles essentielles que les Gram (-) (**Shelef et al., 1980 in Tassou et al., 1995**).

En plus, *Lactobacillus plantarum* et *Staphylococcus aureus* sont complètement inhibés par l'huile essentielle contenue dans la gomme du *P.lentiscus*, tandis que le début de la croissance logarithmique des souches *Pseudomonas fragi* et *Salmonella enteridis* est retardé.

En effet, L'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être attribuée aux phénols qui sont l'eugénol, le carvacrol, l'isobornéol, le thymol, la vanilline et le salicyaldéhyde (**Katayama et Nagai, 1960 in Tassou et al., 1995**) (Annexe 10). Cette activité inhibitrice est significative contre *Hafnia alvei*, *Bacillus stearothermophilus*, *klebsiella oxytola* et *Sarcina lutea* (**Bonsignore et al.,1998**). **Magiatis et al (1999)** montrent aussi que l'huile essentielle des feuilles de *P.lentiscus* a une activité bactériostatique dont les zones d'inhibition varient de moins 7mm dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacea*, *Candida tropicalis* et *Torulopsis glabrata* à 10mm pour *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoneae*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

L'analyse par CPG/RMN C¹³ nous révèle les composés majoritaires qui sont : α -pinène (41%) (Ain Fezza), myrcène (33%) et D-germacrène (13,1%) (Oum El Alou) et limonène (25,5%) (Ghazaouet).

L'activité antimicrobienne de cette plante peut être probablement associée à la forte concentration de ces composés, ceci a été montré par certains auteurs (**Knobloch et al., 1989 in Magiatis et al.,1999 ; Delazar et al., 2004**).

Pour la plante *P.atlantica*, le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle est du probablement au principe actif qui est le caryophyllène de l'ordre de 12,1%. **Barrero et al (2005)** a identifié un pourcentage élevé en composés sesquiterpeniques (β -caryophyllène, α -humulène et δ -cadinène) de 41% dont l'elemol (20%) et β -eudesmol (8,4%) sont les composés majoritaires.

❖ Composés phénoliques :

Une bonne activité antimicrobienne de nos extraits bruts des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* a été reportée en particulier contre *Candida albicans*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus*, ceci a été confirmé par **Iauk et al (1996)**. Ils ont pu montrer que l'extrait brut de *P.lentiscus* possède une activité bactéricide et antimycotique contre *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Torulopsis glabrata* et *Gyptococcus neoformans*. Cet effet est meilleur par décoction contre *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par rapport à l'extraction par des solvant organiques (l'éther de pétrole, l'éthanol), macération et infusion (**Iauk et al., 1996**).

Pour la plante *Imula viscosa*, son extrait brut inhibe la croissance du *Candida albicans* dont le diamètre égale à 9,6mm à 5 μ l. Cette activité est comparable à celle trouvé par **Maoz et Neeman (2000)** que les extraits aqueux des feuilles de *I.viscosa* présentent une activité antifongique contre les dermatophytes qui sont *Microsporium canis*, *Trichrophyton rubrum* et *Candida albicans*, ceci est du à un sesquiterpène « tayunin ».

La cible principale d'extrait d'*Imula viscosa* est l'inhibition de la synthèse d'ergostérol et par conséquent, l'inhibition de la synthèse de la chitine constituant de la paroi du *Candida albicans*.

2-Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques des 3 plantes :

Dans cette partie, nous avons étudié l'activité antifongique des huiles essentielles et les extraits bruts des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

2.1. Les huiles essentielles :

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 17 et les figures 30 et 31.

Tableau 17 : Les indices antifongiques et les diamètres d'inhibition de la croissance des espèces fongiques par les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

| HE | Stations | Dose (µl) | O ₁ (48h) | | AF(8j) | | AF _(R) (8j) | | R ₃ (7j) | | Fus(7j) | |
|---------------------|---------------------|-----------|----------------------|-------|--------|-------|------------------------|-------|---------------------|-------|---------|-------|
| | | | C (mm) | I (%) | C (mm) | I (%) | C (mm) | I (%) | C (mm) | I (%) | C (mm) | I (%) |
| <i>P. lentiscus</i> | Ain Fezza (Ent) | 100 | 63 | 25,88 | 74,5 | -4,93 | 47 | 15,31 | 41,5 | 49,7 | 63 | 25,88 |
| | | 200 | 46,5 | 45,3 | 60 | 15,5 | 36,5 | 34,23 | 33,5 | 59,4 | 56 | 34,1 |
| | Oum El Alou (Ent) | 100 | 66,5 | 21,76 | 73,5 | -3,52 | 50 | 9,90 | 47,5 | 42,42 | 72 | 15,3 |
| | | 200 | 44 | 48,23 | 70 | 1,40 | 48 | 13,51 | 50 | 39,4 | 73,5 | 13,5 |
| | Ghazaouet (Hyd) | 100 | 52 | 38,82 | 56,5 | 20,42 | 37 | 33,33 | 32 | 61,21 | 57,5 | 32,3 |
| | | 200 | 26 | 69,41 | 56 | 21,12 | 33 | 40,54 | 33,5 | 59,4 | 46,5 | 45,3 |
| <i>P. atlantica</i> | Ain Fezza (Ent) | 100 | 19,5 | 77,05 | 50 | 29,57 | 35 | 36,93 | 35,5 | 56,96 | 45 | 47,0 |
| | | 200 | 19,5 | 77,05 | 41,5 | 41,55 | 31 | 44,14 | 26 | 68,48 | 36 | 57,6 |
| <i>I. viscosa</i> | Sidna Youchaa (Ent) | 100 | 16,5 | 80,58 | 43 | 39,43 | 23,5 | 57,65 | 20,5 | 75,15 | 34,5 | 59,41 |
| | | 200 | 13,5 | 84,11 | 28 | 60,56 | 24 | 56,75 | 15,5 | 81,21 | 29 | 65,88 |
| Contrôle | | | 85 | | 71 | | 55,5 | | 82,5 | | 85 | |

NB: *Rhizopus stolonifer* (O₁) ; *Trichoderma sp* (R₃) ; *Fusarium sp* (Fus) ;

Aspergillus flavus de référence (AF_R) ; *Aspergillus flavus* (AF).

Ent : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur.

Hyd : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'hydrodistillation.

C : diamètre de croissance.

I : indice antifongique.

La comparaison de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* des trois stations, Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet montre, à partir de 100µl d'huile essentielle, toutes les souches présentent des indices antifongiques allant de 9,90% pour *Aspergillus flavus* de référence à 61,21% pour *Trichoderma sp* des stations Oum El Alou et Ghazaouet respectivement (Photo 15, 16, 17, 18).

Alors que la souche *Aspergillus flavus* n'est pas sensible, ceci est indiqué par des valeurs négatives de -4,93% pour l'huile essentielle de Ain Fezza et -3,52% d'Oum El Alou (Figure 30).

En outre, l'activité de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* est supérieure à celle obtenue par les deux espèces étudiées du genre *Pistacia*. Le pourcentage d'inhibition dépasse 50% dans toutes les souches, il varie entre 56,75% dans le cas d'*Aspergillus flavus* de référence (AF_R) et 84,11% dans le cas de *Rhizopus stolonifer* à 200µl.

Après synthèse de ces données, nous pouvons déduire que l'activité antifongique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* est corrélée avec leurs quantités pour toutes les souches fongiques.



Photo 15

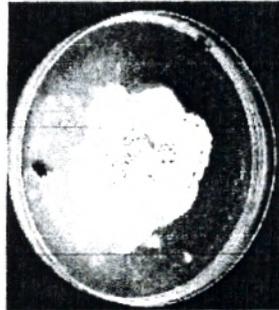


Photo 16

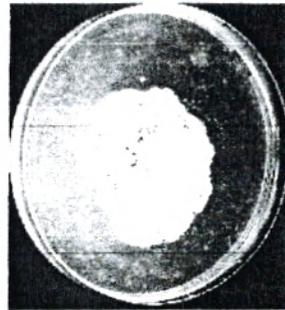


Photo 17

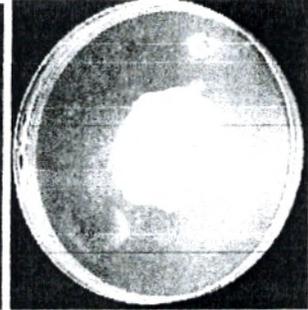


Photo 18

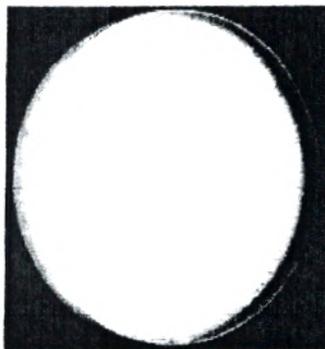


Photo 19

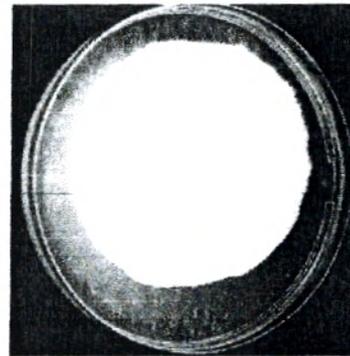


Photo 20

Photo 15 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : Contrôle sans l'huile essentielle (HE).

Photo 16 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : HE de *Pistacia lentiscus* d'Oum El Alou ; 100µl.

Photo 17 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : HE de *Pistacia lentiscus* de Ain Fezza ; 100µl.

Photo 18 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : HE de *Pistacia lentiscus* de Ghazaouet ; 100µl.

Photo 19 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : Contrôle sans l'huile essentielle (HE).

Photo 20 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : HE de *Pistacia lentiscus* de Ghazaouet ; 100µl.

En effet, l'huile essentielle de *P.lentiscus* de la station de Ghazaouet montre une activité inhibitrice plus élevée que les deux autres huiles essentielles de la même plante. Les souches *Rhizopus stolonifer* et *Trichoderma sp* sont plus sensibles.

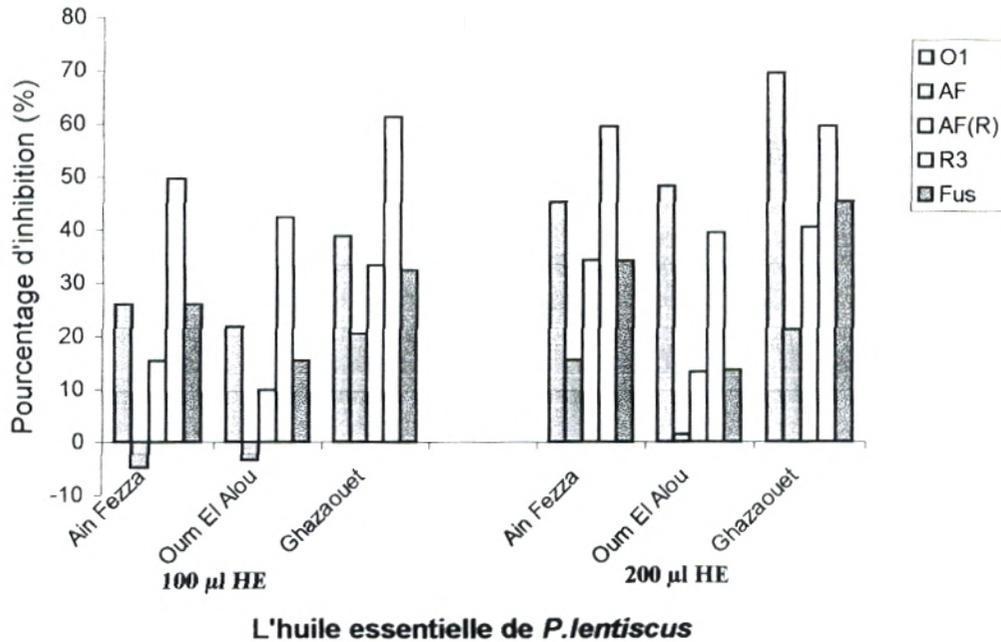


Figure 30 : Antifongigramme : les taux d'inhibition de la croissance fongique par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

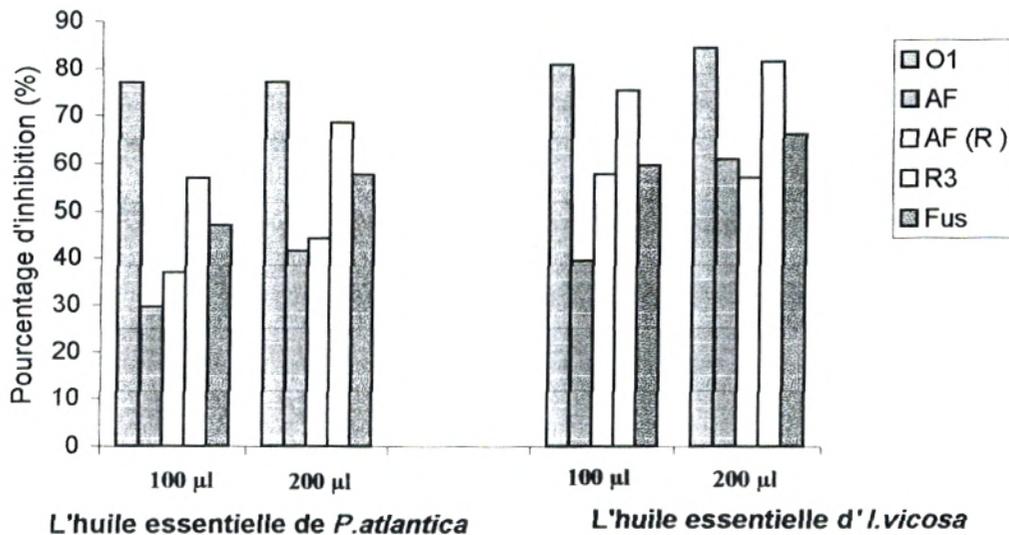


Figure 31 : Antifongigramme : les taux d'inhibition de la croissance fongique par les huiles essentielles d'*Inula viscosa* et *Pistacia atlantica*.

2.2-Les Extraits bruts des composés phénoliques :

Les résultats de l'activité antifongique des extraits bruts contre les 5 souches fongiques sont notés sur le tableau 18 et illustrés sur les figures (32, 33, 34).

Tableau 18 : Les indices antifongiques et les diamètres d'inhibition de la croissance des espèces fongiques par les extraits bruts des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

| | Extrait par | Dose (µl) | O ₁ | | AF | | AF _(R) | | R ₃ | | Fus | |
|-------------------------------------|-------------|-----------|----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|----------------|--------|-------|-------|
| | | | C(mm) | I(%) | C(mm) | I(%) | C(mm) | I(%) | C(mm) | I(%) | C(mm) | I(%) |
| <i>P.lentiscus</i> (Oum El Alou) | Ethanol | 50 | 68,5 | 13,07 | 16,5 | 61,17 | 23 | 31,95 | 85 | 0 | 50 | 8,25 |
| | | 100 | 63 | 14,63 | 19 | 59,66 | 17,5 | 40,27 | 85 | 0 | 49 | 10,09 |
| | | 500 | 20,5 | -64 | 16 | 71,53 | 16 | 45,20 | 12,5 | 84,70 | 34 | 24,44 |
| | | 1000 | 9 | -20 | 20 | 33,33 | 12 | -71,42 | 9 | 48,57 | 21 | 28,81 |
| <i>P.atlantica</i> (Ain Fezza) | Ethanol | 50 | 85 | -7,86 | 52 | -22,35 | 48,5 | -43,5 | 85 | 0 | 55 | -1 |
| | | 100 | 85 | -15,17 | 56 | -18,9 | 32,5 | -10,92 | 78,5 | 7,64 | 54 | 1 |
| | | 500 | 21 | -68 | 60 | -6,76 | 49,5 | -69,52 | 72 | 11,87 | 36 | 20 |
| | | 1000 | 10 | -33,3 | 33 | -10 | 12,5 | -78,57 | 27 | -54,28 | 20 | 32,20 |
| <i>I.viscosa</i> (Sidna Youchaa) | Ethanol | 50 | 85 | -7,86 | | | 24,5 | 27,51 | 67,5 | 20,58 | 43,5 | 20,18 |
| | | 100 | 75 | -1,62 | 45 | 4,45 | 27 | 7,85 | 65 | 23,53 | 38,5 | 29,35 |
| | | 500 | 17 | -36 | 16,5 | 70,64 | 16 | 45,20 | 20 | 75,52 | 20 | 55,55 |
| | | 1000 | 6 | -20 | 11 | 63,33 | 11,5 | -64,28 | 6 | 65,71 | 9 | 69,5 |
| Contrôle (Méthanol) | | 50 | 78,8 | | 42,5 | | 33,8 | | 85 | | 54,5 | |
| | | 100 | 73,8 | | 47,1 | | 29,3 | | 85 | | 54,5 | |
| | | 500 | 12,5 | | 56,2 | | 29,2 | | 81,7 | | 45 | |
| | | 1000 | 7,5 | | 30 | | 7 | | 17,5 | | 29,5 | |

NB: *Rhizopus stolonifer* (O₁) ; *Trichoderma sp* (R₃) ; *Fusarium sp* (Fus) ; *Aspergillus flavus* de référence (AF_R) ; *Aspergillus flavus* (AF).

Ent : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur.

Hyd : représente l'extraction de l'huile essentielle par l'hydrodistillation.

C : diamètre de croissance.

I : indice antifongique.

Nous constatons que l'extrait brut des composés phénoliques de *P.lentiscus* d'Oum El Alou possède une activité inhibitrice de toutes les souches à différente concentration à l'exception de *Rhizopus stolonifer* à 0,5 et 1ml et *Aspergillus flavus* de référence (AF_R) à 1ml (Photo 29,30,31,32,33,34).

Cette activité est observée pour l'extrait brut d'*I.viscosa* avec une allure plus ou moins élevée (Photo 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Par ailleurs, l'extrait brut de *P. atlantica* n'a aucune activité inhibitrice de la croissance presque pour toutes les souches.

Nous observons que les pourcentages d'inhibition n'ont pas de relation avec les concentrations.

Dans cette étude, l'activité antifongique est adoptée surtout aux huiles essentielles qu'aux composés phénoliques.

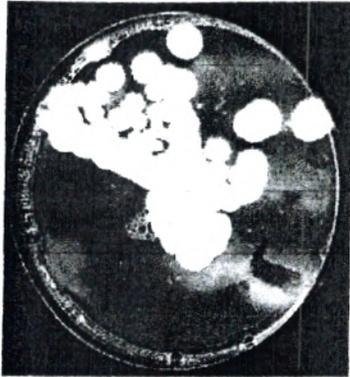


Photo 21

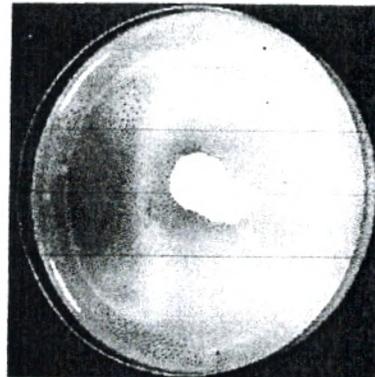


Photo 22

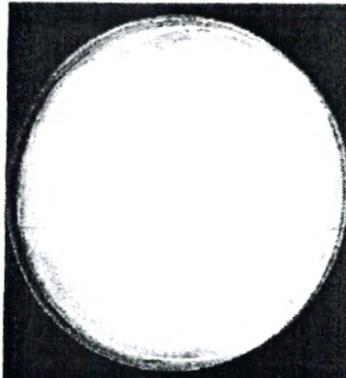


Photo 23

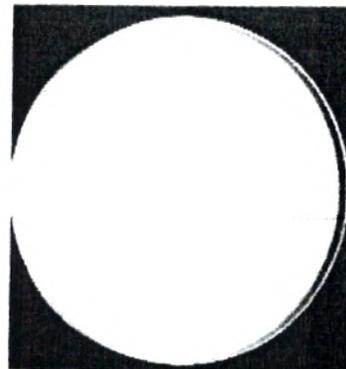


Photo 24

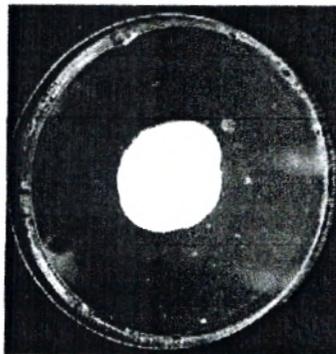


Photo 25

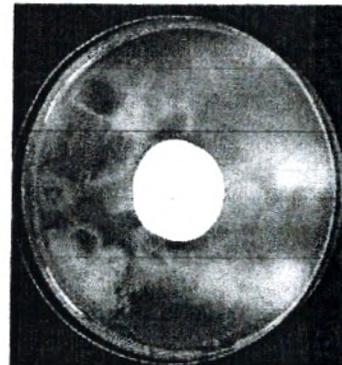


Photo 26



Photo 27

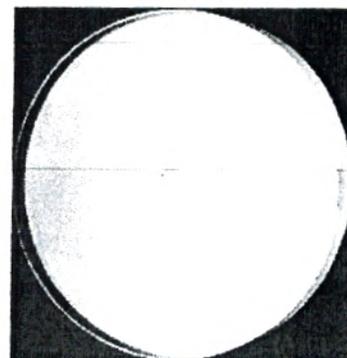


Photo 28

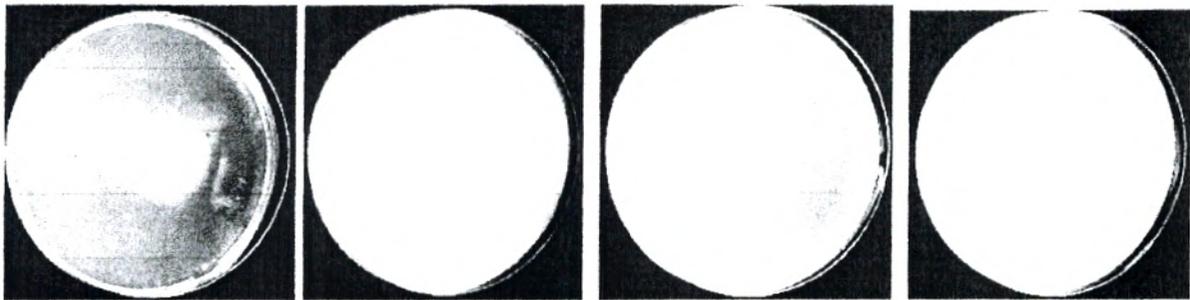


Photo 29

Photo 30

Photo 31

Photo 32

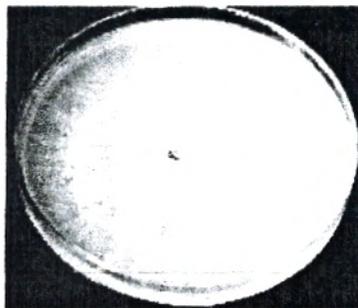


Photo 33

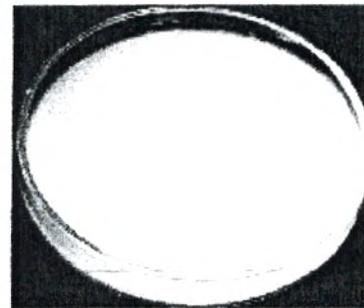


Photo 34

Photo 21 : Antifongigramme : *Aspergillus flavus* (AF) : Méthanol ; 500µl

Photo 22 : Antifongigramme : *Aspergillus flavus* (AF) : Extrait brut (EB) d'*Imula viscosa* ; 500µl.

Photo 23 : Antifongigramme : *Rhizopus stolonifer* (O₁) : Méthanol ; 500µl.

Photo 24 : Antifongigramme : *Rhizopus stolonifer* (O₁) : EB d'*Imula viscosa* ; 500µl.

Photo 25 : Antifongigramme : *Aspergillus flavus* de référence (AF_R) : Méthanol ; 50µl.

Photo 26 : Antifongigramme : *Aspergillus flavus* de référence (AF_R) : EB d'*Imula viscosa* ; 50µl.

Photo 27 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : Méthanol ; 500µl.

Photo 28 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : EB d'*Imula viscosa* ; 500µl.

Photo 29 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : Méthanol ; 1ml.

Photo 30 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : EB de *Pistacia lentiscus* ; 1ml.

Photo 31 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : EB de *Pistacia atlantica* ; 1ml.

Photo 32 : Antifongigramme : *Fusarium sp* (Fus) : EB d'*Imula viscosa* ; 1ml.

Photo 33 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : Méthanol ; 500µl.

Photo 34 : Antifongigramme : *Trichoderma sp* (R₃) : EB de *Pistacia lentiscus* ; 500µl.

Note : EB : représente l'extrait brut.

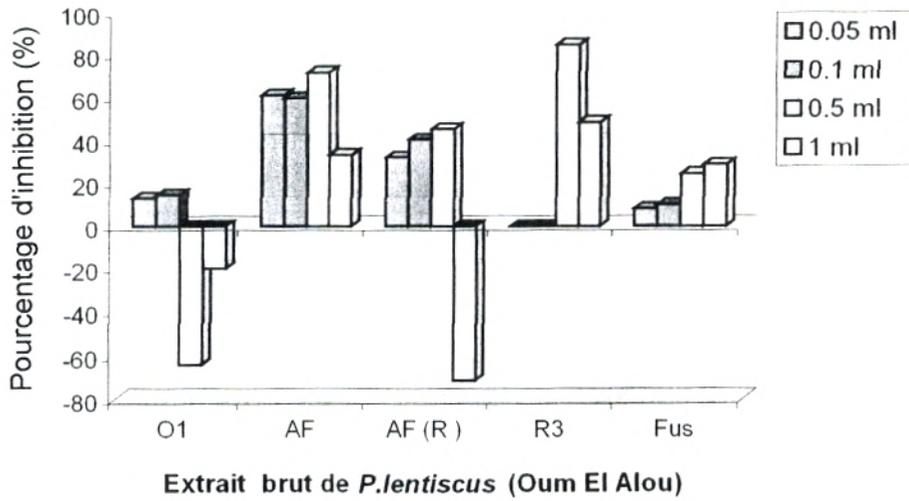


Figure 32 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut de *Pistacia lentiscus*.

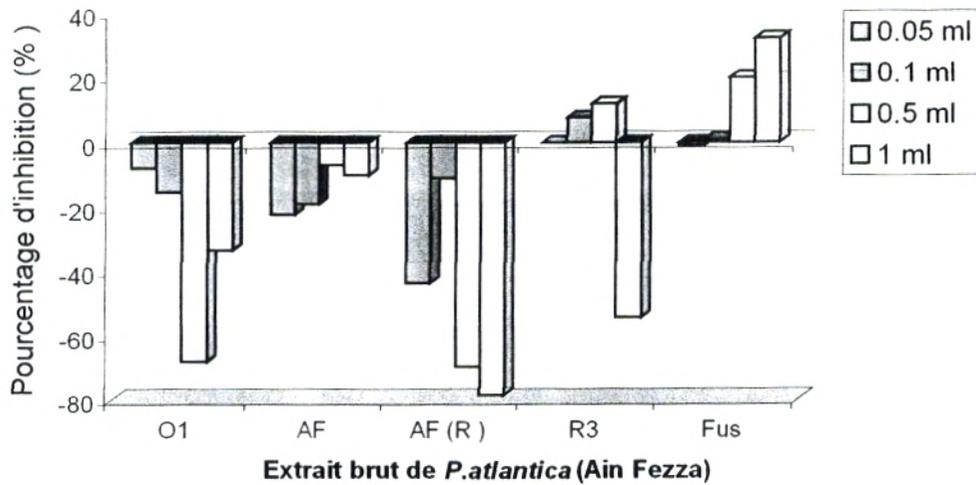


Figure 33 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut de *Pistacia atlantica*.

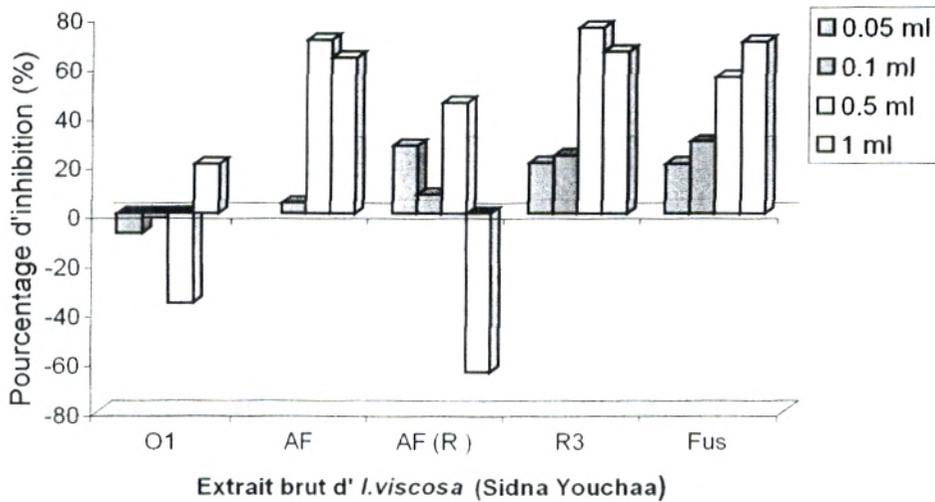


Figure 34 : Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait brut d' *Imula viscosa*.

Discussion :

❖ Huiles essentielles :

L'activité antifongique des huiles essentielles de nos échantillons s'avère plus intéressante par rapport aux études de **Duru et al (2003)**. Elle montre l'inhibition du *Fusarium sp* à un pourcentage de 45,3% pour l'huile essentielle de *P.lentiscus* de Ghazaouet et 57,64% pour l'huile essentielle de *P.atlantica* de Ain Fezza. Ces auteurs ont pu montrer un pourcentage d'inhibition supérieur à 40% contre la souche *Rhizoctonia solani* pour toutes les huiles essentielles des feuilles de genre *Pistacia* et aucune activité contre *Pythium ultimum* et *Fusarium sambucinum*.

Nos résultats montrent que l'huile essentielle d'*I.viscosa* possède un pouvoir antifongique puissant pour toutes les souches dont les pourcentages d'inhibition varient entre 56,75% pour *Aspergillus flavus* de référence (AF_R) et 84,11% pour *Rhizopus stolonifer* (O₁), ceci a été reporté par **Cafarchia et al., 2002**. Ils ont montré l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles, des fleurs, de la plante entière et de la plante entière sans fleurs d'*I.viscosa* contre les dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton terrestre*. Le taux d'inhibition de la croissance des mycéliums peut atteindre 100% pour *Microsporium canis* et *Microsporium gypseum*.

L'analyse qualitative et quantitative d'huile essentielle par CPG/SM explique cette évaluation de l'efficacité antifongique par la présence des concentrations fortes des sesquiterpènes et plus particulièrement les carboxyudesmanadiènes dans les feuilles de cette plante (**Cafarchia et al., 2002**).

Les travaux d'**Abu Zarga et al (1998)** et **Abu Zarga et al (2002)** ont décrit la présence en plus de 14 composés identifiés dans l'huile essentielle d'*I.viscosa* de la région jordanien, 6 nouveaux sesquiterpéniques de type eudesmane. Ces composés sont l'acide 3β-hydroxyilicique, l'acide 3α-hydroxy-épi-ilicique, l'acide 2α-hydroxyilicique, l'acide 9β-hydroxy-2-oxoisocostique, l'acide 1β-hydroxyilicique et l'acide 2β-hydroxyilicique.

❖ Composés phénoliques :

L'activité antifongique de nos extraits bruts éthanolique de *P.lentiscus* et *P.atlantica* révèle plus puissante à celle de **Kordali et al (2003)** et ceci vis-à-vis des différentes souches. Nos résultats montrent une inhibition de la croissance de *Fusarium* dont le pourcentage varie entre 8,25% à 28,81% pour *P.lentiscus* et 20% à 32,20% pour *P.atlantica* à différentes concentrations par rapport à -175,6% adopté au *Fusarium sambucinum* par des extractions à différents solvant (chloroforme, l'éthyle acétate et l'éthanol).

Il est reporté que les extraits flavoniques de *P.lentiscus* présentent une activité antifongique contre les levures et moisissures et non pas une activité antibactérienne à l'exception de *Staphylococcus aureus* (**Iauk et al., 1996; Ali-Shtayeh et al., 1999**).

Pour la plante *I.viscosa*, nos résultats sont comparables avec ceux de **Ali-Shtayeh et al (1999)**. Ces auteurs suggèrent que les extraits aqueux de la partie aérienne, feuilles, fruits et les fleurs d'*Inula viscosa* aient une activité antifongique élevée dont le pourcentage d'inhibition est supérieur à 90% contre les dermatophytes *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton violaceum*. Cette activité est aussi trouvée par **Ali-Shtayeh et al (1998)** in **Ali-Shtayeh et al (1999)** contre *Candida albicans*.

Ces activités sont dues à la présence des différentes classes des flavonoïdes (isoquercétine, la quercétine, l'apigénine, l'isoramnetine la naringinine l'acide cafeique et le chlorogénique) et aussi leurs concentrations dans les extraits bruts de différentes parties de la plante (Cafarchia et al., 1999).

Nous pouvons déduire que la différence ou la concordance de nos résultats avec ces travaux peut être expliquée par :

❖ La composition des huiles essentielles et des extraits qui est corrélé d'une façon étroite avec les conditions climatiques et environnementales (Janssen et al., 1987; Sivropoulou et al.,1995 in Hammer et al.,1999) .

On outre, quelques huiles essentielles notées avec le même nom commun peuvent être dérivées à partir des espèces de différentes plantes (Windholz et al.,1983 ; Reynolds, 1996 in Hammer et al.,1999).

❖ La nature et/ou la concentration des inhibiteurs chimiques présents dans les espèces de différentes plantes et leurs solubilités dans l'eau dans le cas des extraits aqueux (Al-Abed, 1992 ; Qascm et Abu-Blan, 1995 in Ali-Shtaych et al., 1999) et dans les solvants dans le cas des extraits par des solvants organiques (Ali-Shtaych et al.,1999).

❖ La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne et le choix des microorganismes à tester qui varient selon les publications (Janssen et al., 1987 in Hammer et al.,1999).

La méthode souvent utilisée est la technique des disques (Morris et al., 1979 ; Smith-Palmer et al., 1998 in Hammer et al., 1999).

CHAPITRE 5 : Pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits bruts des composés phénoliques de : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*

1-Les extraits bruts des composés phénoliques :

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts des composés phénoliques des plantes *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*, 4 méthodes ont été adoptées qui sont : réduction de fer, piégeage des anions superoxydes, piégeage du radical libre DPPH[•] et piégeage le radical libre DPPH[•] en utilisant la CCM.

1.1-Réduction de fer :

Plusieurs méthodes sont développées pour mesurer l'efficacité des antioxydants alimentaires soit pures ou dans les extraits alimentaires. Ces méthodes ont mis au point des mécanismes différents du système de défense. Ce dernier consiste dans le piégeage des espèces oxygénées activées (ROS) et les radicaux hydroxyles, la réduction des radicaux peroxydes des lipides, l'inhibition de la peroxydation lipidique ou chélation des ions métalliques (Zhu et al., 2002).

La capacité de la réduction basée sur la transformation du Fe³⁺ en Fe²⁺ en présence des extraits des végétaux de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* est déterminée dans cette étude par la méthode d'Oyaizu (1986) in Rajeshwar et al (2005).

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Pouvoir réducteur en fonction des quantités d'extraits choisis.

| Quantités d'extraits (mg) | DO (700) | | | |
|--|----------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| | EB: <i>I.viscosa</i> | EB: <i>P.atlantica</i> | EB: <i>P.lentiscus</i> | Acide ascorbique |
| 0,25 | 0,618 ± 0,19 | 1,089 ± 0,06 | 1,0865 ± 0,11 | 1,4055 ± 0,24 |
| 0,5 | 0,8315 ± 0,04 | 2,2345 ± 0,12 | 2,011 | 2,6745 ± 0,003 |
| 0,75 | 1,1805 ± 0,04 | 2,4185 ± 0,04 | 2,647 | 2,7055 ± 0,01 |
| 1 | 1,43 ± 0,03 | 2,499 ± 0,00 | 2,715 ± 0,00 | 2,733 ± 0,009 |
| 2 | 2,177 ± 0,06 | 2,513 ± 0,01 | 2,804 ± 0,00 | 2,7815 ± 0,01 |
| 3 | 2,707 ± 0,004 | 2,551 ± 0,001 | 2,862 ± 0,009 | 2,8245 ± 0,02 |
| Pourcentage de réduction de fer (%) à 0,750 mg | 43,63 | 89,4 | 97,83 | 100 |

NB :

EB : représente l'extrait brut.

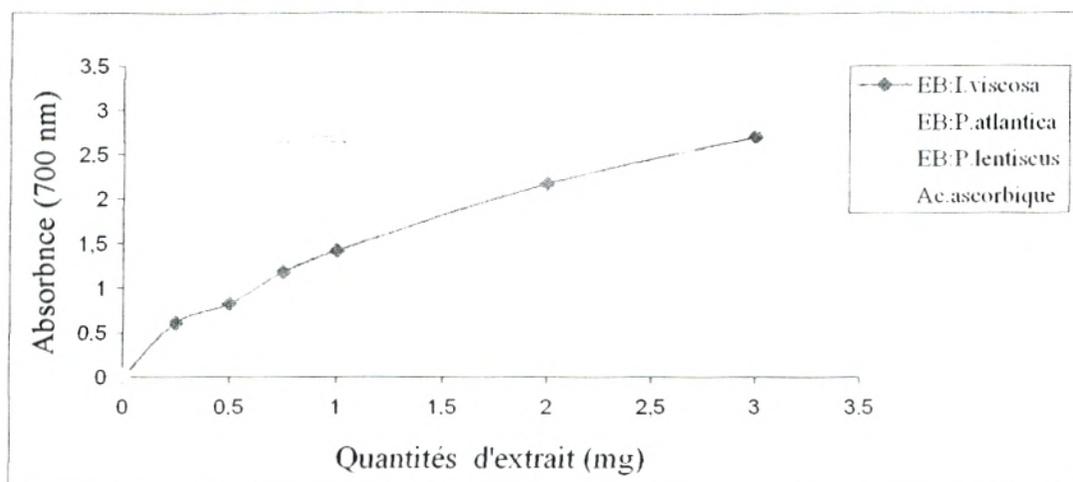


Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques du *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

Nous constatons que le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques du *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* montre une évolution en fonction de la concentration (Figure 35, Tableau 19).

Il ressort de ces données que les deux extraits de pistachier présentent une capacité plus élevée à réduire le fer que celle d'extrait d'*I.viscosa*. Par ailleurs, *P.lentiscus* a un pouvoir réducteur plus fort que celui du *P.atlantica*.

À une concentration de 3mg, la réduction de fer de l'extrait de *P.lentiscus* et celle de l'acide ascorbique sont plus ou moins comparables dont les valeurs sont de 2,862 et 2,8245 respectivement.

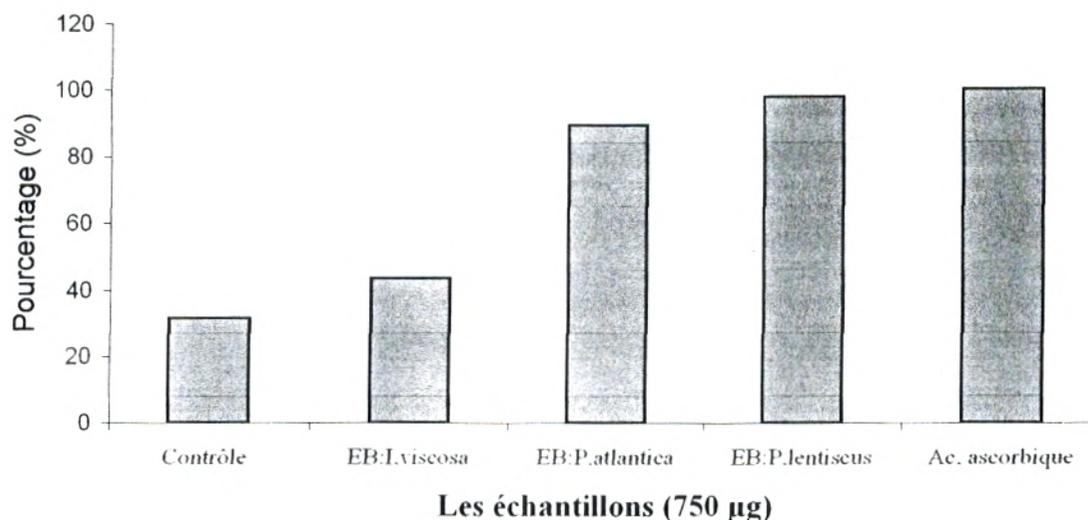


Figure 36 : Réduction de fer par les extraits éthanoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa*.

➤ L'acide ascorbique est le contrôle positif.

Nous pouvons classer les extraits selon la capacité décroissante à réduire le fer à 750µg (Figure 36). Cette classification est la suivante : l'acide ascorbique > l'extrait de *P.lentiscus* > l'extrait de *P.atlantica* > l'extrait d'*I.viscosa* dont les pourcentages de réduction sont : 100 > 97,83 > 89,4 > 43,63 respectivement (Tableau 19).

Discussion :

Les résultats obtenus nous montrent que le pouvoir réducteur des différents extraits de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* augmente en fonction de la concentration, ceci a été confirmé par plusieurs auteurs (Gow-chin et Pin-der, 1993 ; Gow-chin et Hui-yin, 1995 in Hadafi et al., 1998). Il est aussi reporté que la réduction de fer diminue lorsque la polarité du solvant d'extraction augmente (Hadafi et al (1998) et que cet effet est associé à l'activité antioxydante chez certains auteurs (Yen et Duh, 1993 in Gulçin et al., 2004; Yang et al., 2002 in Rajeshwar et al., 2005), d'autres suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation (Yildirim et al., 2001).

La capacité de réduction d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Meir et al., 1995 in Rajeshwar et al., 2005).

L'étude in vitro de l'activité antioxydante d'extrait méthanolique des graines de *Mucuna pruriens* (*Fabaceae*) révèle un pouvoir inférieur de la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par rapport au nos extraits éthanoliques de 3 plantes étudiées (Rajeshwar et al., 2005).

Yildirim et al (2001) suggèrent que les feuilles de *Cydonia vulgaris* extraites par l'éthanol présentent un pouvoir réducteur de l'ordre de 0,95 plus faible par rapport aux extraits éthanoliques de *P.lentiscus* (2,011) et *P.atlantica* (2,2345) et supérieur à celui d'*I.viscosa* (0,8315) à une concentration de 0,5mg.

Le pouvoir réducteur des extraits bruts du *Rosmarinus officinalis* L est meilleur par rapport au *Myrtus comminus* (Hadafi et al., 1998).

Une étude réalisé in vivo montre que l'administration des composés antioxydants d'extrait de *Sempervivum tectorum* favorise une élévation significative de la réduction de fer dans l'iléum (Blazovics et al., 2002 in Blazovics et al., 2003).

1.2-Piégeage des anions superoxydes :

L'anion superoxyde est un radical libre qui joue un rôle important dans la formation des espèces oxygénées réactivées (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulier dans le système cellulaire (Stief, 2003 in Jiao et al., 2005). Il peut aussi réagir avec l'oxyde nitrique et forme le peroxyde nitrite qui est responsable de la génération des composés toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitriques (Halliwell, 1997 in Jiao et al., 2005).

Cette étape de notre travail étudie la capacité de piégeage les radicaux superoxydes par les extraits bruts des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* en utilisant le système d'autoxydation de pyrogallol.

Ce composé peut être oxydé rapidement dans les conditions alcalines et libère les anions superoxydes. Réciproquement, ces derniers peuvent accélérer l'autoxydation. Cependant, les anions superoxydes sont piégés par l'addition des antioxydants et par conséquent, l'autoxydation de pyrogallol est diminuée voire inhibée.

Les résultats du piégeage des anions superoxydes sont illustrés dans la figure 37.

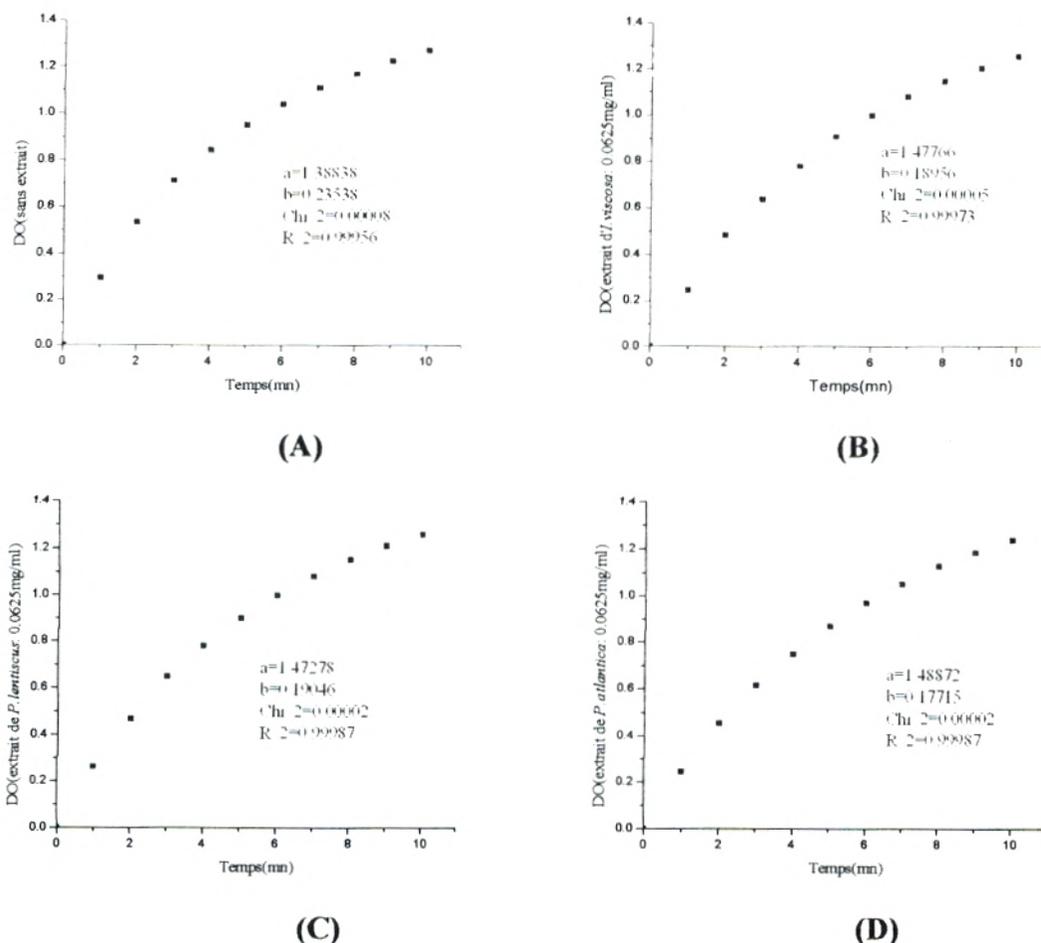


Figure 37 : Cinétiques de piégeage les anions superoxydes obtenues par l’inhibition de l’oxydation du pyrogallol par l’effet des extraits de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa*.

- **(A):** Autoxydation du pyrogallol ; **(B) :** Extrait d’*Imula viscosa* ;
- (C) :** Extrait de *Pistacia lentiscus* ; **(D) :** Extrait de *Pistacia atlantica*.
- La longueur d’onde : 325 nm ; pH 8,22 ; Concentration d’extraits 0,0625mg/ml.

Nous remarquons que tous les extraits présentent un effet de piégeage des anions superoxydes à une concentration très diluée de 0,0625 mg/ml (Figure 37). Le modèle choisi pour ajuster nos résultats est le modèle de **Wallach et al (1996)** dont la formule est la suivante :

$$y = a(1 - \exp(-bx))$$

La première dérivée de cette équation donne un taux correspondant à la vitesse d’oxydation (V) calculée à partir du produit de : $a \times b$.

$$V = a \times b = \frac{d[y]}{dx}$$

Le tableau suivant résume les paramètres obtenus par ce modèle qui nous permettent de calculer les pourcentages de piégeage les radicaux superoxydes (O_2^-).

Tableau 20 : Estimation des paramètres du modèle de Wallach et al (1996).

| Echantillons | Paramètres | | Vitesse d'oxydation V | Coefficient de corrélation R ² | Pourcentage de piégeage (%) S |
|----------------------------|------------|---------|--------------------------|--|----------------------------------|
| | a | b | | | |
| Sans extrait | 1,38838 | 0,23538 | 0,3267 | 0,99956 | |
| EB d' <i>Inula viscosa</i> | 1,47766 | 0,18956 | 0,2801 | 0,99973 | 14,28 |
| EB de <i>P.lentiscus</i> | 1,47278 | 0,19046 | 0,2805 | 0,99987 | 14,16 |
| EB de <i>P.atlantica</i> | 1,48872 | 0,17715 | 0,2637 | 0,99987 | 19,3 |

NB : EB signifie l'extrait brut des composés phénoliques.

L'activité la plus importante est notée chez l'extrait de *P.atlantica*, sa valeur est de l'ordre de 19,3%. Nous obtenons presque le même pourcentage pour les autres extraits de *P.lentiscus* et *I.viscosa*, 14,16 et 14,28 % respectivement.

Ces résultats ne nous permettent pas de calculer les concentrations des antioxydants dans les extraits qui peuvent inhiber 50% des anions superoxygènes (IC₅₀).

Cette activité a été reportée pour plusieurs extraits des plantes (Nagai et al., 2003 in Ekanayake et al., 2004).

Ekanayake et al (2004) suggèrent une forte activité de piégeage attribuée aux extraits de *Eptatretus burgeri* à 4mg/ml par rapport à nos extraits de 3 plantes à 0,0625mg/ml.

L'effet inhibitrice de l'autoxydation du pyrogallol de l'extrait brut des pigments isolé à partir de *Rubus fruticosus* révèle un pourcentage d'inhibition maximal de 90,48% dont la gamme des concentrations est variée entre 0,05 et 1,25mg/ml (Jiao et al., 2005), cet effet est supérieur à notre concentration utilisée pour nos extraits.

Haide et al (2004) montrent que les pourcentages d'inhibition d'autoxydation des diterpenoïdes tanshinones (tashinone IIA, cytotashinone, méthyltashinone) isolés à partir du *Salvia miltirrhiza* Bge égalent à 20% ; 53,3% et 40% respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles d'*I.viscosa* (14,28%), *P.lentiscus* (14,16%) et *P.atlantica* (19,3%). Cet effet est relativement lié à la structure de ces composés.

Le β-alanine C₆₀ possède une bonne activité à éliminer le radical superoxygène (O₂^{•-}). La concentration d'inhibition 50% (IC₅₀) est de 0,15mg/ml (Sun et al., 2001).

L'acide gallique identifié chez les deux pistachiers possède un effet de piégeage les radicaux (O₂^{•-}) libres, ceci a été vérifié par certains auteurs ou la présence de l'acide gallique et ses dérivés polygalloyl (5-O-galloyl ; 3,5-di-O-galloyl) est responsable de cette activité. (Hatano et al., 1989 ; Masaki et al., 1994 ; 1995 in Baratto et al., 2003).

En ce qui concerne l'extrait d'*I.viscosa*, l'activité antioxydante est probablement due à la présence de myricétine et la rutine, ce qui est confirmé par Schinalla et al (2002). Ces auteurs reportent que le pouvoir de piégeage des anions superoxydes peut être adopté aux flavonoïdes de type flavonols surtout les dérivés de la quercétine et les dérivés de sesquiterpènes.

Le mécanisme d'action des antioxydants sur l'autoxydation du pyrogallol est complexe. En effet, une cascade de processus oxydative est initiée par l'ajout du pyrogallol en présence d'oxygène moléculaire (O_2) dissout ou libre (Danilewicz, 2003). Les radicaux semiquinones et quinones sont formés une fois l'oxygène réduit au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 38).

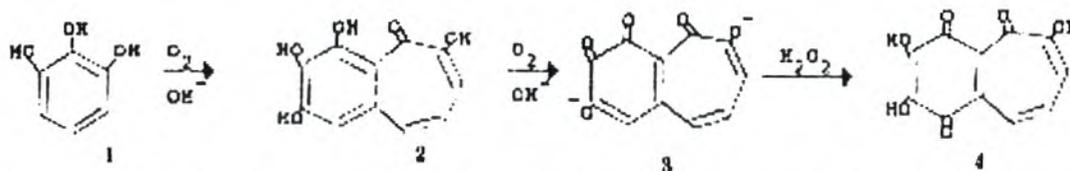


Figure 38 : Mécanisme de l'autoxydation du pyrogallol (Henry et al., 1989).

Dans des solutions alcalines, le pyrogallol (1,2,3-benzotriol, 1) réagit avec le dioxygène pour libérer le purpurogallin (Slawinska et al., 1978 in Henry et al., 1989) (2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocycloheptene-5-one, 2) et les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Cette forme dont la longueur d'onde maximale d'absorbance a eu lieu à 325nm donne une espèce de transition de couleur bleu (le dianion de purpurogalloquinone, 3) (λ_{max} : 600nm) qui à son tour réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former les espèces de peroxyde (4) (λ_{max} : 440nm) (Collier, 1966 in Henry et al., 1989)

Les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) accélèrent aussi l'autoxydation du pyrogallol (Jiao et al., 2004).

L'intervention de l'extrait végétal (flavonoïdes) inhibe la formation des intermédiaires de l'autoxydation du pyrogallol en piégeant les anions $O_2^{\cdot-}$. L'activité importante des flavonoïdes à piéger les radicaux superoxygènes reflète leur importance d'oxydation (Steenken et al., 1982 ; Javanovic et al., 1995 in Furuno et al., 2002).

Plusieurs études reportent que les flavonoïdes par leurs faibles potentiels redox (Oxydation électrochimique élevée) ont un pourcentage de piégeage élevé (Javanovic et al., 1995 ; 1996 ; Hodnick et al., 1988 ; Van Acker et al., 1996 in Furuno et al., 2002). Les sites primaires de l'oxydation électrochimiques des flavonoïdes sont les substituants hydroxyles dans le cycle B (Hendrickson et al., 1994 in Furuno et al., 2002).

1.3-Piégeage du radical libre DPPH $^{\cdot}$ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil):

Le DPPH $^{\cdot}$ est un radical libre, utilisé par les chercheurs dans des systèmes réactionnels pour évaluer l'efficacité des antioxydants et des flavonoïdes (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997 ; Brand-Williams et al., 1995 ; Sanchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto., 1998 in Qian et al., 2004).

1.3.1-Calcul les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH $^{\cdot}$:

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH $^{\cdot}$ par les extraits bruts des composés phénoliques sont calculés à partir de la formule de Yen et Duh (1994) in Qian et Nhorimbere (2004):

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{C(0)} - A_{\text{échantillon}(t)}}{A_{C(0)}} \right] \times 100$$

Où : $A_{C(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à $t=0$.

$A_{\text{échantillon}(t)}$: représente l'absorbance en présence des antioxydants à un temps t qui varie en fonction des concentrations.

Les résultats de l'activité antioxydante exprimés en pourcentage d'inhibition sont illustrés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Activité antioxydante des extraits bruts des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa*.

| Concentrations (g/l) | Trolox | Extrait éthanolique de <i>Pistacia lentiscus</i> | Extrait éthanolique de <i>Pistacia atlantica</i> | Extrait éthanolique d' <i>Imula viscosa</i> | Concentrations (g/l) | Acide ascorbique |
|----------------------|--------|--|--|---|----------------------|------------------|
| 0,25 | 73,07 | 41,29 | 89,40 | | 0,062 | 50,62 |
| 0,5 | 94,97 | 92,90 | 92,36 | 36,44 | 0,12 | 56,37 |
| 1 | 95,24 | 94,50 | 93,96 | 68,99 | 0,14 | 52,24 |
| 2 | 95,78 | 94,61 | 94,38 | 93,71 | 0,19 | 72,53 |
| 3 | 95,69 | 95,69 | 95,69 | 93,89 | 0,22 | 92,01 |
| | | | | | 0,24 | 92,28 |

NB : Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH^{*}.
L'acide ascorbique et le trolox sont des contrôles.

Nous constatons que l'acide ascorbique révèle un pourcentage d'inhibition élevé de 92,28% à la concentration 0,24g/l.

Pour tous les échantillons testés, l'habilité à décolorer les solutions méthanoliques du DPPH^{*} est presque complète à une concentration élevée. Il est possible d'obtenir un effet de piégeage le DPPH^{*} à 100%.

Les pourcentages d'inhibition du trolox et les extraits éthanoliques des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* varient entre 73,07 à 95,69% ; 41,29 à 95,69% et 89,40 à 95,69% respectivement.

L'extrait de la plante *Imula viscosa* présente une activité inférieure de l'ordre de 36,44 à 93,89% par rapport aux autres plantes.

1.3.2-Fraction résiduelle du DPPH^{*} (DPPH^{*}_{res}) en fonction du temps :

La diminution de l'absorbance du radical DPPH^{*} est expliquée par sa réduction en présence des extraits végétaux de *P.lentiscus*, *P.atlantica* et *I.viscosa* (Figure 39) (Sanchez-Moreno, 2002).

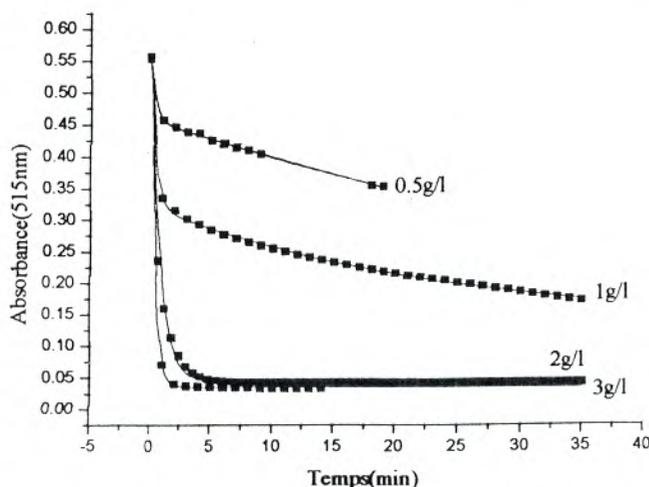


Figure 39 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps de l'extrait d'*Imula viscosa*.

Cette diminution résulte du changement de la couleur violette vers la couleur jaune lors de la formation du radical DPPH-H à partir de la libération d'atome d'hydrogène par les composés phénoliques des extraits et son acceptation par le radical DPPH[•]. Ces résultats obtenus de l'absorbance en fonction du temps ne nous permettent pas de calculer l'activité antioxydante (AA). Pour cela, il est nécessaire de transformer ces données à des fractions résiduelles du DPPH[•] dans les solutions méthanoliques en fonction du temps. Cette fraction résiduelle du DPPH[•] (DPPH[•]_{res}) est calculée par la formule suivante (Sanchez-Moreno, 2002) :

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet}_{\text{res}} = \frac{[\text{DPPH}^{\bullet}]_t}{[\text{DPPH}^{\bullet}]_{t=0}}$$

où :

$[\text{DPPH}^{\bullet}]_t$ et $[\text{DPPH}^{\bullet}]_{t=0}$ sont des concentrations du DPPH[•] à t=0 et t=t respectivement.

Les concentrations $[\text{DPPH}^{\bullet}]_t$ sont calculées en utilisant l'équation de la régression linéaire suivante :

$$A_{515\text{nm}} = 23 \times [\text{DPPH}^{\bullet}]_t \quad / \quad R^2 = 0.997$$

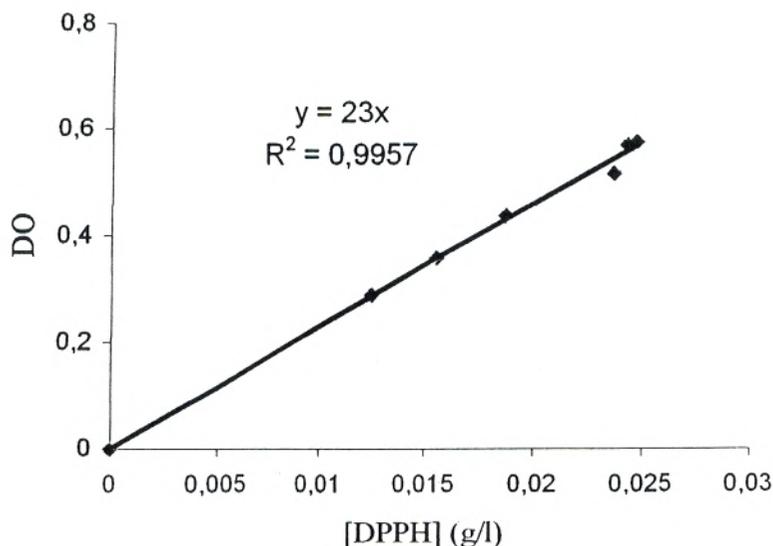


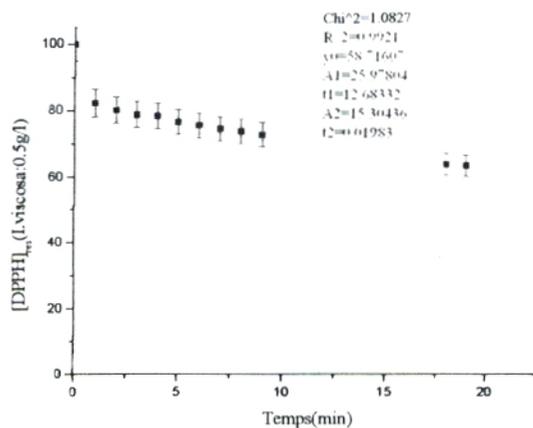
Figure 40 : Courbe d'étalonnage du radical DPPH[•]

Les courbes illustrées dans les figures (41, 42, 43, 44, 45) exprimées en pourcentages résiduels du DPPH[•] en fonction des temps sont tracées à partir d'un modèle exponentiel dont la formule est la suivante :

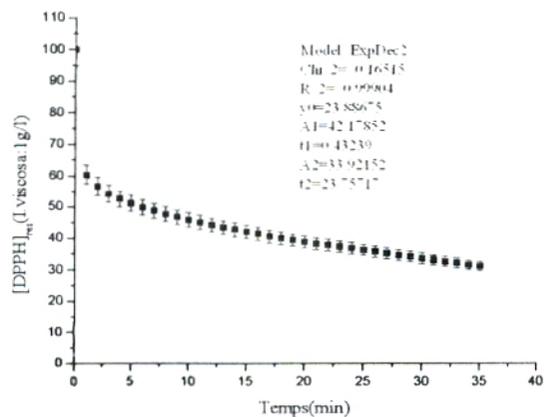
$$y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2} \quad (\text{Equation 1})$$

Où :

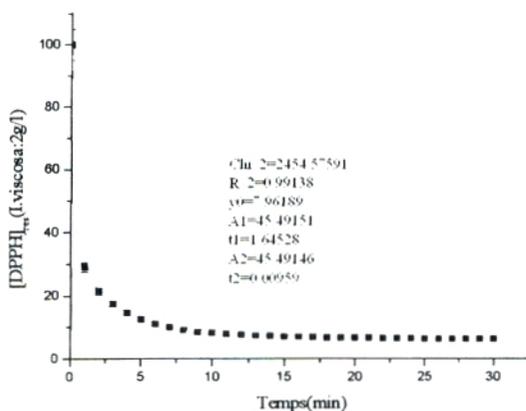
y_0, A_1, A_2, t_1, t_2 sont des constants.



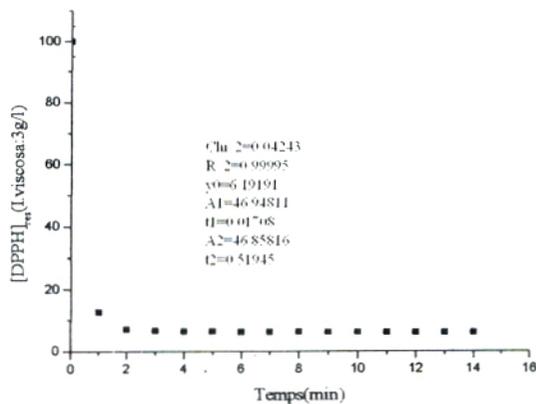
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 41: Fraction résiduelle du DPPH[•] en fonction du temps de l'extrait brut d'*Inula viscosa*.

- (a) Concentration de 0,5g/l
- (b) Concentration de 1g/l
- (c) Concentration de 2g/l
- (d) Concentration de 3g/l

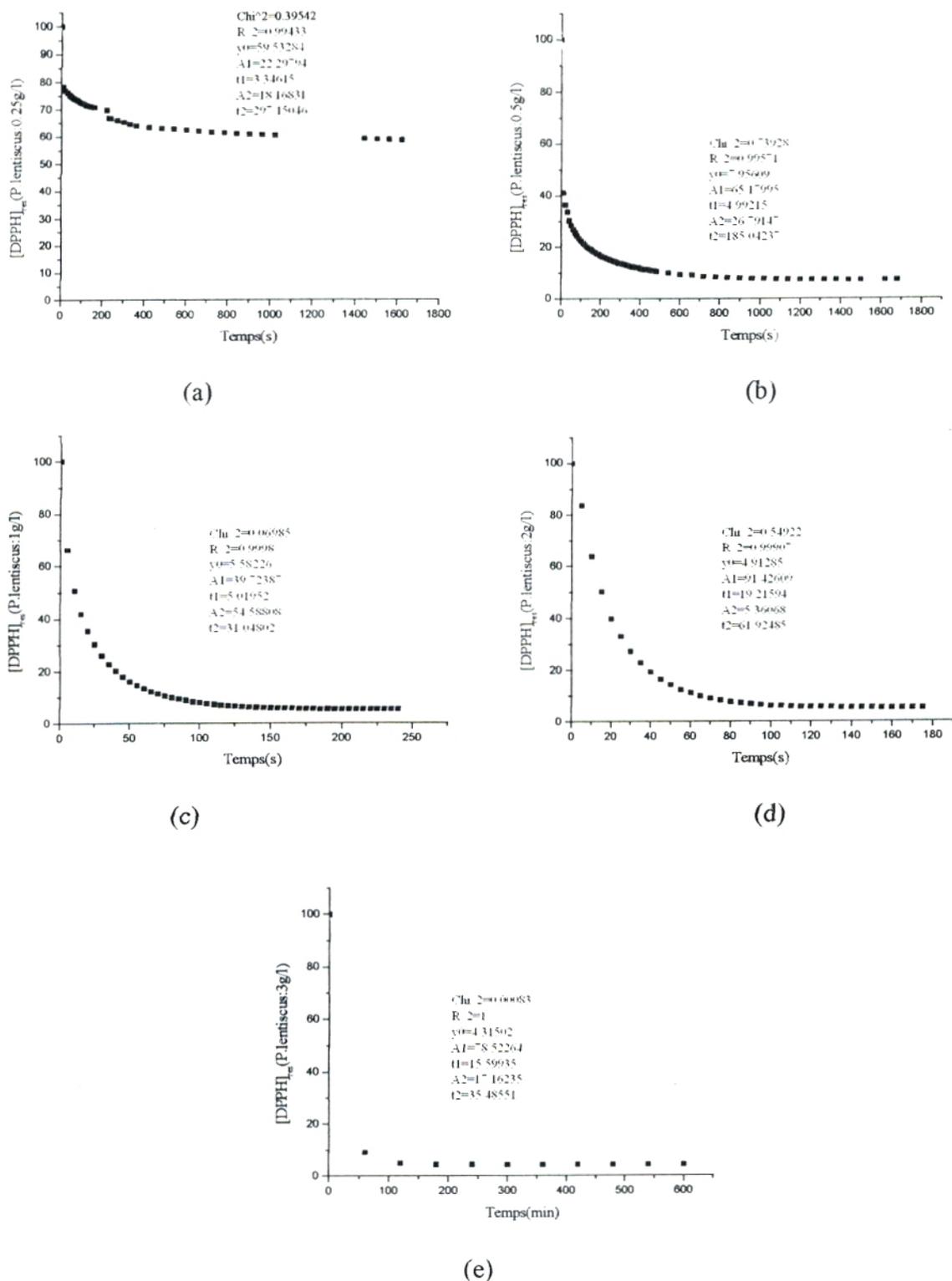
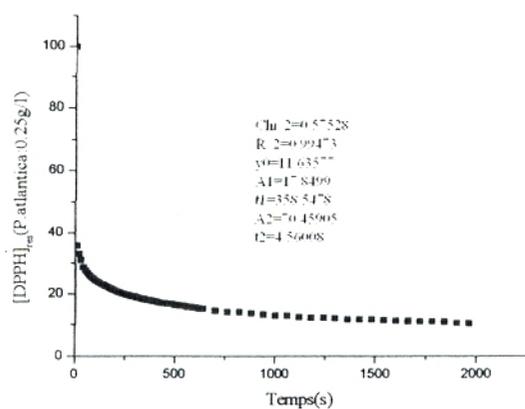
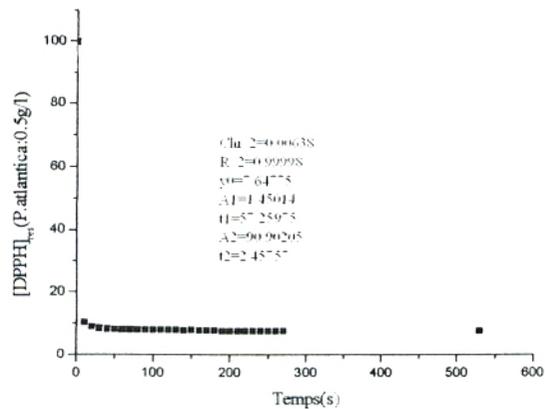


Figure 42 : Fraction résiduelle du DPPH* en fonction du temps de l'extrait brut de *Pistacia lentiscus*.

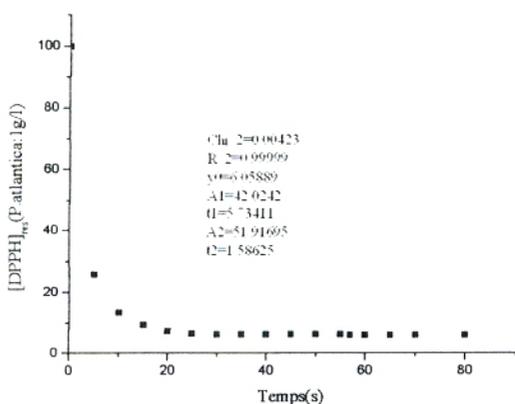
- (a) Concentration de 0,25g/l
- (b) Concentration de 0,5g/l
- (c) Concentration de 1g/l
- (d) Concentration de 2g/l
- (e) Concentration de 3g/l



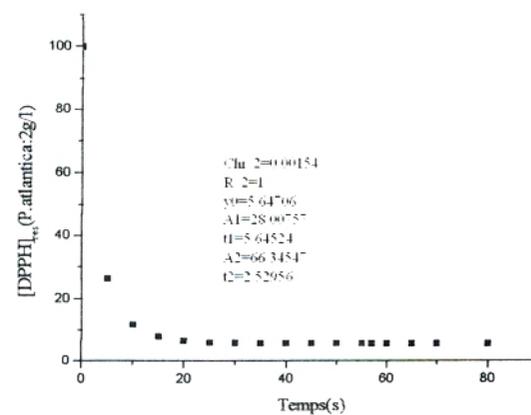
(a)



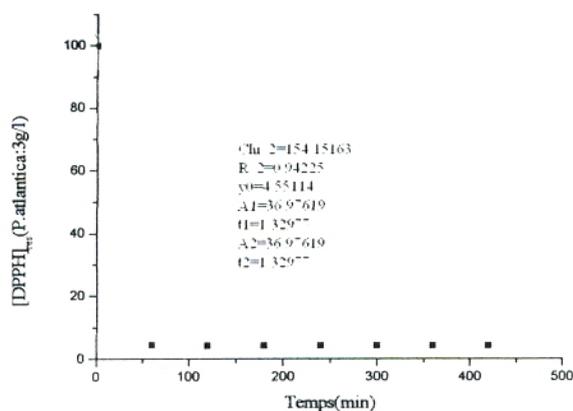
(b)



(c)



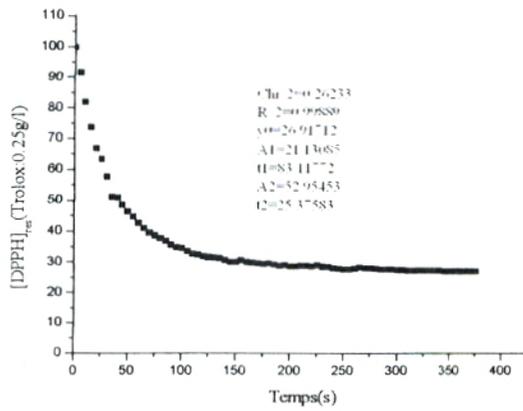
(d)



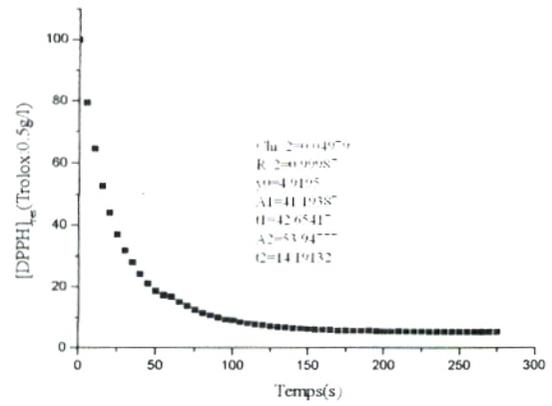
(e)

Figure 43 : Fraction résiduelle du DPPH• en fonction du temps de l'extrait brut de *Pistacia atlantica*.

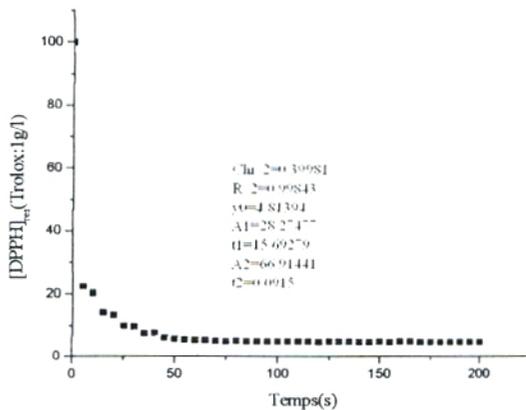
- (a) Concentration de 0,25g/l
- (b) Concentration de 0,5g/l
- (c) Concentration de 1g/l
- (d) Concentration de 2g/l
- (e) Concentration de 3g/l



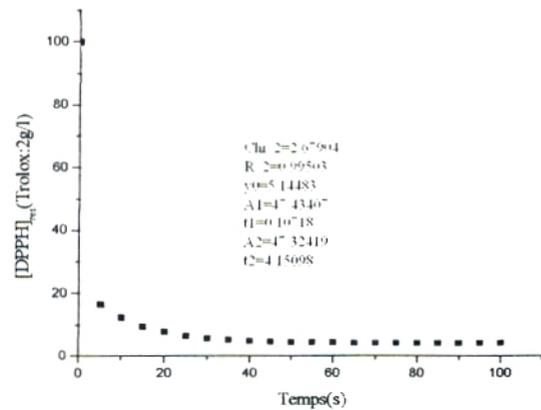
(a)



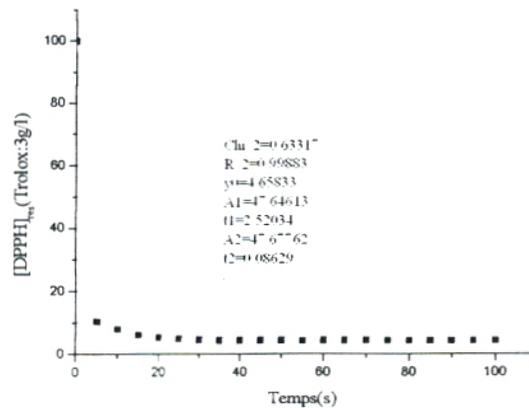
(b)



(c)



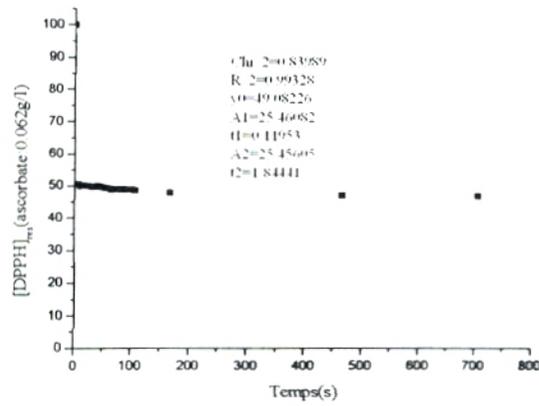
(d)



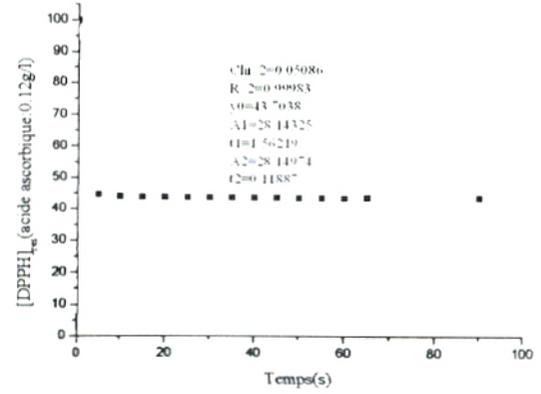
(e)

Figure 44 : Fraction résiduelle du DPPH* en fonction du temps de trolox.

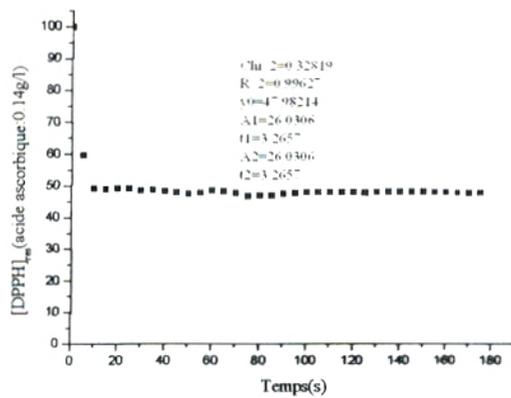
- (a) Concentration de 0,25g/l
- (b) Concentration de 0,5g/l
- (c) Concentration de 1g/l
- (d) Concentration de 2g/l
- (e) Concentration de 3g/l



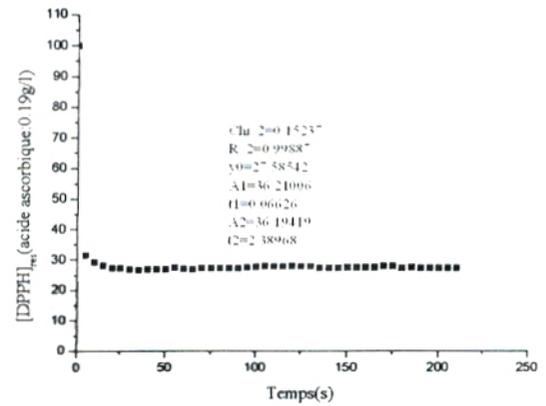
(a)



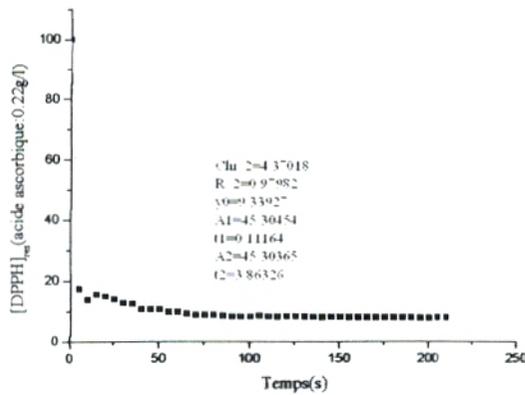
(b)



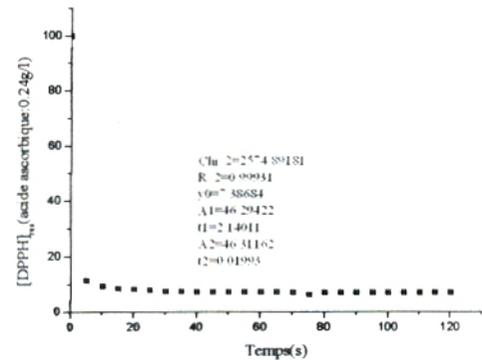
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 45 : Fraction résiduelle du DPPH• en fonction du temps de l'acide ascorbique.

- (a) Concentration de 0,062g/l
- (b) Concentration de 0,12g/l
- (c) Concentration de 0,14g/l
- (d) Concentration de 0,19g/l
- (e) Concentration de 0,22g/l
- (f) Concentration de 0,24g/l

Dans le cas d'une cinétique rapide, pratiquement, tous les échantillons à des concentrations élevées réagissent dans un temps court pour aboutir la phase stationnaire immédiatement. A l'inverse, une cinétique lente dont les concentrations sont faibles implique une période longue avant d'aboutir à cette phase stationnaire.

Nous remarquons que l'extrait de *P.atlantica* possède une activité élevée du piégeage du radical DPPH* par rapport aux extraits des autres plantes et le trolox à partir de la concentration 0,25g/l (Figure 43).

L'évaluation des pourcentages résiduels du DPPH* à la phase stationnaire en fonction des concentrations est résumée dans le tableau (22).

Tableau 22 : Comportements cinétiques des extraits bruts et les contrôles.

| Echantillons | Concentrations (g/l) | Concentrations (mg d'antioxydant/ g DPPH*) | Temps (min) à la phase stationnaire | Pourcentages résiduels du DPPH* à la phase stationnaire | R ² | y ₀ |
|------------------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|---|----------------|----------------|
| EB d' <i>Inula viscosa</i> | 0,5 | 200 | 40 | 58,71 | 0,9921 | 58,71607 |
| | 1 | 400 | 35 | 23,88 | 0,99904 | 23,88675 |
| | 2 | 800 | 26 | 6,18 | 0,99138 | 7,96189 |
| | 3 | 1200 | 11 | 6,009 | 0,9995 | 6,19191 |
| EB de <i>Pistacia lentiscus</i> | 0,25 | 100 | 30 | 59,53 | 0,99433 | 59,53284 |
| | 0,5 | 200 | 25 | 7,08 | 0,99571 | 7,95609 |
| | 1 | 400 | 3,25 | 5,48 | 0,9998 | 5,58226 |
| | 2 | 800 | 2,58 | 5,39 | 0,99907 | 4,91285 |
| | 3 | 1200 | 5 | 4,29 | 1 | 4,31502 |
| EB de <i>Pistacia atlantica</i> | 0,25 | 100 | 33,33 | 11,63 | 0,99473 | 11,6377 |
| | 0,5 | 200 | 3,16 | 7,62 | 0,99998 | 7,64775 |
| | 1 | 400 | 1 | 6,02 | 0,99999 | 6,05889 |
| | 2 | 800 | 1,16 | 5,13 | 1 | 5,64706 |
| | 3 | 1200 | 2 | 4,29 | 0,94225 | 4,55114 |
| Trolox | 0,25 | 100 | 6,16 | 26,93 | 0,99889 | 26,91712 |
| | 0,5 | 200 | 4,33 | 5,03 | 0,99987 | 4,9195 |
| | 1 | 400 | 2 | 4,76 | 0,99943 | 4,81394 |
| | 2 | 800 | 1,08 | 4,22 | 0,99502 | 5,14463 |
| | 3 | 1200 | 1,25 | 4,31 | 0,99883 | 4,65833 |
| Acide ascorbique | 0,062 | 24,8 | 1,5 | 49,03 | 0,99328 | 49,08226 |
| | 0,12 | 48 | 0,83 | 43,64 | 0,99983 | 43,7038 |
| | 0,14 | 56 | 2,75 | 47,88 | 0,99627 | 47,98 |
| | 0,19 | 76 | 3,41 | 27,49 | 0,99887 | 27,58542 |
| | 0,22 | 88 | 2,91 | 7,98 | 0,97982 | 9,99927 |
| | 0,24 | 96 | 1,16 | 7,18 | 0,99931 | 7,38684 |

NB : EB : représente l'extrait brut

R² : représente le coefficient de corrélation.

Nous constatons que nos résultats sont bien modélisés, ceci est confirmé par le coefficient de corrélation qui varie entre 0,94225 et 1 (Tableau 22).

L'augmentation de la concentration de l'extrait brut des 3 plantes et les contrôles révèle une diminution proportionnelle de y₀ et le pourcentage résiduel du DPPH*.

Dans le cas de 3g/l, la phase stationnaire est atteinte après 11 min pour *I.viscosa*, 2min pour *P.atlantica*, 5min pour *P.lentiscus* et 1,25min pour le trolox.

Pour l'acide ascorbique, à la concentration 0,24g/l, la phase stationnaire est obtenue après 1,16 min.

En conséquence, les valeurs de y_0 peuvent être utilisées comme paramètres de comparaison du comportement de la cinétique des différents antioxydants à des concentrations similaires.

1.3.3-Fraction résiduelle du DPPH* (DPPH*_{res}) en fonction des concentrations des antioxydants :

La concentration de l'extrait brut des composés phénoliques [PheOH] nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du DPPH* (EC_{50}) est un paramètre généralement utilisé pour mesurer la puissance antioxydante (Robak et Gryglewski, 1988 ; Yoshida et al.,1989 ; Cuvelier et al.,1992 ; Gieseg et Esterbauer, 1994 ; Kanner et al.,1994 ; Vinson et al.,1995a in Sanchez-Moreno et al.,1998).

Ce paramètre EC_{50} est une mesure quantitative directe pour l'activité antioxydante (AA). Cette activité élevée est caractérisée par une valeur EC_{50} faible et inversement (Qian et al., 2004).

La concentration EC_{50} est déterminée à partir des pourcentages résiduels du DPPH* en fonction des concentrations des extraits bruts des composés phénoliques exprimées en mg d'antioxydant/g DPPH* .

Le modèle utilisé est une équation exponentielle appliquée pour les 3 extraits bruts de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa* ainsi que les contrôles (figure 46; tableau 23).

$$y = y_0 + ae^{-bx} \quad \text{Equation 2}$$

Où : y_0 , a, b sont des constants.

Tableau 23 : Détermination des concentrations EC_{50} et la classification de leurs cinétiques.

| Echantillons | EC_{50} (mg d'antioxydant /g DPPH*) | Gamme de temps (min) à la phase stationnaire pour les concentrations d'extraits bruts | R^2 | Temps de EC_{50} (T_{EC50}) | Classification |
|-------------------------------------|---|---|---------|---|----------------|
| EB <i>Imula viscosa</i> | 220,35 | 11-40 | 0,99014 | 39,33 | Faible |
| EB <i>Pistacia lentiscus</i> | 90,87 | 2,8-30 | 0,95034 | 33,524 | Faible |
| EB <i>Pistacia atlantica</i> | 27,76 | 1-33,33 | 0,99935 | 259,56 | Faible |
| Acide ascorbique | 39,53 | 0,83-3,41 | 0,91712 | 0,606 | Rapide |
| Trolox | 49,21 | 1,08-6,16 | 0,99777 | 7,803 | Intermédiaire |

NB : EB : représente l'extrait brut

R^2 : représente le coefficient de corrélation.

Après analyse de nos résultats nous déduisons que la faible valeur EC_{50} révèle un temps de réaction court (Tableau 23).

Les valeurs EC_{50} égales à 27,76 ; 90,87 et 220,35 mg/g équivalent aux extraits bruts éthanoliques de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa* respectivement. L'acide ascorbique et le trolox présentent les valeurs 39,53 et 49,21 mg d'antioxydant/g DPPH[•] (Tableau 23).

La comparaison de ces valeurs à celles des contrôles, nous permet de déduire que l'extrait brut de *P.atlantica* détient une activité élevée du piégeage du radical DPPH[•].

La classification de la cinétique des antioxydants basée sur le temps à la phase stationnaire a été reportée (Brand-Williams et al., 1995 in Sanchez-Moreno et al., 1998), mais ces auteurs n'ont pas considéré que ce temps dépend de la concentration de l'antioxydant (Tableau 23).

Cette classification d'après Sanchez-Moreno et al (1998) est donnée comme suit :

< 5min (rapide) ; 5-30min (intermédiaire) et >30min (faible).

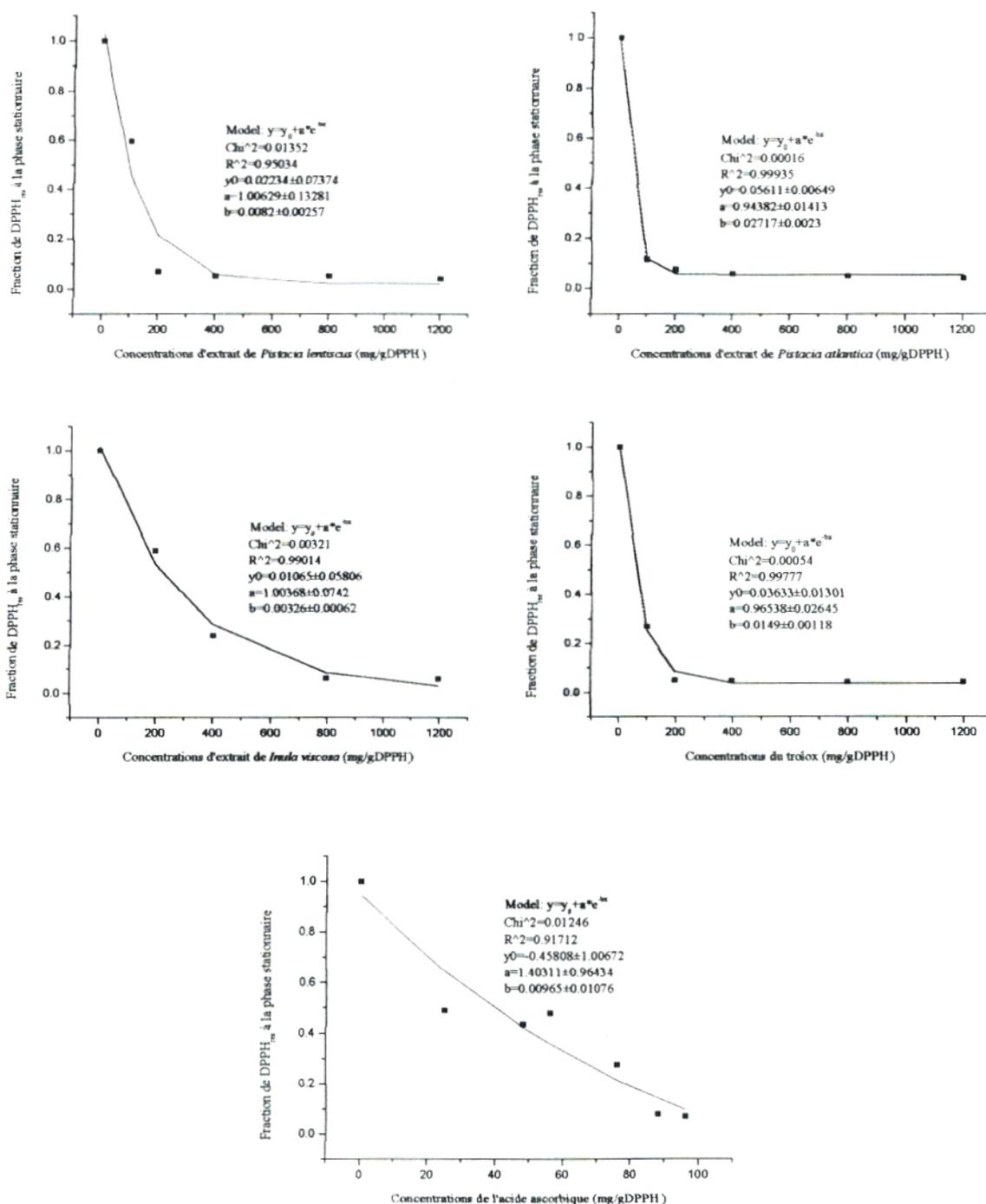


Figure 46 : Fractions résiduelles du DPPH* (DPPH_{res}) à la phase stationnaire en fonction des concentrations des échantillons (mg d'antioxydant/g DPPH*).

Le temps T_{EC50} est le temps nécessaire pour parvenir le plateau à une concentration correspondante à EC_{50} . Il est obtenu par la modélisation des temps à la phase stationnaire en fonction des concentrations pour chaque extrait éthanolique.

Les modèles utilisés pour calculer ce temps sont donnés par les équations suivantes :

- ❖ Modèle exponentiel pour *P.lentiscus*, *P.atlantica* et le trolox :

$$y=(a-b)e^{-cx}+b$$

- ❖ Modèle polynomial logarithmique pour l'acide ascorbique :

$$y=a+bx\ln(x)+cx^{1.5}+dx^2\ln(x)$$

- ❖ Modèle polynomial pour *I.viscosa* :

$$y=a+bx+cx^2$$

La figure 47 regroupe la variation des temps à la phase stationnaire en fonction des concentrations de chaque extrait brut (mg d'antioxydant/g DPPH*)

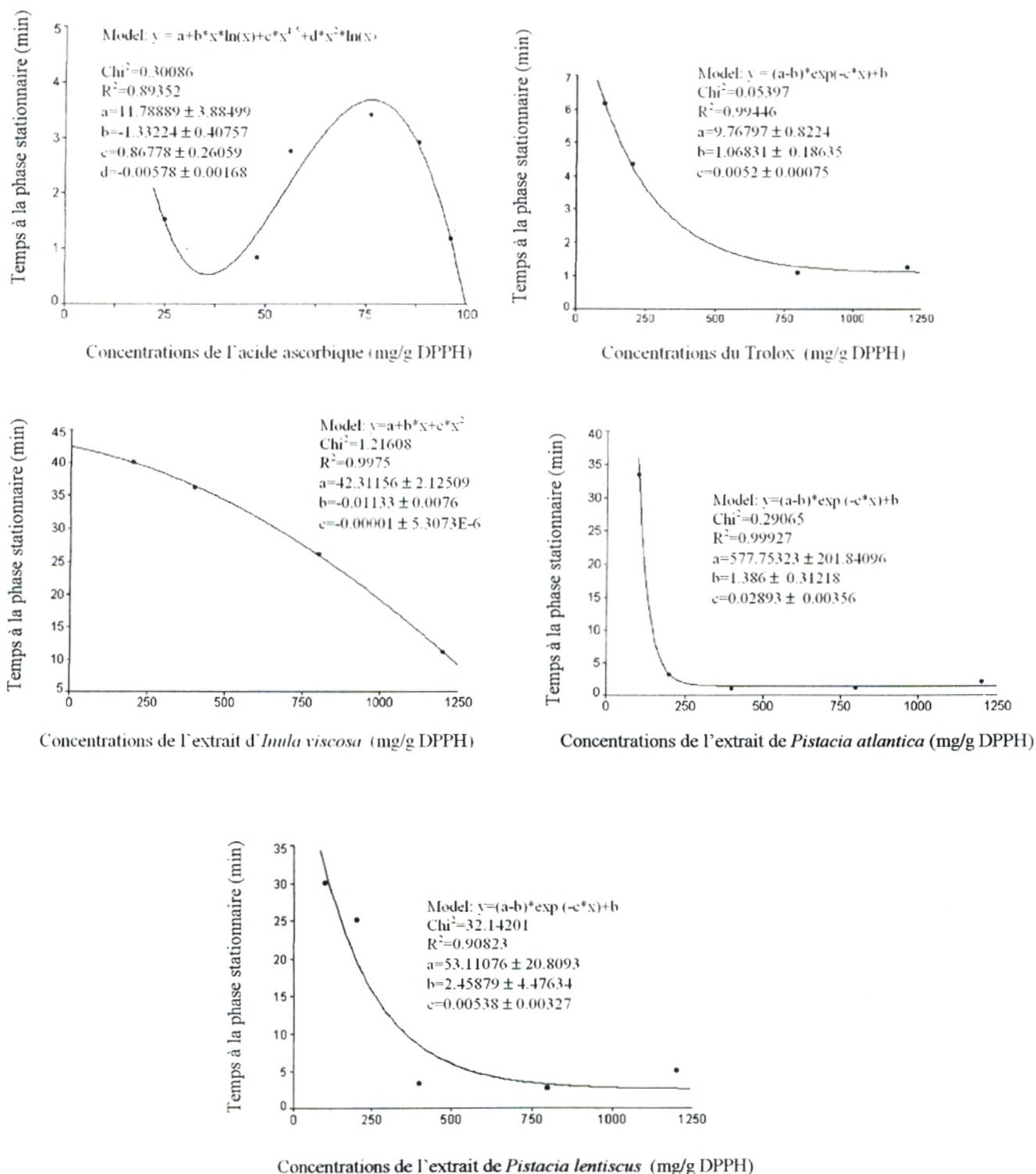


Figure 47 : Détermination du temps nécessaire à aboutir à la phase stationnaire de la concentration EC_{50}

1.3.4-Efficacité antiradicalaire :

Le paramètre « l'efficacité antiradicalaire (AE) » est utilisé mieux que EC_{50} pour différencier et classer les différents antioxydants, pour cela il faut utiliser la puissance $\frac{1}{EC_{50}}$ et le temps $T_{EC_{50}}$.

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC_{50}}} \quad (\text{Sanchez-Moreno, 1998}).$$

Nos résultats de l'efficacité antiradicalaire (AE) sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Efficacités antiradicalaires des extraits bruts des composés phénoliques (*P.lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa*) et les contrôles (Acide ascorbique et trolox).

| Echantillons | Coefficient de corrélation (R^2) | EC_{50} (mg d'antioxydant /g DPPH*) | Temps EC_{50} ($T_{EC_{50}}$) | Efficacités antiradicalaires ^(a) (AE) ($\times 10^{-3}$) | Phénols totaux (mg /g) ^(e) | Classification |
|--|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------------|----------------|
| EB d' <i>Imula viscosa</i> ^(c) | 0,9975 | 220,35 | 39,33 | 0,1153 | 1,46 ± 1,13 | Faible |
| EB de <i>Pistacia lentiscus</i> ^(b) | 0,90823 | 90,87 | 33,524 | 0,328 | 0,90 ± 0,05 | Faible |
| EB de <i>Pistacia atlantica</i> ^(b) | 0,99927 | 27,76 | 259,56 | 0,1387 | 1,96 ± 0,70 | Faible |
| Acide ascorbique ^(d) | 0,89352 | 39,53 | 0,606 | 41,74 | | Très élevée |
| Trolox ^(b) | 0,99446 | 49,21 | 7,803 | 2,60 | | moyenne |

NB : EB représente l'extrait brut.

(a) Efficacité antiradicalaire (AE) = $\frac{1}{EC_{50} \times T_{EC_{50}}}$

(b) Modèle exponentiel, $y = (a-b)e^{-cx} + b$

(c) Modèle polynomial, $y = a + bx + cx^2$

(d) Modèle polynomial logarithmique, $y = a + bx \ln(x) + cx^{1,5} + dx^2 \ln(x)$

(e) Phénols totaux exprimés en mg équivalent pyrocatechol /g d'extrait sec.

Ces résultats nous montrent, une faible concentration EC_{50} à un temps $T_{EC_{50}}$ faible ayant une valeur AE élevée.

Les EC_{50} de l'extrait brut des composés phénoliques de *P.atlantica* et l'acide ascorbique sont plus ou moins comparables, alors que la différence du temps $T_{EC_{50}}$ égale à 258,95min entre ces deux antioxydants, ceci nous permet de déduire que les EC_{50} sont indépendants du temps $T_{EC_{50}}$ (Tableau 24).

En effet, l'efficacité antiradicalaire de l'acide ascorbique est de l'ordre de $41,74 \times 10^{-3}$ supérieure à celle de *P.lentiscus*, *P.atlantica*, *I.viscosa* et le trolox dont les valeurs sont $0,328 \times 10^{-3}$; $0,1383 \times 10^{-3}$; $0,1153 \times 10^{-3}$ et $2,60 \times 10^{-3}$ respectivement.

Tous dépendent de la classification suivante : ($AE \leq 1 \times 10^{-3}$ faible; $1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ moyenne; $5 \times 10^{-3} < AE \leq 10 \times 10^{-3}$ élevée ; $AE > 10 \times 10^{-3}$ très élevée) (Sanchez-Moreno et al.,1998), la valeur AE de l'acide ascorbique est très élevée, celle du trolox est moyenne et le reste est faible.

L'ordre de classification des AE des extraits bruts de *P.lentiscus*, *P.atlantica*, *I.viscosa* et les contrôles (trolox, acide ascorbique) est : Acide ascorbique > Trolox > Extrait brut de *P.lentiscus* > Extrait brut de *P.atlantica* > Extrait brut d'*I.viscosa*, ceci nous ramène à conclure que AE reste un paramètre puissant pour évaluer l'activité antioxydante par rapport à EC_{50} .

Discussion :

Nos résultats montrent que l'acide ascorbique possède une puissance antioxydante plus élevée du piégeage du radical DPPH[•] de l'ordre de $41,74 \times 10^{-3}$ par rapport à $11,44 \times 10^{-3}$ et $0,80 \times 10^{-3}$ respectivement trouvées par Sanchez-Moreno (1998) et Qian et Nihorimbere (2004). Alors que, sa concentration EC_{50} égale à $39,53 \text{ mg/g DPPH}^{\bullet}$ par rapport à 76 et 50 mg/g DPPH[•] reportées par ces auteurs.

Cette différence peut être due aux différentes concentrations d'acide ascorbique testées.

En effet, il est reporté que l'acide ascorbique réagit immédiatement avec le radical DPPH[•] et aboutit à la phase stationnaire dans 15 secondes (Jukić et Milos, 2005).

Dans notre cas, cette phase parvient après 1,16 min par rapport à 1,15 min mentionnée par Sanchez-Moreno (1998).

En effet, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH[•] par les contrôles (l'acide ascorbique et le trolox) sont comparables à ceux trouvés par Qian et Nihorimbere (2004).

La puissance antioxydante de ces deux contrôles est aussi reportée par d'autres auteurs : acide tannique > quercétine > rutine > acide ascorbique > DL - α -tocophérol (Robak et Gryglewski, 1988 ; Yoshida et al.,1989 ; Cuvelier et al.,1992 ; Vinson et Hontz, 1995 ; Vinson et al.,1995a,b in Sanchez-Moreno, 1998).

Nous avons pu identifier l'acide gallique chez les deux espèces du genre *Pistacia* par chromatographie sur couche mince (CCM). L'activité antioxydante de *P.lentiscus* et *P.atlantica* peut être due probablement à ce composé, ceci est confirmé par Baratto et al (2003). Ces auteurs ont montré que l'activité antioxydante est due principalement aux acides galliques et les dérivés galloyl (5-O-galloyl; 3,5-O-digalloyl; 3,4,5-tri-O-galloyl) et que le pourcentage du piégeage du radical DPPH augmente avec le nombre du groupe galloyl (l'augmentation des groupes OH).

Il est aussi noté que la quercétine et l'acide gallique sont des puissants antioxydants (Kumazawa et al., 2002 in Makris et Kefalas, 2004).

Il est connu que les monophénols sont moins efficaces que les polyphénols (Sanchez-Moreno, 1998 ; Qian et Nihorimbere, 2004).

Dans l'acide gallique, l'effet inductif de ces 3 groupes hydroxyles est un facteur important dans l'augmentation de son activité antioxydante (Sanchez-Moreno, 1998).

Cette activité peut être significative dans le cas des monophénols par d'autres facteurs, parmi eux, par la présence des substitutions méthoxy comme dans le cas du 3-tri-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) (Sanchez-Moreno, 1999) (Annexe 9).

Pour les acides phénoliques, cette action est moins importante que l'addition du groupe hydroxyle et par conséquent, l'acide férulique reste moins efficace que l'acide caféique (Annexe 9).

L'accès au centre du radical DPPH[•] de chaque polyphénol peut être aussi influencé l'ordre de classification de la puissance antioxydante.

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques chez l'espèce *P.lentiscus* révèle que la faible teneur en phénols totaux (0,90mg/g) possède une efficacité antiradicalaire la plus élevée de l'ordre de $0,328 \times 10^{-3}$ par rapport à celle du *P.atlantica* (AE : $0,1387 \times 10^{-3}$). Pour la plante *I.viscosa*, nos résultats montrent que les phénols totaux élevés (1,46 mg /g d'extrait sec) présentent une activité antioxydante faible ($0,1153 \times 10^{-3}$) (Tableau 24). Nous pouvons déduire qu'il n'y a pas de relation entre la teneur en phénols totaux et les valeurs de l'efficacité antiradicalaire et que cette activité n'est pas limitée aux composés phénoliques, elle peut être due à la présence d'autres antioxydants des métabolites secondaires comme les lignanes, les alcaloïdes, les terpènes, les caroténoïdes et les vitamines (acide ascorbique) (Jiménez-Escrig et al., 2001; Ng et al., 2000 in Schinella et al., 2002 ; Javanmardi et al., 2003).

Peu d'informations ont été réalisées sur le comportement de la cinétique des composés phénoliques dans le processus d'oxydation (Robak et Gryglewski, 1988 ; Gieseg et Esterbauer, 1994 in Sanchez-Moreno et al., 1998). Ainsi, il est reporté que la puissance antioxydante résulte :

- ❖ Premièrement, de la capacité à prévenir l'autoxydation du radical libre, dont il est médiateur de l'oxydation du substrat à une concentration faible.
- ❖ Deuxièmement, que le radical résultant après le piégeage doit être stable (Halliwell, 1990 in Sanchez-Moreno et al., 1998).

Le mécanisme d'action des flavonoïdes (FIOH) pour piéger les radicaux libres (R[•]) peut être expliqué par la principale réaction suivante (Amié et al., 2003) :

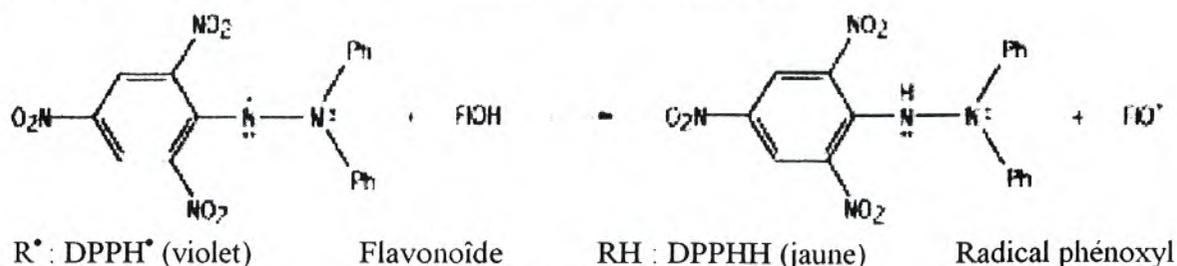
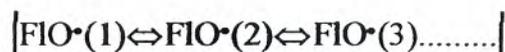


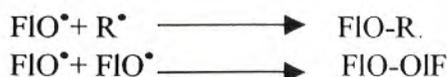
Figure 48 : Piégeage du radical libre DPPH[•] par le flavonoïde (Amié et al., 2003).

Cette réaction aboutit à la formation du radical phénoxy (FIO[•]) et la molécule stable (RH). Les FIO[•] sont soumis à un changement intrinsèque résultant de la structure de résonance par la distribution de l'électron impaire dans le noyau aromatique pour donner les formes suivantes (Sanchez-Moreno,1998 ; Amié et al., 2003) :



Où (1), (2) et (3) sont des structures de résonance.

Ces phénoxy sont exposés à une série de réaction avec le R[•], probablement par la réaction du couplage Radical-Radical.



1.4- Piégeage du radical libre DPPH par les composés phénoliques en utilisant la CCM :

Le test de DPPH (Wagner, 1996 in Oke et Hamburger, 2002) donne une information sur la réactivité des composés phénoliques dans les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol avec le radical stable. Au cours de sa possession d'un électron impaire, le radical 2,2-diphényl-picril-hydrazyl (DPPH) présente une forte bande d'absorption à 517nm dans la spectroscopie visible. Les solutions méthanoliques deviennent incolores.

Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau 25.

Tableau 25 : Résultats de l'essai de l'activité antioxydante.

| | Extrait par | Extrait acétate d'éthyle | RF | Résultats de l'activité antioxydante | Extrait n-BUOH | RF | | Révélation UV 365 nm | Témoins |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------|--------------------------------------|----------------|--------|--|----------------------|-------------|
| <i>P. atlantica</i> (Ain Fezza) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,10 | ++ | 1 | 0,15 | | Violet | Ac-gallique |
| | | 2 | 0,21 | | 2 | 0,25 | | Marron | |
| | | 3 | 0,44 | +++ | 3 | 0,39 | | Bleu -violet | |
| | | 4 | 0,54 | | 4 | 0,46 | | Violet | |
| | | 5 | 0,70 | | 5 | 0,54 | | Violet | |
| | | 6 | 0,80 | | 6 | 0,57 | | Jaune | |
| | | 7 | | | 7 | 0,70 | | Jaune | |
| | | 8 | | | 8 | 0,80 | | Violet | |
| <i>P. lentiscus</i> (Oum El Alou) | Ethanol (Les feuilles) | 1 | 0,10 | + | 1 | 0,12 | | Violet | |
| | | 2 | 0,17 | | 2 | 0,17 | | Marron | |
| | | 3 | 0,21 | | 3 | 0,20 | | Violet | |
| | | 4 | 0,68 | | 4 | 0,23 | | Bleu | |
| | | 5 | 0,80 | | 5 | 0,39 | | Violet | |
| | | 6 | | 6 | 0,50 | Violet | | | |
| | | 7 | | 7 | 0,55 | Jaune | | | |
| | | 8 | | 8 | 0,68 | Marron | | | |
| | | 9 | | 9 | 0,71 | Violet | | | |
| | | 10 | | 10 | 0,80 | Violet | | | |

+++ : Antioxydant à une quantité élevée ; ++ : Antioxydant à une quantité moyenne ;

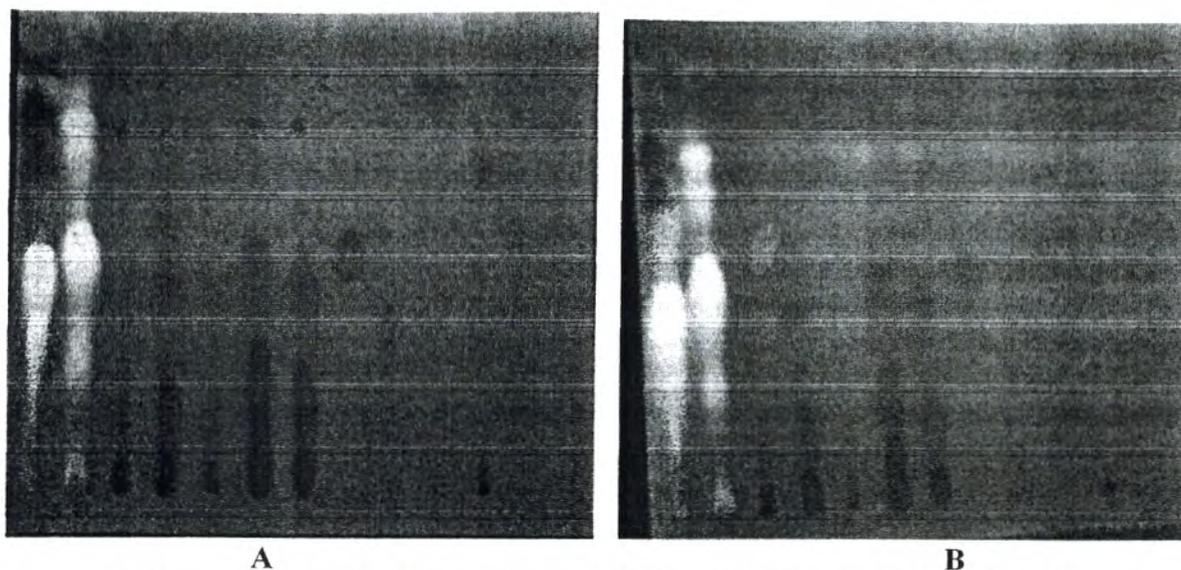
+ : Antioxydant à une faible quantité.

Ac : représente l'acide ; p : signifie para.

Dans cette étape, nous avons pu montrer la présence de l'activité antioxydante de différents degrés dans le genre *Pistacia* (*Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*) en particulier l'acide gallique (RF: 0,46) et l'acide p-coumarique (RF: 0,80) (Figure 49).

Ces résultats confirment les travaux de plusieurs auteurs qui ont mis en évidence l'habileté du piégeage du radical DPPH[•] par l'acide gallique et les glucoses galloyl (Baratto et al., 2003 ; Yokozawa et al., 1998 ; Yoshida et al., 1989 in Baratto et al., 2003).

Pour les deux fractions d'*Inula viscosa*, aucun virage de couleur n'a pas été détecté après pulvérisation par la solution méthanolique du DPPH[•]. Ceci peut être expliqué par certains auteurs qui ont suggéré que la présence de synergie entre les constituants de l'extrait phénolique peut être responsable à son efficacité antioxydante (Vardar-Ünlü et al., 2003 in Jukić et Miloš, 2005). Cette action fait intervenir d'autres classes phénoliques, citons à titre d'exemple : flavones, flavanones, flavonols (Makris et Kefalas, 2004).



Solvant : Butanol/acide acétique/eau (4/1/5) ; Adsorbant : Polyamide DC₆ ;
Révélation UV : 365nm ; (A) : la CCM comme témoin ; (B) : la CCM- DPPH[•].

Figure 49 : Composés phénoliques responsables de l'action du piégeage du radical DPPH[•].

2-Les huiles essentielles :

2.1-Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

L'habilité des huiles essentielles à donner des atomes d'hydrogène et des électrons au radical DPPH[•] pour le transformer à sa forme réduit DPPH-H est mesurée au spectrophotomètre. Les valeurs de l'absorbance à 515nm de l'effet des huiles essentielles des plantes médicinales : *P.lentiscus*, *P.atlantica*, *I.viscosa* et les contrôles sont mentionnées sur les annexes 7 et 8.

Les résultats de la capacité à piéger le radical DPPH[•] par les huiles essentielles et les contrôles sont donnés par les tableaux 26 et 27.

Tableau 26 : Valeurs du piégeage du radical DPPH[•] exprimées en pourcentage de neutralisation par les huiles essentielles de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa* en fonction des concentrations (g/ml).

| [HE] (g/ml) (Ent) | 0,004 | 0,005 | 0,006 | 0,01 | 0,013 | 0,0172 | 0,018 | 0,0186 | 0,02 | 0,04 | IC ₅₀ (mg/ml) |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|-----------------------------|
| RSC (%) (<i>I.viscosa</i>) Sidna Youchaa | 42,83 | 76,11 | 77,09 | 83,46 | 95,92 | 91,85 | 91,34 | 91,85 | 94,14 | 92,12 | 5,92 |
| RSC (%) (<i>P.lentiscus</i>) Ain Fezza | 10,68 | 11,7 | 4,47 | 28,88 | 25,95 | 63,35 | 56,046 | 79,38 | 67,93 | 98,98 | 15,63 |
| RSC (%) (<i>P.atlantica</i>) AinFezza | 15,77 | 17,55 | 27,98 | 29 | 44,27 | 59,28 | 68,95 | 67,68 | 76,08 | 92,62 | 13,50 |

NB : RSC : (Free Radical Scavenging Capacity) : représente la capacité du piégeage du radical libre DPPH[•] ; IC₅₀ : représente la concentration de neutralisation à 50%.

Tableau 27 : Valeurs du piégeage du radical DPPH[•] exprimées en pourcentage de neutralisation par les contrôles (Trolox et acide ascorbique) en fonction de différents volumes (ml).

| Volume (ml) | 0,005 | 0,01 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | IC ₅₀ (mg/ml) |
|------------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|
| Trolox | -10,38 | -4,45 | 24,03 | 63,20 | 91,69 | 1,05 |
| Acide ascorbique | -9,79 | 3,85 | 79,82 | 92,87 | 92,87 | 0,48 |

NB : Concentration initiale des contrôles (Trolox, Acide ascorbique) égale à 0,01g/l.

A partir de ces valeurs, nous avons pu calculer les concentrations de neutralisation à 50% (IC₅₀) (Tableaux 26,27) pour les huiles essentielles étudiées et les contrôles par une régression linéaire selon la formule suivante :

$$RSC(\%) = a \times [DPPH^{\bullet}] + b$$

Où :

a : représente la pente de la courbe ; **b :** est une constante ; RSC (Free Radical Scavenging Capacity) : représente la capacité du piégeage du radical libre DPPH[•].

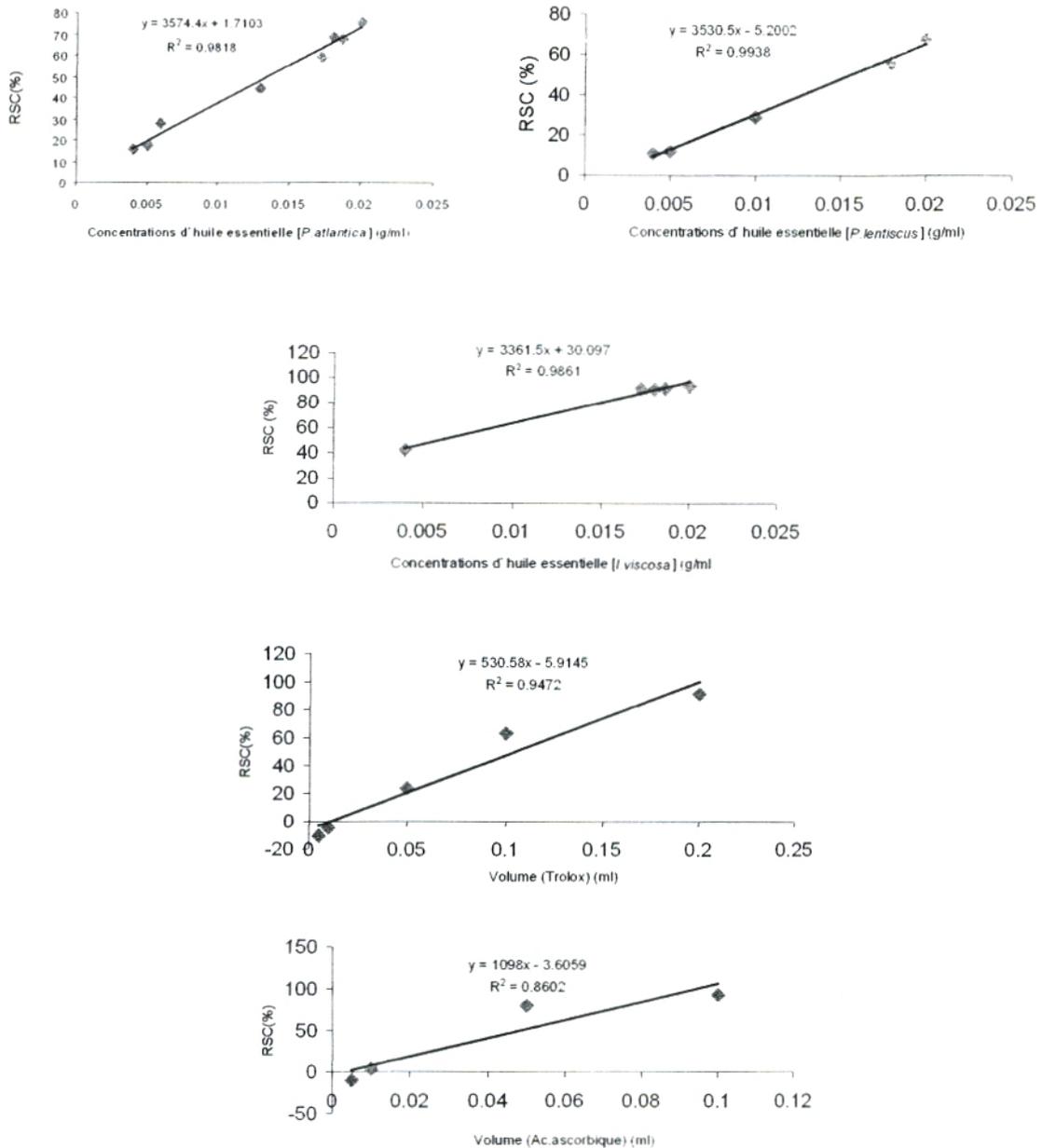


Figure 50 : Détermination de la concentration de neutralisation à 50% par la régression linéaire de RSC en fonction des quantités des huiles essentielles et les contrôles (RSC=f(C)).

En général, toutes les huiles essentielles de nos échantillons sont capables à réduire le radical DPPH[•] de couleur violette à DPPH-H de couleur jaune.

La comparaison entre les valeurs IC₅₀ montre un pouvoir antioxydant plus élevé signalé pour les deux contrôles. Les IC₅₀ sont de l'ordre de 0,48 (R²=0,8602) et 1,05 (R²=0,7492) mg/ml équivalent à l'acide ascorbique et le trolox respectivement.

Si nous considérons uniquement l'effet des huiles essentielles obtenues par l'entraînement à la vapeur, nous constatons que les IC₅₀ d'*I.viscosa* (Station de Sidna Youchaa), *P.lentiscus* (Station de Ain Fezza) et *P.atlantica* (Station de Ain Fezza) sont de 5,92; 13,5 et 15,63 mg/ml respectivement.

Nous pouvons déduire que l'huile essentielle d'*I.viscosa* possède une activité puissante de captage du radical DPPH[•] que celle des deux espèces du genre *Pistacia* (Tableau 26).

L'activité antioxydante à réduire le radical libre DPPH[•] peut être expliquée par la composition chimique des huiles essentielles de ces plantes.

Minica-Dukic et al (2003) ont montré que sur les 3 huiles essentielles des espèces du genre *Mentha* (*M. aquatica*, *M. longifolia* et *M. piperita*), sauf l'huile essentielle de *M. piperita* est parvenue la réduction 50% de la concentration initiale du DPPH[•]. Le IC₅₀ est égale à 2,53 µg/ml dont la gamme des concentrations est de l'ordre de 0,50 et 12 µg/ml.

La comparaison de nos valeurs IC₅₀ avec ce travail révèle un pouvoir antioxydant puissant opté à l'huile essentielle de *M. piperita* par rapport aux huiles essentielles de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa*. Cet effet est du à la présence des composés actifs qui sont les C-3 monoterpènes cétoniques (menthone, isomenthone et pulegone) dans l'huile essentielle de *M.piperita* et probablement le 1,8-cinéole dans l'huile essentielle de *M. aquatica*.

L'analyse CPG/RMN C¹³ des huiles essentielles des espèces du genre *Pistacia* révèle la présence de α-pinène, limonène, D-germacrène, myrcène dans l'huile essentielle de *P.lentiscus* de différentes stations et β-caryophyllène dans l'huile essentielle de *P.atlantica* à des concentrations élevées. Le pouvoir antioxydant de ces plantes peut être du probablement à ces composés majoritaires.

Cependant, les acides sesquiterpéniques constituant l'huile essentielle d'*I.vicosa* peuvent être responsables à cette meilleure activité antioxydante pour réduire le DPPH[•].

La capacité antioxydante de 8 variétés de *Rosmarinus officinalis* est attribuée aux composés phénoliques des huiles essentielles et des extraits bruts (Stefanovits-Bányai et al., 2003).

Chez l'huile essentielle de *Thymus vulgarae*, le thymol et le carvacrol sont capables à réduire le DPPH et surtout à des concentrations élevée (Jukić et Miloš, 2005).

Conclusion générale

Conclusion générale

La connaissance des propriétés bénéfiques des essences est une science ancienne, tandis que les recherches des 10-15 dernières années ont démontré l'importance des composés phénoliques qui ne sont nullement des produits inertes du métabolisme mais ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers (Brzozowska *et al.*, 1973).

En aromathérapie, de récentes études ont pu prouver que les essences possèdent une action antibiotique et exemptent de toutes réactions secondaires sur les fonctions de l'organisme.

En alimentation humaine, les antioxydants d'origine naturels se révèlent préférables, mais, à côté des tocophérols, le marché n'offre à ce jour qu'un faible choix d'antioxydants liposolubles non synthétiques. Pour remédier à cette situation, la recherche de nouveaux antioxydants naturels lipophiles devient une nécessité. La principale source d'antioxydants est le règne végétal, en particulier les plantes supérieures.

Le présent travail portant sur deux axes dont le premier concerne les huiles essentielles. La quantification des huiles essentielles chez les espèces : *Pistacia atlantica* de Ain Fezza, *Inula viscosa* de Sidna Youchaa et *Pistacia lentiscus* de 3 stations, Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet nous a permis de conclure que :

- La plante *Pistacia lentiscus* de Ghazaouet renferme une teneur en huile essentielle élevée (0.0731%) comparativement à celle d'Oum El Alou (0.0187%) durant le mois de novembre obtenue par hydrodistillation.
- Le rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* d'Oum El Alou (0.076%) est supérieur à celle de Ain Fezza (0.055%) pendant la même période du mois de janvier.
- Durant la pleine floraison, le rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* de Ain Fezza atteint 0.157%.
- *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* présentent des rendements faibles en huiles essentielles, 0.020% et 0.0195% respectivement.
- Ces variations du rendement sont étroitement liées aux étages bioclimatiques (l'altitude, longitude, latitude, climat) et la période de la récolte.

L'analyse phytochimique effectuée par le couplage CPC/RMN C¹³ sur les huiles essentielles de *Pistacia atlantica* de Ain Fezza et *Pistacia lentiscus* de 3 stations (Ain Fezza, Oum El Alou et Ghazaouet) a permis de mettre en évidence :

- Pour la plante *Pistacia lentiscus*, 13 et 21 constituants chimiques dans les huiles essentielles des feuilles obtenues par hydrodistillation de Ghazaouet et Oum El Alou respectivement.
- Dans les huiles essentielles par entraînement à la vapeur des stations Ain Fezza et Oum El Alou, nous identifions 15 et 16 constituants chimiques.
- 27 constituants dans l'huile essentielle de *Pistacia atlantica*.

La comparaison entre la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* laisse supposer la présence de 4 chimiotypes pour *P. lentiscus* et un seul chimiotype pour *P. atlantica* :

- Chimiotype à α -pinène pour l'huile essentielle de *P. lentiscus* de Ain Fezza par hydrodistillation ;
- Chimiotype à myrcène pour l'huile essentielle de *P. lentiscus* d'Oum El Alou par hydrodistillation ;
- Chimiotype à limonène pour l'huile essentielle de *P. lentiscus* de Ghazaouet par entraînement à la vapeur.
- Chimiotype à D-gérmacrène pour l'huile essentielle de *P. lentiscus* d'Oum El Alou par entraînement à la vapeur.
- Chimiotype à β -caryophyllène pour l'huile essentielle de *P. atlantica* de Ain Fezza par entraînement à la vapeur.

Parallèlement, les teneurs de la composition chimique des huiles essentielles de *P. lentiscus*, diffèrent suivant les stations.

A la lumière des résultats obtenus, l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *P. lentiscus* (Ain Fezza, Oum El Alou, Ghazaouet), *P. atlantica* (Ain Fezza) et *I. viscosa* (Sidna Youchaa) est active sur les champignons, les levures que sur les bactéries testées.

D'autre part, la nature des composés majoritaires semble probablement liée aux effets apparents sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et que cette activité est corrélée avec leurs quantités pour toutes les souches fongiques et bactériennes à l'exception d'*Escherichia coli* et *Enterobacter cloacea*.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *P. lentiscus*, *P. atlantica* et *I. viscosa* a montré que toutes ces huiles essentielles ont un pouvoir antioxydant exprimé par le piégeage du radical DPPH*. Cette activité est puissante pour l'huile essentielle d'*I. viscosa* dont la concentration de neutralisation est de l'ordre de 5.92mg/ml. Ces résultats indiquent le rôle des huiles essentielles dans la préparation alimentaire et pharmaceutique qui peuvent être exploitées en utilisant les constituants des fractions volatils, aussi l'usage de ces plantes pour prévenir et traiter diverses maladies humaines semble plus utile et raisonnable.

Dans le deuxième axe de flavonoïdes, le rendement en composés phénoliques est élevé chez la plante *P. lentiscus* de l'ordre de 12.64% par rapport aux *P. atlantica* (8.11%) et *Imula viscosa* (10.91%).

De même, le faible rendement de *P. atlantica* est caractérisé par sa richesse en phénols totaux (1.96 mg équivalent en pyrocatechol / g d'extrait sec).

L'analyse structurale par CCM, nous a permis d'identifier deux acides phénoliques qui sont l'acide gallique et l'acide paracoumarique et un flavonol, la myricétine chez les espèces du genre *Pistacia*. 4 composés phénoliques ont été identifiés chez la plante *I. viscosa* qui sont la rutine, myricétine, résorcinol et pyrocatechol.

Cependant, l'activité antimicrobienne des extraits bruts des composés phénoliques est plus active contre les souches *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi*.

En parallèle, les pourcentages d'inhibition obtenus presque pour toutes les souches fongiques sont adoptés à l'extrait brut de *P.lentiscus* avec une allure plus ou moins élevée pour l'extrait d'*I.viscosa*.

L'activité antifongique et antibactérienne des huiles essentielles de nos plantes sont plus actives que leurs extraits bruts des composés phénoliques.

Pour la démarche de l'activité antioxydante, nous a permis de mettre en évidence :

- Un pouvoir efficace et compatible à l'acide ascorbique de réduction de fer présenté par l'extrait brut de *P.lentiscus* à 750µg.
- Un pourcentage élevé de piégeage des radicaux superoxydes par l'extrait brut de *P.atlantica* de l'ordre de 19.3%.
- Les espèces du genre *Pistacia* présentent des pourcentages d'inhibition élevés du radical libre DPPH* (95.69%) et des concentrations EC₅₀ faibles comparativement à celle d'*I.viscosa*. Cette baisse valeur signifie une activité antioxydante puissante.
- L'efficacité antiradicalaire de l'extrait brut de *P.lentiscus* est élevée, de l'ordre de 0.328×10^{-3} par rapport à celle d'*I.viscosa* (0.1153×10^{-3}) et *P.atlantica* (0.1387×10^{-3}).
- Le piégeage du radical DPPH* par des composés phénoliques en utilisant CCM révèle que l'activité antioxydante des espèces du genre *Pistacia* est due probablement au acide gallique et ces dérivés.

Pour une éventuelle application pharmacologique, il serait souhaitable de compléter et d'approfondir cette étude :

- ✂ De tester l'effet des huiles essentielles et des flavonoïdes sur des microorganismes les plus pathogènes pour l'homme ou l'agriculture et faire des essais in vivo.
- ✂ En utilisant in vivo les huiles essentielles de ces plantes dans des régimes alimentaires destinés aux rats et voir les performances métaboliques.
- ✂ En s'intéressant à identifier les substances responsables de l'activité antioxydante.
- ✂ Et de faire une administration des extraits bruts des composés phénoliques in vitro et in vivo pour suivre les transformations de réduction de fer.

Dans le cadre de recherches sur les antioxydants naturels, l'autoxydation est l'un des principaux phénomènes de dégradation des lipides. La découverte des antioxydants a permis d'augmenter la durée de vie d'un grand nombre de produits alimentaires en particulier les corps gras. Pour cela, l'exploitation industrielle des extraits bruts de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* s'avère prometteuse.

Références bibliographiques

A

- Abu Zarga, M.H.; Hamed, E.M.; Sabri, S.S.; Voelter, W.; Zeller, K.P. New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Imula viscosa*. *J.Nat.Prod.* 61:798-800, 1998.
- Abu Zarga, M.H.; Sabri, S.S.; Hamed, E.M.; Khanfar, M.A.; Zeller, K.P.; Atta-Ur-Rahman. A new eudesmane type sesquiterpene from *Imula viscosa*. *Natural Product Research*, Vol. 17, No. 2, pp. 99-102, 2002.
- Al-Dissi, N.M.; Salhab, A.S.; Al-Hajj, H.A. Effect of *Imula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 77:117-121. 2001.
- Ali-Shtayeh, M.S ; Abu Ghdeib, S. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42, 665-672. 1999.
- Amié, D.; Davidovié-Amié, D.; Beslo, D.; Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica ACTA CCACAA*, 76 (1): 55-61. 2003.
- Anton, R et Wichtel, M. Plantes thérapeutiques: traditions, pratiques officinales, science et thérapeutique. 3^{ème} édition, Ed. Françaises. Strasbourg. 1999.
- Atik Bekkara F. Etude des signaux chimiques impliqués dans la symbiose entre *Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum*. *Thèse de doctorat*. 1999.
- Atli, H. S. ; Arpaci, S. ; Ayanoglu, H. Comparaison of seedling characteristics of some *Pistacia* species. In AK B.E (ed). 11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, p. 215-218. 2001.

B

- Bahorun, T. Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*. pp: 83-94. 1997.
- Baratto, M.C. ; Tattini, M. ; Galardi, C. ; Pinelli, P. ; Romani, A. ; Visioli, F. ; Basosi, R. ; Pogni, R. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P.lentiscus* leaves. *Free Radical Research*, 37(4), pp.405-412. 2003.
- Barrero, A.F ; Herrador, M.M ; Arteaga, J.F ; Akssira, M, et al. Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. *Journal of essential oil Research (JEOR)*. 2005.
- Bartošikova, L.; Necas, J.; Suchy, V.; Kubinova, R.; Vesela, D.; Benes, L.; Illek, J.; Salplachta, J.; Florian, T.; Frydrych, M.; Klusakova, J.; Bartosik, T.; Frana, L.; Dzurova, J. Antioxidative effects of morine in Ischemia-reperfusion of kidneys in the laboratory rat. *ACTA VET. BRNO*, 72: 87-94, 2003.
- Bekkara, F.; Jay, M. ; Viricel, M.R et al. 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 exudations [J]. *Plant and Soil*, 203: 27-36. 1998.
- Belaiche, P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. TOME I, Ed. Maloine, Paris. 1979.
- Belhadj S. Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. 11^{ème} Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, p. 107-109, 2001.
- Benayache, S. ; Benayach, F.; Dendougui, H.; Jay, M. Les flavonoides d'*Imula viscosa* L. Plantes médicinales et phytothérapie. Tome xxv, n°4, p.170-176, 1991.
- Benmansour, A. Etude et valorisation de l'armoise blanche de l'ouest algérien et des noyaux de deux variétés de dattes algériennes. *Thèse de doctorat en Chimie*, 1999.
- Blazovics, A. ; Lugasi, A. ; Szentmihalyi, K. ; Kéry, A. Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis*, volume 47(1-4):99-102, 2003.

- Boelens, M.H; Jimenez, R. Chemical composition of the essential oil from the gum and from various parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic gum tree). *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 6, 271-275. 1991.
- Bonsignore, L; Cottiglia, F; Loy, G. Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* aerial parts. *Fitoterapia*. Volume LXIX, No 6, 1998.
- Bors, W.; Heller, H.; Christa, M.; Saran, Manfred. Flavonoids as antioxydants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*. Vol.186, 1990.
- Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330, 1173-1178, 1998.
- Bruneton, J. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. *Ed. Lavoisier*. Techniques et documents, Paris. 1987.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition. Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier .1993.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition. Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, 1120p. 1999.
- Brzozowska, J.; Hanower P.; Tanguy, J. Polyphénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, vol 12, p.2353-2357, 1973.

C

- Cafarchia, C. ; De Laurentis, N. ; Milillo, M.A. ; Losacco, V. ; Puccini, V. Ricerche sull'attività fungistatica di fiori e foglie di *Imula viscosa* (Asteraceae). *Parassitologia* 41: 579-582. 1999.
- Cafarchia, C. ; De Laurentis, N. ; Milillo, M.A. ; Losacco, V. ; Puccini, V. Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Imula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*.44 : 153-156, 2002.
- Carré, P. Précis de technologie et de chimie industrielle. *Ed. Ballière J.B. et fils*, T3, 1953.
- Castola, V ; Bighelli, A ; Casanova, J. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 79-88. 2000.
- Costa, M. ; Nogueira, J.M.F. ; Miguel, M.G. ; Romano, A. In vitro mass clonal propagation of *Ditrichia viscosa* subsp. *revoluta* and analysis of its secondary metabolites. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78(3):310-314. 2003.
- Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol.12, No.4, p.564-582, 1999.

D

- Danilewicz, J.C. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 54:2. 2003.
- Delazar, A. ; Reid, R.G. ; Sarker, S.D. GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol.40, No.1, 2004.
- De Pooter, H.L; Schamp, N.M; Aboutabl, E.A; El Tohamy, S.F; Doss, S.L. Essential oils from the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 6, 229-232. 1991.
- DE Whalley, C.V. Rankin, S.M.; Hoult, R.S.; Jessup, W.; Leake, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochemical Pharmacology*, Vol.39, No.11, pp.1743-1750, 1990.

- Duru, M.E.; Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Harmandar, M.; Izumi, S.; Hirata, T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74: 170-176. 2003.

E

- Ekanayake, P.; Lee, Y.D.; Lee, J. Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (Hag Fish) and *Enedrias nebulosus* (White spotted Eel). *Food Sci Tech Int.* 10(3):0171-7. 2004.

F

- Fouché, J.G.; Marquet, A.; Hambuckers, A. Les plantes médicinales : de la plante au médicament. *Observations du monde des plantes.* 2001.
- Furuno, K.; Akasako, T.; Sugihara, N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 25(1) :19-23, 2002.
- Furusawa, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Nishikawa, A.; Yamazaki, N.; Nakaya, K.N.; Matsuura, M.; Tsuchiya, H.; Nagayama, M.; Inuma, M. Antioxidant activity of hydroxyflavonoids. *J.Health.Sci.* 51(3):376-378, 2005.

G

- Gerhard, R. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. *Edition française.* Presses polytechnique et universitaires romandes. 1993.
- Gulçin, I.; Uguz, M.T.; Oktay, M.; Beydemir, S.; Kufrevioglu, O.I. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric For*, 28: 25-33. 2004.

H

- Hadafi, A.; Ismaili Alaoui, M.; Chaouch, A.; Zrira, S.; Benjilli, B. Activité antioxydante des extraits du romarin (*Rosmarinus officinalis* L) et du myrte (*Myrtus comminus*). 2 : Effet du solvant d'extraction. *17eme Journées Internationnelles Huiles Essentielles Digne Les Bains.* 1998.
- Haide, Z.; Mei, C.; Lin, M.; Lianquan, G. The inhibition on pyrogallol autoxidation of diterpenoid tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Pharmacology and clinics of Chinese material medica*, Vol.20 No.4 P. 16-19. 2004.
- Hamdan, I.I.; Afifi, F.U. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 93:117-121. 2004.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990. 1999.
- Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 845-850, 1993.
- Heimeur, N.; Idrissi Hassani, L.M.; Amine Serghini, M. Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology.* Vol.3, No1, p.37-42, 2004.
- Henry, I. A.; Dorcas, S.; Woodrow, E.; Farshad, M. A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*, Vol. 21, 465-476. 1989.
- Hernández, N.E.; Tereschuk, M.L.; Abdala, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 317-322. 2000.

I

- Iauk, L.; Ragusa, S.; Rapisarda, A.; Franco, S.; Nicolosi, V.M. In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts : Preliminary report. *Journal of Chemotherapy*, Vol.8, n.3, p.207-209, 1996.

J

- Jacob, M.; Pellecuer, J.; Tomei, R. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana EPPOS*, p 11-26-30. 1979.
- Javanmardi, J.; Stushnoff, C.; Locke, E.; Vivanco, J.M. Antioxydant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83, 547-550. 2003.
- Jiao, Z.; Liu, J.; Wang, S. Antioxydant activities of total pigment extract from Blackberries. *Food Technol. Biotechnol.* 43(1): 97-102, 2005.
- Jiménez-Escrig, A.; Jiménez-Jiménez, I.; Pulido, R.; Saura-Calixto, F. Antioxydant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:530-534. 2001.
- Jourdes, M.M. Réactivité, synthèse, couleur et activité biologique d'ellagitannins c-glycosidiques et flavano-ellagitannins. *Thèse de doctorat*. N° d'ordre : 2721. 2003
- Jukié, M.; Miloš, M. Catalytic oxidation and antioxydant properties of Thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L). *Croatica Chemica ACTA CCACAA*, 78 (1):105-110. 2005.

K

- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.L.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. Antioxydant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric Chem*, 47:3954-3962. 1999.
- Karadeniz, F.; Burdurlu, S.H.; Koca, Nuray; Soyer, Y. Antioxydant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For*, 29: 297-303. 2005.
- Kawashty, S.A.; Mosharafa, S.A.M.; El-Gibali, M.; Saleh, N.A.M. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematic and Ecology* 28: 915-917. 2000.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Zengin, H.; Duru, M.E. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167. 2003.

L

- Lahlou, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research. Phytother. Res.* 18, 435-448. 2004.
- Lahouel, M.; Boulkour, S.; Segueni, N.; Fillastre, J.P. Protective effect of flavonoides against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid-peroxydation and increase of liver glutathion. *Haema*, 7(1): 59-67; 2004.
- Lahouel, M.; Fillastre, J.P. Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema*, 7(3): 313-320; 2004.
- Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Carde, J.-P. Biogenèse des monoterpènes. II - La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1994, 133, 79 - 99
- Lee, K.W.; Everts, H.; Beynen, A.C. Essential oils in Broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science*, 3(12):738-72, 2004.

M

- Magiatis, P.; Melliou, E.; Skaltsounid, A.L.; Chinou, I.B.; Mitaku, S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Plant Med*, 65. 1999.

- Makris, D.P. ; Kefalas, P. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol. Biotechnol*, 42(2):105-108. 2004.
- Maoz, M ; Neeman, I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71:479-482. 2000.
- Marfak, A. Radiolyse gamma des flavonoides : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. *Thèse de doctorat*, soutenue devant l'université de Limoges. Faculté de Pharmacie. 2003.
- Markham, K.R. Techniques of flavonoid identification. *Biological Techniques Series*, 1982.
- Medic-Šarić, M.; Jasprica, I.; Smolčić-Bubalo, A.; Mornar, A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica Chemica ACTA, CCACAA.77(1-2):361-366, 2004.*
- Mimica-Dukić, N. ;Božin, B.; Soković, M.; Mihajlović, B.; Matavulj, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med*, 69: 413-419. 2003.
- Mompon, B.; Lemaire, B.; Mengal, P. ; Surbled, M. Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. *Ed. INRA*, Paris1998 (Les Colloques, n° 87), Bordeaux (France), Polyphénols, July 15-18, 1996.

O

- Oke, J.M.; Hamburger, M.O. Screening of some nigerian medicinal plant for antioxidant activity using 2,2, Diphenyl-picryl-hydrazyl radical. *African Journal of Biomedical Research*. Vol 5:77-79. 2002.
- Öksüz, S. Flavonoidal compounds of *Inula viscosa* part II. *Planta medica*, Vol, 31;270-273. 1977.
- Onay, A. Somatic embryogenesis from mature seed cultures of *Pistacia atlantica*. *Turk. J. Agric For*, 24: 465-473. 2000.

Q

- Qian, H.; Nihornbere, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 5(6):676-683. 2004.
- Qian, J.Y.; Liu, D.; Huang, A.G. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. *Food Chemistry*, 87:283-288, 2004.
- Quezel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Editions du Centre National de la recherche scientifique*. Tome II , 1963.

R

- Rajeshwar, Y.; Senthil Kumar, G.P.; Gupta, M.; Mazumder, U.K. Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *European Bulletin of Drug Research*. Vol 13, N°1, 2005.
- Remesy, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F. Interest of polyphenols in preventive nutrition. Polyphenols 96, *Ed. INRA*, Paris (Les colloques, n°87), 1998.
- Romani, A ; Pinelli, P ; Galardi, C ; Mulinacci, N ; Tattini, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical analysis*, 13 : 79-86. 2002.

S

- Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A. ; Saura-Calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J.Sci Food Agric*. 76: 270-276, 1998.
- Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A. ; Saura-Calixto, F. Free radical scavenging capacity of selectes red, rosé and white wines. *J Sci Food Agric*, 79:1301-1304. 1999.

- Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A. ; Saura-Calixto, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32: 407-412, 1999.
- Sanchez-Moreno, C. Review : Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int.*8(3):121-137, 2002.
- Schinella, G.R. ; Tournier, H.A, Prieto, J.M, Mordujovich de Buschiazzo, P.; Rios, J.L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, 70 :1023-1033. 2002.
- Spiteri, S. The pharmacognosy of the local plant *Inula viscosa*. *Séminaire*, 1998.
- Stefanovits-Bányai, E.; Tulok, M.H.; Hegedus, A.; Renner, C.; Varga, I.S. Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*. Volume, 47(1-4) :111-113. 2003.
- Stern, L.J et al. A new assay for quantifying brown algal phlorotannins and comparisons to previous methods. *Journal of Chemical Ecology*, 22, (7), 1273-1293, 1996.
- Suba, V. ; Murugesan, T. ; Bhaskara Rao, R. ; Lopamudra Ghosh, Pal, M.; Mandal, S.C.; Saha, B.P. Antidiabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Fitoterapia*, 75:1-4. 2004.
- Sun, T.; Jia, Z.S.; Chen, W.X.; Jin, Y.X.; De Xu, Z. Active oxygen radical scavenging ability of Water-Soluble β -Alanine C₆₀ adducts. *Chinese Chemical Letters* Vol.12, No.11, pp 997-1000. 2001.
- Svoboda, K.P.; Hampson, J.B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW. 1999.*

T

- Tassou, C.C; Nychas, G.J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 411-420. 1995.

V

- Venskutonis, P. R.; Beek, T.A. van; Pukalskas, A; Miliuskas, G; Dapkevicius, A. Radical scavengers from some plants grown in Lithuania. *International conference on Biodiversity and natural products: chemistry and medical applications*: 26-31 January 2004, New Delhi (India) p. -401. 2004.
- Villar, A. ; Sanz, M.J. ; Paya, M. Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *Int. J. Crude Drug Res.*,25, No.1, pp.1-3. 1987.

W

- Wang, S.Y.; Chen, P.F.; Chang, S.T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96: 813-818. 2005.
- Wallach, J.; Schwartz-Cavrilovic, C.; Maginot, M.J.; Cavrilovic, M. Manipulations d'analyse biochimique. 3^{ème} Edition, Doin, pages: 224-228-353-354. 1996.

Y

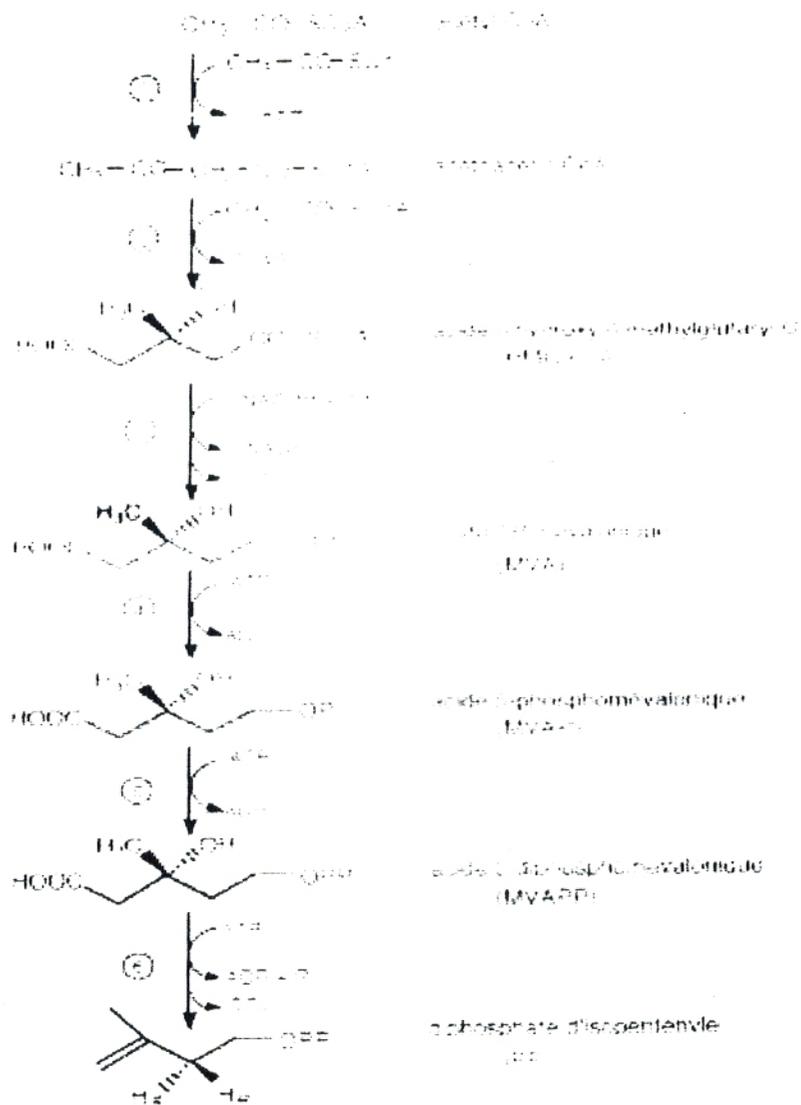
- Yildirim, A. ; Oktay, M. ; Bilaloglu, V. The antioxidants activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk J Med Sci*, 31: 23-27. 2001.

Z

- Zhu, Q.Y.; Hackman, R.M.; Ensunsa, J.L. Antioxidative activities of Oolong tea. *J. Agric.Food Chem*, 50: 6929-6934. 2002.

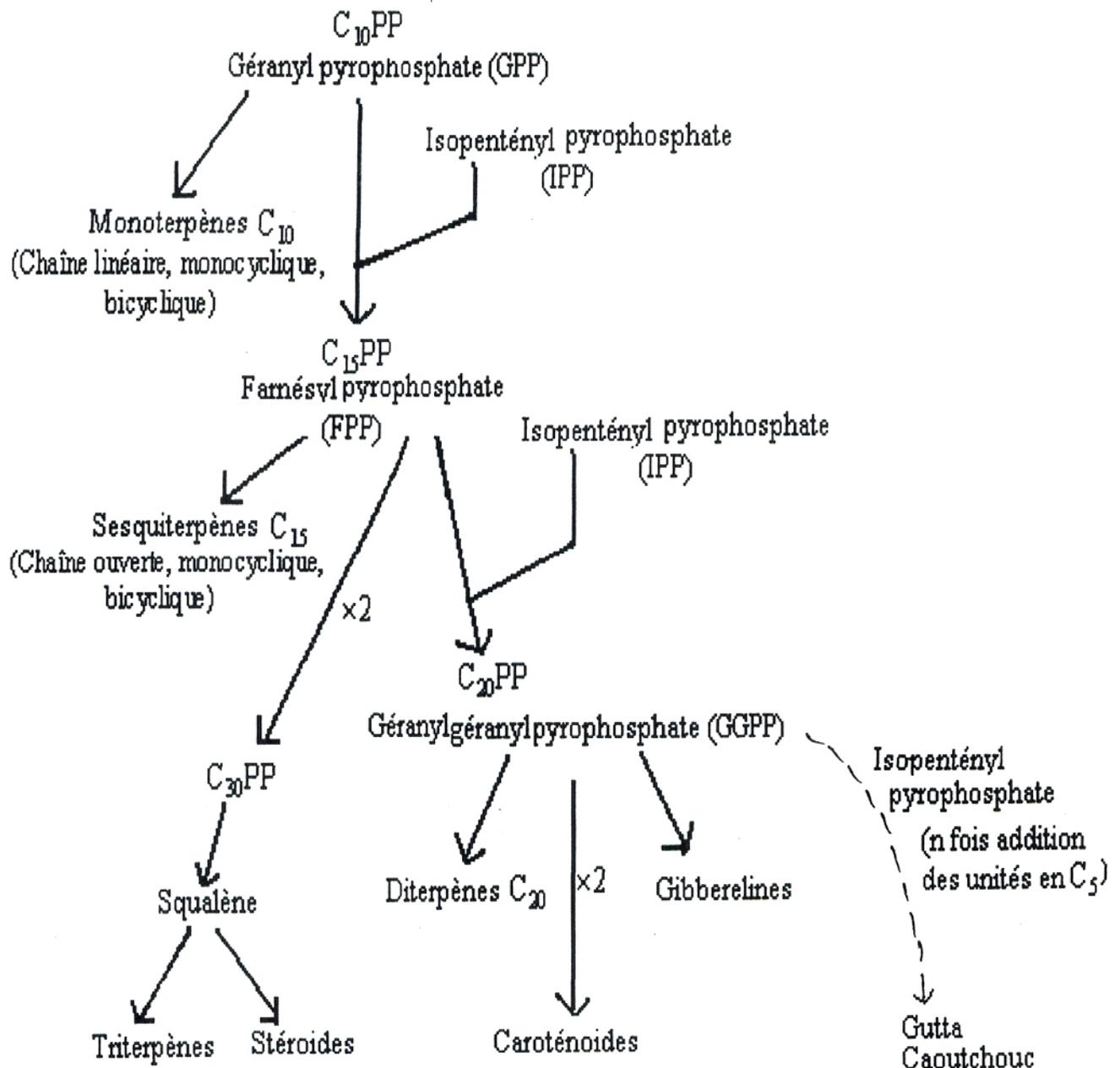
Annexes

Annexe 1 : Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle à partir de l'acétyl CoA (LAMARTI *et al.*, 1994).

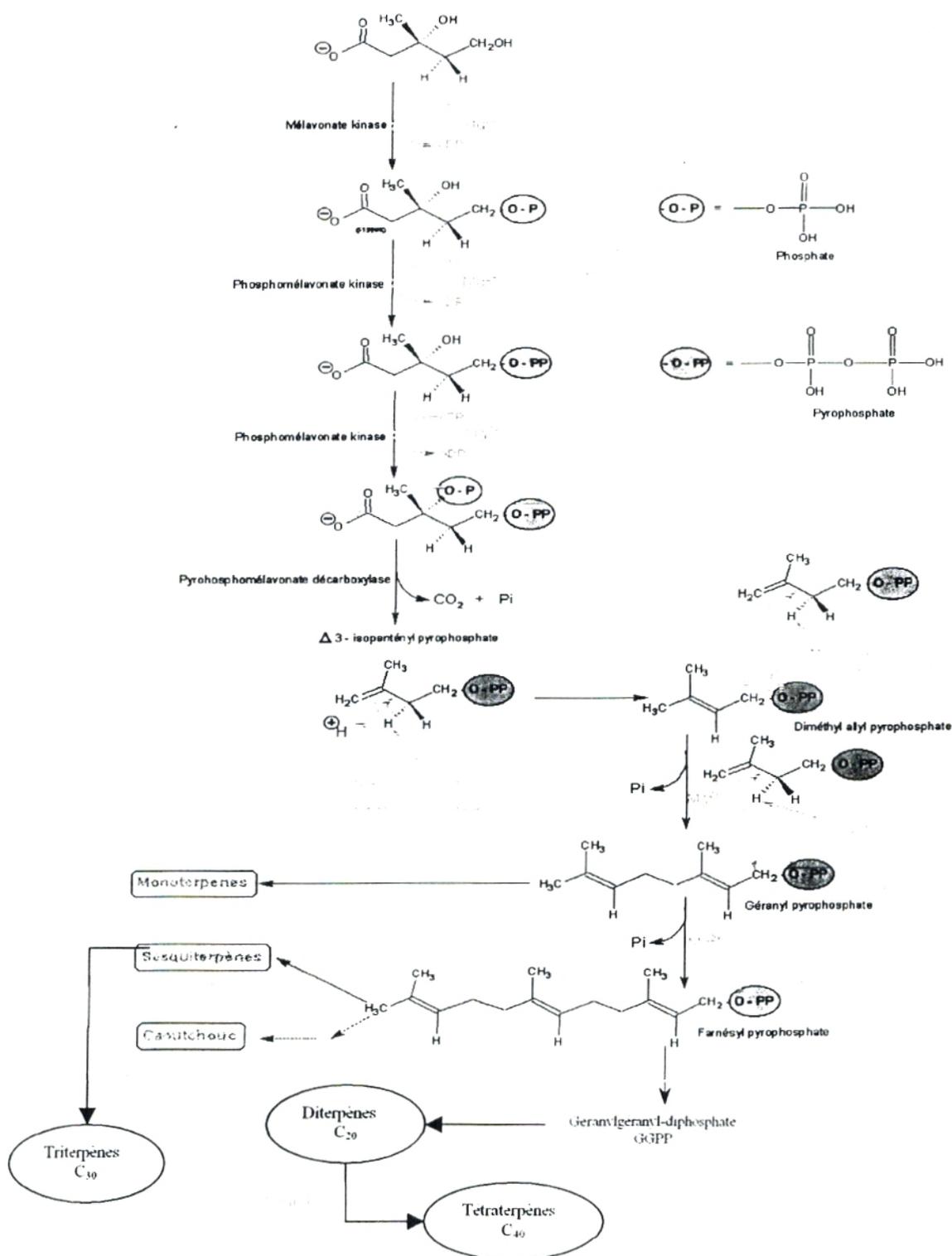


- 1 : acétoacétyl CoA thiolase 4 : mévalonate kinase
 2 : HMG CoA synthétase 5 : mévalonate 5-phosphate kinase
 3 : HMG CoA réductase 6 : mévalonate 5-diphosphate
 décarboxylase

Annexe 2 : Biosynthèse des terpènes (Bruneton, 1999).



Annexe 3 : Origine des terpènes : formation des précurseurs de chaque classe (Bruneton, 1999)



Annexe 4 : Rendements en huiles essentielles obtenus par hydrodistillation des stations Oum El Alou et Ghazaouet .

| Matériel végétal | Stations | Période | Altitude (m) | Rendement (%) |
|--------------------|-------------|----------|--------------|---------------|
| <i>P.lentiscus</i> | Oum EL Alou | Novembre | 800 | 0,01±0,004 |
| | Ghazaouet | Novembre | 80 | 0,07±0,003 |

Annexe 5 : Rendements en huiles essentielles obtenus par entraînement à la vapeur d'eau des différentes stations.

| Matériel végétal | Stations | Période | Altitude (m) | Rendement (%) |
|---------------------------|---------------|----------|--------------|---------------|
| <i>Pistacia lentiscus</i> | Ain Fezza | janvier | 730 | 0,05 |
| | | mai | | 0,05 |
| | Oum EL Alou | Janvier | 800 | 0,07 |
| <i>Imula viscosa</i> | Sidna Youchaa | Novembre | 40 | 0,01 |
| <i>Pistacia atlantica</i> | Ain Fezza | Avril | 730 | 0,07 |
| | | mai | | 0,07 |
| | | Novembre | | 0,02 |

Annexe 6: Composition des milieux de culture

Milieu PDA (Potatos Dextrose Agar)

| | |
|--|--------|
| Pomme de terre (macération 500ml de filtrat) | 200g |
| Sucrose | 10g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée | 1000ml |

Bouillon nutritif

| | |
|--|--------|
| Macération de viande (ou eau distillée + extrait de viande q.s) | 1000ml |
| Peptone tryptique | 15g |
| NaCl ou KCl | 5g |

Milieu de Mueller-Hinton

| | |
|----------------------------|--------|
| Infusion de viande de bœuf | 300g |
| Hydrolysate de caséine | 17.5g |
| Amidon | 1.5g |
| Gélose | 17g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH final 7.4

Milieu de Chapman

| | |
|--------------------|--------|
| Peptone | 11g |
| Extrait de viande | 1g |
| Chlorure de sodium | 75g |
| Mannitol | 10g |
| Agar | 15g |
| Rouge de phénol | 0.025g |
| Eau distillée | 1000ml |

Milieu de MacConkey

| | |
|---------------------------|--------|
| Peptone de caséine | 17g |
| Peptone de viande | 3g |
| Lactose | 10g |
| Mélange de sels biliaires | 1.5g |
| Chlorure de sodium | 5g |
| Rouge neutre | 0.03g |
| Cristal violet | 0.001g |
| Agar agar | 13.5g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH final 7.1

Milieux de Sabouraud

| | |
|-----------------------|----------|
| Glucose massé | 20g |
| Peptone de Chapoteaut | 10g |
| Gélose | 20g |
| Eau distillé qsp | un litre |

Annexe 7 : Valeurs de piégeage le radical DPPH^{*} exprimées en densités optique (DO) par les huiles essentielles de *P.atlantica*, *P.lentiscus* et *I.viscosa* en fonction des concentrations (g/ml).

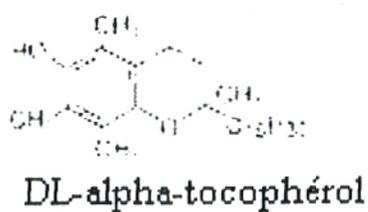
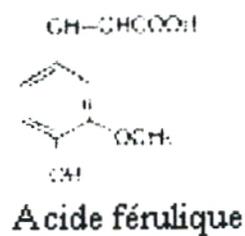
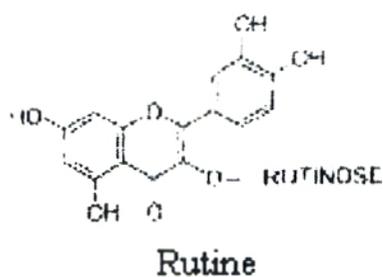
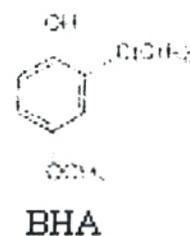
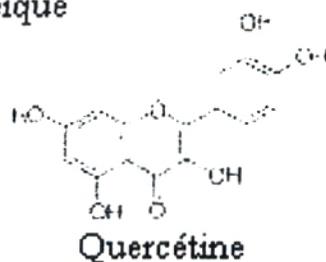
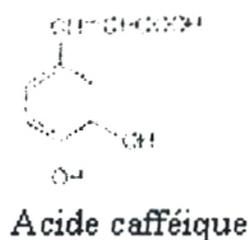
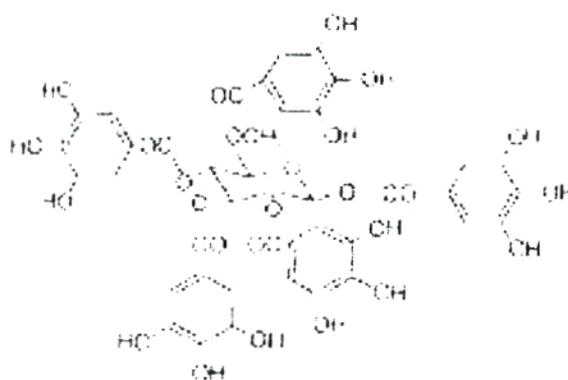
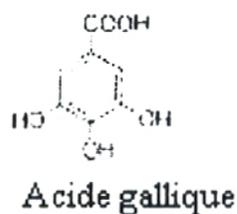
| [HE] (g/ml)(Ent) | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.01 | 0.013 | 0.0172 | 0.018 | 0.0186 | 0.02 | 0.04 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| DO (<i>I. viscosa</i>) Sidi Ouchaa | 0.1125 ± 0.0134 | 0.047 ± 0.0155 | 0.045 ± 0.0396 | 0.0325 ± 0.0049 | 0.008 ± 0.0028 | 0.016 ± 0.0014 | 0.017 ± 0.0014 | 0.016 ± 0.0014 | 0.0115 ± 0.0007 | 0.0155 ± 0.0021 |
| DO(<i>P.lentiscus</i>) Ain Fezza | 0.1755 ± 0.0247 | 0.1735 ± 0.0148 | 0.188 ± 0.0014 | 0.1397 ± 0.0085 | 0.1455 ± 0.0106 | 0.072 ± 0.0579 | 0.0865 ± 0.0035 | 0.0405 ± 0.0120 | 0.063 ± 0.0325 | 0.002 ± 0.00 |
| DO(<i>P.atlantica</i>) Ain Fezza | 0.1395 ± 0.0049 | 0.162 ± 0.0141 | 0.1415 ± 0.0049 | 0.1655 ± 0.0021 | 0.1095 ± 0.0162 | 0.08 ± 0.0042 | 0.061 ± 0.0070 | 0.0635 ± 0.0049 | 0.047 ± 0.0028 | 0.0145 ± 0.0025 |

NB : Ent représente l'extraction par entraînement à la vapeur.

Annexe 8 : Valeurs de piégeage le radical DPPH^{*} exprimées en densités optique (DO) par les contrôles (Trolox et Acide ascorbique) en fonction de différents volumes (ml).

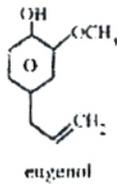
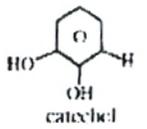
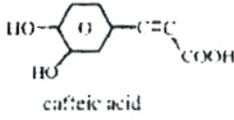
| Volume (ml) | 0.005 | 0.01 | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Trolox | 0.186 | 0.176 | 0.128 | 0.062 | 0.014 |
| Acide ascorbique | 0.183 | 0.162 | 0.034 | 0.012 | 0.012 |

Annexe 9: Structures de quelques antioxydants (Sanchez-Moreno et al., 1999).

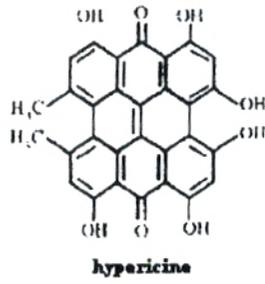


Annexe 10 : Structures des produits chimiques antimicrobiens de la plante (Cowan, 1999).

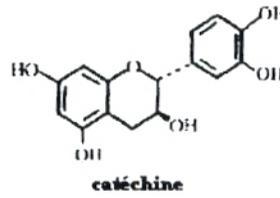
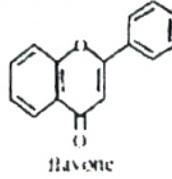
Phénols simples et Acides phénoliques



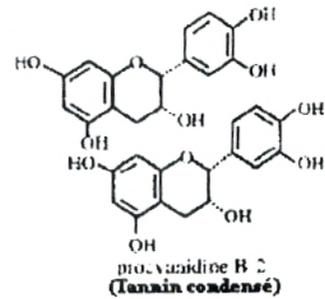
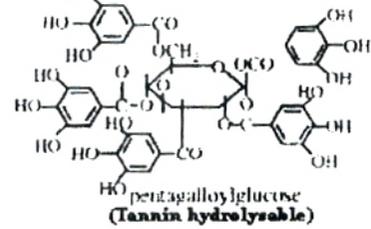
Quinones



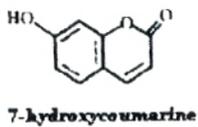
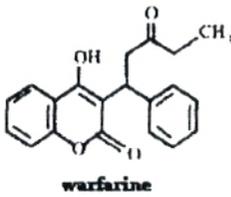
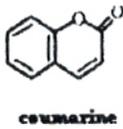
Flavones et flavonoïdes



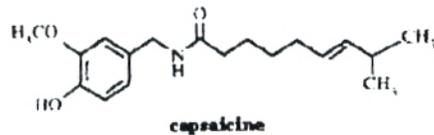
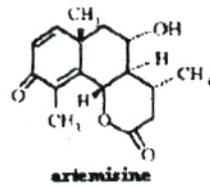
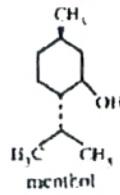
Tannins



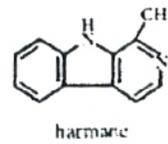
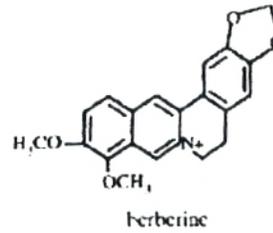
Coumarines



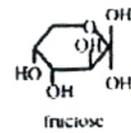
Terpénoïdes



Alcaloïdes



Sucres



RESUME

Dans le cadre de recherches sur les antibiotiques et les antioxydants naturels, il s'est révélé nécessaire de valoriser certains composés de métabolites secondaires chez les plantes médicinales.

Pour cela, la présente étude porte sur l'évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des flavonoïdes de trois plantes, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Imula viscosa*, utilisées par une grande popularité en Algérie pour ses propriétés thérapeutiques.

L'extraction par hydrodistillation des feuilles de *Pistacia lentiscus* des deux stations (Oum El Alou et Ghazaouet) nous donne une teneur en huile essentielle ayant un rendement élevé de 0,0731% (station de Ghazaouet) par rapport à celle d'Oum El Alou qui est de l'ordre de 0,0187%. Tandis que l'entraînement à la vapeur d'eau, nous a révélé que la teneur en huile essentielle d'Oum El Alou est plus ou moins supérieure à celle de Ain Fezza, nous obtenons respectivement 0,076% et 0,055%.

L'analyse par CPG/RMN C^{13} des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, nous a séparé 15 composés dans la station de Ain Fezza et 16 composés dans la station d'Oum El Alou. La même analyse des huiles essentielles extraites par hydrodistillation, nous a permis de mettre en évidence 13 et 21 composés dans les deux stations de Ghazaouet et Oum El Alou respectivement. Nous obtenons ainsi 4 chimiotypes qui sont : α -pinène (41%), myrcène (33%), limonène (25,5%) et D-germacrène (13,1%).

En ce qui concerne *Pistacia atlantica*, la teneur en huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau est faible de l'ordre de 0,020%, nous avons identifié 27 composés dont le chimiotype est le β -caryophyllène (12,1%).

Pour *Imula viscosa*, le rendement est aussi faible, il est de l'ordre de 0,0195%.

La teneur en composés phénoliques est élevée chez la plante *Pistacia lentiscus* et est de l'ordre de 12,54% par rapport à *Pistacia atlantica* (8,11%) et à *Imula viscosa* (10,91%).

L'identification des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince nous a révélé deux acides phénoliques qui sont : l'acide gallique et l'acide p-coumarique dans les feuilles des espèces du genre *Pistacia*. Un flavonoïde qui est le myricétine, reste présent dans les feuilles du *Pistacia lentiscus* et absent dans les feuilles de *Pistacia atlantica*. D'autres flavonoïdes comme la rutine, myricétine, résorcinol et pyrocatechol sont mis en évidence dans les feuilles d'*Imula viscosa*.

Les activités biologiques (antifongique et antibactérienne) des huiles essentielles des trois plantes étudiées sont plus actives que celles des extraits bruts des composés phénoliques.

Les huiles essentielles de nos plantes présentent une activité considérable du piégeage du radical DPPH $^{\bullet}$. Alors que les extraits bruts des composés phénoliques possèdent un pouvoir de réduction de fer élevé, un piégeage des radicaux superoxydes plus ou moins faible et une forte inhibition du radical DPPH $^{\bullet}$.

Mots clés : *Pistacia lentiscus* ; *Pistacia atlantica* ; *Imula viscosa* ; Huiles essentielles ; Chromatographie en phase gazeuse (CPG) ; Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN C^{13}) ; Composés phénoliques ; Flavonoïdes ; Activité antimicrobienne ; Activité antioxydante.