

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier nos familles, nos amis et toute personne qui nous ont apporté soutiens, amours, confiance.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Mme AYATI et à notre Co-promotrice Mme TOUZOUIR pour nous avoir fait confiance et pour nous avoir encouragées tout au long de ce projet.

Nos profondes gratitudes vont également au Pr H. CHADER et au Dr H. BENOUTTAS du département pharmacotoxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutique (LNCP) pour leur accueil chaleureux, leur confiance, leur générosité et qui ont toujours été à notre disposition et qui nous ont aidées de manière très cordiale

Nous désirons aussi remercier Mme BOUABDALLAH coordinatrice des laboratoires de chimie qui venait tous les jours avant son heure de travail rien que pour nous faire gagner du temps dans nos manipulations ainsi que Mr FETMOUCHE responsable du magasin des produits chimiques (UMMTO).

Nos plus grands remerciements vont également aux es ingénieures de Laboratoire de chimie organique (Mr A. KHECHIDI, Mme S. BOUHRAOUA, Mme C. KACI ainsi que ceux du laboratoire de chimie pharmaceutique (Mme D. KOULOUGLI et Mlle T. BELAZIZ) qui nous ont fourni les outils nécessaires, mais aussi leur aide, leurs conseils et leur investissement moral à la réussite de ce mémoire

Nous remercions également tous les membres du jury : Pr D. MEZIANE et M. KORD d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail, et aussi Pr H. CHADER d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions sincèrement le Pr N. DAHMANI de l'USTHB de nous avoir accueilli et fourni l'effort de répondre présente à chacun de nos S.O.S

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celle qui de loin ou de près, ont permis par leurs conseils et leur aide pour la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements pour tous nos enseignants pour leur qualité d'enseignement

Dédicaces

A la mémoire de mo, défunt oncle, qui nous a laissé un vide immesurable dans nos cœurs et dans nos vies. J'aurais souhaité ardemment que tu assistes à cette réussite. Que dieu t'accueille dans son vaste paradis. Repose en paix tonton.

La famille, bien plis qu'on simple mot mais tout en empire que le bon Dieu tout puissant nous a fait don. Je leur dédie mon travail qui est résultat de leur soutien et de leur présence physique et moral.

Jeddi, mama Taous, maman, Papa, Kahina, Yazid, Toutou...personnes qui m'ont vu réussir et échouer puis me relever en toute circonstance. Je tiens absolument à exprimer la chance que j'ai d'avoir grandi avec vous, et avoir eu depuis l'enfance, une vie bien plus qu'ordinaire, comme quoi on n'a pas le temps de s'ennuyer avec vous.

A tous mes amis et ceci sans exception, ils ont été une force et une inspiration pour moi.

Chacun d'eux m'a façonnée en m'apprenant plus chaque jour, les valeurs de la vie.

A mes besties LES HAWATHIL, un groupe de folie, d'amusement mais paradoxalement un groupe de sérieux et de sagesse. Elles ont été là le jour en jouant à cette terrasse de notre faculté, mais aussi de nuit en s'écrivant des messages sans aucun intérêt mais qui me font faire attraper des fou-ries à en avoir mal au ventre.

J'en ai surement oublié d'autres, mais ma gratitude et mes remerciements n'ont pas de limites, ils sont envoyés à toutes ces personnes, qui m'auraient donné ne serait-ce qu'un sourire dans ma vie.

Ce travail leur est tous dédié... mais sur tout à Dieu, lui qui a choisi ma famille pour moi, lui qui a fait en sorte que je choisisse les bonnes personnes pour moi, mais aussi de m'avoir mise sur la route de certains mais qui ont fini par changer de direction.

Dabi

Dédicaces

Le chemin de la réussite n'a jamais été chose facile, et seule, je n'aurai jamais abouti à une fin qui me comble tellement. C'est pour cela que j'exprime ma plus profonde et sincère gratitude au bon Dieu, qui lui m'a toujours facilité la tâche et m'a fait don de bonne santé, et surtout don de courage et de force intérieure me permettant de traverser tout obstacle, et je ne lui serai jamais assez reconnaissante. Des mots écrits noir sur blanc ne peuvent l'exprimer à la même intensité de mon ressenti.

A mon papoune et ma maman, qui ont fait de moi la femme que je suis aujourd'hui, chacun d'eux m'a encouragée et soutenue à sa manière, mais m'ont apporté un amour infini et indéfini. Je me sens sacrément chanceuse de les avoir car ils m'ont appris une base de la vie qui est : assumer la personne qu'on est et qu'on choisit d'être. Je les aime à mourir.

A Nanou, Dida, Nissou... des frères et sœurs de sang mais aussi amis. Ils ont complété en moi chaque vide, et partagé avec moi bonheur et peine.

A mes magnifiques petits neveux La cicine et bébé panda, qui ont rajouté beaucoup d'épanouissement à ma vie, et un autre but qui est de toujours être la tata exemplaire et présente quoi qu'il arrive.

A Mimi, qui a su être pour moi le grand frère, le meilleur ami que je n'ai pas. Lui qui connaît tout de moi et moi de lui.

A Adoula, l'homme qui donne amour et respect à ma sœur, et qui partage beaucoup de complicité avec moi.

A ma mimosa, qui à mes yeux n'est pas qu'un chat mais vraiment la chouchou de la maison. Elle a partagé mes longues nuits de révisions et de travail acharné en dormant toujours sur l'un de mes cahiers.

A mes meilleures copines HAWATHIL, elles ne peuvent pas connaître la loyauté et l'amour que j'ai pour elles. Je ne le remercierai jamais assez de me trouver parfaite dans ma pure imperfection, et m'aimer telle que je suis. Je vous aime les filles.

A madame Ayati et madame Touzouirt, qui en principe sont mes encadreurs mais j'ai tellement d'affections et de respects pour elles, car elles ont fait bien plus que leur travail, elles nous ont prises pour leur propre fille, nous les HAWATHIL. Elles nous ont appris bien plus que ce que n'importe quel autre professeur ne pourra nous apprendre.

Si je devais citer chaque personne, j'en aurai pour tout un livre.

A toute ces personnes, ce travail vous est dédié, et vous avez toute ma reconnaissance, sans vous tous je ne saurais jamais là où je suis maintenant. Love you.

Touta

GLOSSAIRE

Agents hépatoprotecteurs : Substances qui ont pour rôle de protéger le foie.

Bactéricide : une substance ayant la capacité de tuer des bactéries

Bactériostatique : Substance qui inhibe la multiplication des bactéries sans les tuer

Condimentaires : herbes aromatiques, ou fines herbes. Sont des plantes cultivées dans les jardins potagers ou dans les cultures maraichères, pour leurs qualités aromatiques, voir médicinal.

Dépistage phytochimique : Il s'agit de l'extraction, du dépistage et de l'identification des substances actives sur le plan médical présentes dans les plantes.

Dermotoxicité : les réactions cutanées consécutives à l'administration systémique de produits pharmaceutiques utilisés dans un but diagnostique, préventif ou thérapeutique, par voie entérale (digestive) ou parentérale (autres que digestives)

Émulsifiant : mélange hétérogène de deux substances liquide non miscible, l'une étant dispersée sous forme de fine gouttelettes dans l'autre

Epaississant : ingrédient utilisé pour réduire le caractère, en augmentant leur viscosité

Épatoxicité : est considérée comme le pouvoir qu'a une substance de provoquer des dommages au foie ; cela intervient généralement à la suite de la prise de médicament

Excipient : substance qui entre dans la composition d'un médicament et qui sert à incorporer les principes actifs

Gélose Muller-Hinton : est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

Hypocholestérolémiantes : taux élevé de cholestérol sanguin par rapport à une limite fixée par une instance de santé

Indices de rétention : utilisé pour convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système

Mitochondrie : Granule du cytoplasme, indispensable aux réactions énergétiques de la cellule

Neurotoxique : est l'action d'un poison (ou substance neurotoxique) sur le système nerveux. Il peut s'agir d'éléments chimique ou de substances biologiques comme les neurotoxines

Photocyclisation : processus photochimique intramoléculaire conduisant à un système cyclique par la formation d'une nouvelle liaison simple

Principe actif : une substance active qui désigne la substance chimique qui, dans un médicament, possède un effet thérapeutique

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

CPG : chromatographie phase gazeuse

CPG-IRT : chromatographie phase gazeuse- infrarouge à transformé de Fourier

CPG-IRT-SM : chromatographie phase gazeuse- infrarouge à transformé de Fourier- spectrométrie de masse

CPG-SM : chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

H.A.D : huile d'amande douce

HE : huile essentielle

HMG-CO A : hydroxyméthyleglutaryl-CoA réductase

MH : Mueller Hinton

P.L : Pistacia Lentiscus

PAM : plante aromatique médicinale

pH : potentielle hydrogène

SM : spectrométrie de masse

Liste des figures

Figure 1.1: Aire de répartition de P. Lentiscus autour du bassin méditerranéen.	4
Figure 2.1 : Pistacia Lentiscus des différentes stations	14
Figure 2.2 : Hydro-distillation type Clevenger.....	18
Figure 2.3 : Refractomètre ABBE	19
Figure 2.4 : Formation du lot de souris.....	24
Figure 2.5 : Application du Diclofénac 1%	25
Figure 3.1 : Variation du taux d'humidité restant dans la plante en fonction des jours.....	30
Figure 3.2 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées.....	31
Figure 3.3 : Histogramme de l'influence des coefficients sur le rendement.....	32
Figure 3.4 : Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues	34
Figure 3.5 : pourcentage d'inhibition d'HE du Pistacia lentiscus des Ouadias en fonction des concentrations.....	41
Figure 3.6 : pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction des concentrations.	42

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Classification botanique du Pistacia lentiscus.....	3
Tableau 2.1 : Ensemble du matériel utilisé	13
Tableau 2.2 : Situation géographique et bioclimatique des différentes stations	14
Tableau 2.3 : Tests d'indentification.....	15
Tableau 2.4 : Facteurs étudiés et leurs niveaux	17
Tableau 2.5 : Plan d'expérience en valeurs codées.....	18
Tableau 2.6 : Conditions opératoires de GC	20
Tableau 2.7: Conditions opératoires GC/MS	21
Tableau 2.8 : Ingrédients pour la formulation du cérat 1%	22
Tableau 2.9 : Produits testés dans chacune des études biologiques étudiées.	23
Tableau 2.10 : Matériels et produits utilisé pour les études biologiques sur l'HE	23
Tableau 2.11 : Lots utilisés pour l'étude anti-inflammatoire.....	25
Tableau 2.12 : micro-organismes étudiés	27
Tableau 3.1 : Résultats du screening phytochimique	29
Tableau 3.2 : Matrice du plan factoriel et les réponses enregistrées	30
Tableau 3.3 : Analyse de la variance donnée par MODDE 6.0	33
Tableau 3.4 : Valeurs souhaitées pour un rendement optimal	34
Tableau 3.5 : Solutions proposées par le logiciel MODDE 6.0	34
Tableau 3.6 : Résultat de l'étude du facteur séchage	35
Tableau 3.7 : Caractéristiques physique de l'HE du lentisque	36
Tableau 3.8 : Composition chimique de l'HE des deux zones de récolte.....	36
Tableau 3.9 : Composition globale des deux huiles essentielles.....	38
Tableau 3.10 : Tests de contrôle du cérat.....	39
Tableau 3.11 : Résultats obtenus pour chaque lot	40
Tableau 3.12 : Valeurs des absorbances des HES et pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.....	40

Tableau 3.13 : Valeurs des absorbances de l'acides ascorbique et pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations	41
Tableau 3.14 : Valeurs des IC50 de l'HE haute altitude et de l'acide ascorbique	42
Tableau 3.15 : Diamètres d'inhibition des HEs	43
Tableau3.16 : Résultat du lot témoin négatif.....	Annexe 5
Tableau3.17 : Résultat du lot témoin positif.....	Annexe 5
Tableau3.18 : Résultats du lot témoin test (HE du lentisque)	Annexe 5
Tableau3.19 : Résultat du lot test (produit fini).....	Annexe 5
Tableau3.20 : Résultats du lot test (placébo).....	Annexe 5

Table des matières

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1- Plantes aromatiques et médicinales.....	3
1-1 Définitions	3
1-1.1 Plante médicinale :.....	3
1-1.2 Plante aromatique :	3
2- Plante étudiée	3
2-1 Pistachier lentisque	3
2-1.1 Classification botanique :.....	3
2-1.2 Description botanique	3
2-1.3 Localisation géographique et habitat.....	4
2-1.4 Composition du Pistacia lentiscus	4
3- Huile essentielle	5
3-1 Définition.....	5
3-2 Utilisation	5
3-3 Procédés d'extraction.....	5
3-3.1 Hydro-distillation et entraînement à la vapeur d'eau	5
3-3.2 Distillation sèche	5
3-3.3 Expression à froid	6
3-4 Composition chimique	6
3-5 Caractérisation et identification	6
3-5.1 Caractéristiques organoleptiques.....	6
3-5.2 Caractérisation physico-chimique.....	6
3-5.3 Analyses par couplages	7
3-6 Conservation et condition de stockage :.....	8
3-7 Toxicité d'une huile essentielle	8
4- Bio-activité de l'huile essentielle du lentisque	8
4-1 Activité antibactérienne	8

4-2	Activité antioxydante	9
4-3	Activité anti-inflammatoire	9
5-	Formulation d'une pommade	10
5-1	Définition.....	10
5-1.1	Pommade hydrophobe	10
5-1.2	Pommade absorbant l'eau	10
5-1.3	Pommade hydrophile	11
5-2	Contrôle qualité	11
5-2.1	Tests physico-chimiques.....	11
5-2.2	Tests de stabilité.....	11
6-	Optimisation	11
6-1	Définition	11
6-2	Plans d'expériences	12
6-2.1	Terminologie	12
6-2.2	Plans factoriels	12
6-2.3	Avantages	12
6-2.4	Inconvénients.....	12

Chapitre 2 : Etude expérimentale

1-	Matériel et produits	13
2-	Récolte	14
2-1	Choix des stations	14
2-2	Description des zones d'étude	14
2-3	Période de la récolte	14
2-4	Identification de la plante	15
2-5	Conservation de la plante	15
2-6	Broyage.....	15
3-	Test phytochimiques	15
3-1	Préparation de l'infusé.....	15
3-2	Tests d'identification.....	15
4-	Optimisation et extraction.....	16
4-1	Plan factoriel.....	16
4-1.1	Construction du plan d'expérience	16
4-1.2	Choix des facteurs.....	16
4-1.3	Construction du plan factoriel.....	17

4-2	Extraction de l'HE :	18
4-2.1	Détermination du rendement	19
4-2.2	Caractérisation de l'HE	19
4-2-2.1	Indice de réfraction	19
4-2-2.2	Densité relative	19
4-2-2.3	Analyse par CPG-SM	20
5-	Formulation du cérat	21
5-1	Proportions d'ingrédients et préparation	22
5-2	Contrôle qualité	22
5-2.1	Examen microscopique	22
5-2.2	Examen macroscopique	22
5-2.3	Mesure du pH	22
6-	Evaluation in vivo des bio-activités de l'huile essentielle	22
6-1	Matériel et produits	22
6-2	Activité anti-inflammatoire	23
6-2.1	Préparation des lots	24
6-2-1.1	Lot témoin positif	25
6-2-1.2	Lot test	25
6-2.2	Sacrifice des souris	26
6-3	Activité antioxydante	26
6-4	Activité antibactérienne	27
6-4.1	Méthode	27
6-4.2	Souches testées	27
6-4.3	Choix du milieu du test	27
6-4.4	Préparation de l'inoculum	27
6-4.5	Test de l'aromatogramme	27
6-4.6	Incubation et lecture	28

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1-	Tests phytochimiques :	29
2-	Détermination de la teneur en eau :	29
3-	Etudes statistiques des résultats du plan d'expérience	30
3-1	Validation du modèle	30
3-1.1	Adéquation du modèle	31
3-1.2	Facteurs significatifs	31

3-1.3	Analyse de la variance	33
3-1.4	Etude des résidus	33
3-2	Modélisation des réponses à l'aide du logiciel MODDE 6.0	34
3-3	Phase de l'optimisation	34
4-	Influence du séchage sur le rendement d'extraction	35
5-	Caractéristiques de l'HE	36
6-	Caractérisation des HE par CPG/SM :.....	36
7-	Contrôle qualité du cérat :	39
8-	Evaluation de la bio-activité de l'HE	40
8-1	Activité anti-inflammatoire :.....	40
8-2	Activité antioxydante	40
8-3	Activité antibactérienne.....	43
	Conclusion	44

Bibliographie

Annexe

L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé peut être perçu comme une alternative aux médicaments conventionnels. Le *Pistacia lentiscus* figure dans la liste des plantes médicinales, c'est un arbuste à feuilles persistantes de la famille des Anacardiaceae, qui pousse spontanément et est largement répandu.

Les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et des brûlures légères. Dans le groupe des espèces à huile à usage médicinale et / ou alimentaire, exploitées par les sociétés paysannes méditerranéennes, la médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile grasse obtenue par expression des fruits de lentisque dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes.

Bien que l'exploitation de l'huile végétale du lentiscus dans plusieurs régions du pays s'accroît et connaît un essor appréciable, elle reste faible en réponse aux attentes d'une industrie pharmaceutique naissante. En effet, ce produit ne peut être obtenu qu'au moment de fructification.

L'huile essentielle du lentiscus, obtenue par hydrodistillation des feuilles, de fruits ou d'exsudats de tronc (gomme à mastiquer) est réalisable durant tout son cycle végétatif.

Plusieurs études concernant la composition chimique de l'huile de *P. lentiscus* ont été rapportées, Les huiles de diverses populations de *P. lentiscus* originaires du bassin méditerranéen ont été précédemment étudiées et différentes compositions ont été établies.

En plus d'une étude de la composition de l'huile l'essentielle, de l'évaluation de trois bio-activités (effet antibactérien, antioxydant et l'effet anti-inflammatoire) de *P. lentiscus* algérien, ce travail s'intéresse à déterminer les conditions optimales qui maximisent le rendement d'extraction de l'huile essentielle du *Pistacia*.

Afin de contribuer à la valorisation de la richesse locale, la plante est récoltée dans le centre-Est du pays, deux stations différentes ont été choisies, une zone basse altitude (Azeffoune) et une zone haute altitude (Ouadias). L'altitude, la durée d'extraction et la forme de la plante (broyée ou non broyée) sont les facteurs étudiés pour optimiser le rendement d'extraction, l'outil mathématique utilisé pour obtenir le résultat souhaité est la méthodologie des plans d'expériences.

Dans le premier chapitre du manuscrit, nous proposons une synthèse bibliographique visant à apporter quelques généralités sur la plante et ses métabolites secondaires, les méthodes d'extraction et de caractérisation de l'huile essentielle, un aperçu sur, l'évaluation des bio

activités de la plante, une initiation à la formulation pharmaceutique et à la méthodologie des plans d'expériences est donnée à la fin du chapitre.

Le 2^{ème} chapitre donne le détail du matériel, des équipements et des méthodes utilisées.

Les résultats avec leurs interprétations conformément à la littérature sont regroupés dans le troisième chapitre.

Une conclusion générale englobant tous les résultats et proposant quelques perspectives est donnée à la fin du mémoire.

1- Plantes aromatiques et médicinales

1-1 Définitions

1-1.1 Plante médicinale :

Selon la pharmacopée française (1965), une plante médicinale est utilisée entière ou sous forme d'une partie de plante possédant des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques [1].

1-1.2 Plante aromatique :

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particulier aux aliments [2].

2- Plante étudiée

2-1 Pistachier lentisque

2-1.1 Classification botanique :

La classification botanique du genre *P. lentiscus* est donnée par le tableau 1.1.

Tableau 1.1: Classification botanique du *Pistacia lentiscus* [3].

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia L</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>

2-1.2 Description botanique

Le lentisque aussi appelé arbre à mastic (nom berbère : tidekt, nom arabe : drou), est un arbrisseau dioïque de 1 à 3 mètres, son odeur est résineuse, forte. Ses feuilles sont persistantes, coriaces, luisantes en dessus, mates et pales en dessous. Ses pétioles sont étroitement ailés. Les fleurs sont en forme de grappes denses, naissant une ou deux à l'aisselle d'une feuille. Les fruits de cette espèce sont petits, subglobuleux, apiculés, rouges puis noirs à maturité. Le moment de floraison est en général entre le mois d'avril et le mois de mai, par contre la fructification se fait entre le mois d'octobre et le mois de novembre [4].

2-1.3 Localisation géographique et habitat

Le lentisque, est un arbre spontané qui pousse sur tout le bassin méditerranéen. Il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tous les types de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux. En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières. C'est une espèce indifférente aux variations du milieu ce qui explique sa dispersion. Il peut se situer dans une ambiance climatique subhumide, semi-aride et chaud. Dans les zones humides, il est plus abondant dans les plaines que les hauteurs à l'inverse des zones semi-arides [5].

La carte ci-dessous (Figure 1.1) montre la répartition géographique du *Pistacia lentiscus* L.



Figure 2.1: Aire de répartition de *P. Lentiscus* autour du bassin méditerranéen [6].

2-1.4 Composition du *Pistacia lentiscus*

Le lentisque comme toute autre plante, est composé de métabolites primaires qui eux sont des molécules organiques se trouvant dans toute les cellules de l'organisme. Ces molécules sont : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques [7]. Il est aussi composé de métabolites secondaires essentiellement en tanins, flavonoïdes, composés réducteurs ainsi que des terpénoïdes et enfin il est composé d'huile essentielle [8]. L'identification des métabolites secondaires se fait via des test phytochimiques en utilisant des réactifs spécifiques pour chaque métabolite.

3- Huile essentielle

3-1 Définition

Une huile essentielle, selon la pharmacopée européenne 6^{ème} édition est définie comme « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par extraction à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

3-2 Utilisation

L'utilisation de cette huile essentielle est bien étendue, allant d'une utilisation en aromathérapie énergétique jusqu'aux effets thérapeutiques importants voir un effet antibactérien, anti-inflammatoire, antioxydant, photoprotecteur, soignant les varices et jambes lourdes ... [9].

3-3 Procédés d'extraction

Le procédé d'extraction dépend exclusivement de l'utilisation ultérieure de l'huile essentielle, la pharmacopée européenne préconise les procédés suivants :

3-3.1 Hydro-distillation et entraînement à la vapeur d'eau

Le principe de la distillation à la vapeur d'eau ou hydro-distillation est d'entraîner les substances aromatiques à l'aide de la vapeur d'eau, ceci en mettant la matière végétale dans un ballon rempli d'eau portée à ébullition, la vapeur d'eau saturée en substances aromatiques, est condensée dans un réfrigérant, puis on récupère le condensat dans un récipient adéquat. Par contre le principe de l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est soumise à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable [10].

3-3.2 Distillation sèche

Son utilisation est moindre, elle est limitée à l'extraction d'huile essentielle des végétaux fragiles contenant des molécules thermosensibles telle que les pétales de rose. Son principe consiste à chauffer modérément la plante ou une partie de plante sans ajout d'eau ni de solvants organiques, suivra la condensation des substances volatiles. Cette méthode est connue pour son faible rendement d'extraction en HE [10].

3-3.3 Expression à froid

Elle est utilisée pour extraire l'essence des fruits à l'état frais, en général celle des agrumes. Elle s'effectue sans chauffage, donc c'est par moyen d'une pression mécanique à laquelle sont soumis les fruits [10].

3-4 Composition chimique

Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux grands groupes, les terpénoïdes d'une part et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Elle ne renferme pas de gras, ne contient pas non plus d'eau, ni d'alcool, ni de sels minéraux ni de vitamines [11,12].

3-5 Caractérisation et identification

La caractérisation et l'identification d'une huile essentielle sert d'une part à connaître sa constitution, et d'autre part à vérifier sa pureté, elle se fait par le biais de :

3-5.1 Caractéristiques organoleptiques

Chaque extrait est caractérisé par ces propriétés organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect et la couleur.

✓ L'odeur :

L'odorat est un sens chimique très sensible qui donne la capacité à identifier et à caractériser une substance odorante. [13].

✓ La couleur

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée [13].

✓ L'aspect

L'aspect d'une HE dépend des composés qui la constituent [13].

3-5.2 Caractérisation physico-chimique

✓ Indice de réfraction :

Souvent noté n , est une grandeur sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci. Il est à la fois variable selon des grandeurs qui lui sont extérieures, et non unique pour un milieu donné. Le refractomètre est l'outil utilisé pour

déterminer un indice de réfraction. Si la mesure se fait à $T \neq 20^\circ\text{C}$ alors l'utilisation de l'équation de correction est nécessaire. L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé. Celui des huiles essentielles est généralement élevé et est supérieur à ceux de l'eau à 20°C (1.3356), et de l'huile d'olive à 20°C (1.4684). Ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée [14,13].

✓ Densité relative :

La densité relative d'un corps est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un corps pris comme référence [15].

✓ Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration [13].

3-5.3 Analyses par couplages

Afin de rentrer dans le cœur d'une substance, et de caractériser avec précision (qualitativement et/ou quantitativement) sa constitution, nous pouvons avoir recours à :

✓ CPG-SM :

Les systèmes actuels de CPG-SM sont très performant pour la séparation, la détection et l'identification des molécules composant une huile essentielle. C'est un couplage entre une CPG qui est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition, et une SM qui est une méthode permettant la détection et l'identification des molécules composant un échantillon grâce à leur ionisation puis à la séparation des ions générés en phase gazeuse [16,17].

✓ Autres méthodes :

Les nombreuses difficultés rencontrées dans l'identification et/ou caractérisation de composés d'huiles essentielles, ont conduit à l'évolution d'autres méthodes de couplage telles que le couplage SM/SM utilisée par Cazaussus et Coll pour l'étude des fragmentations de la khusimone constituant l'huile essentielle de vétier bourbon. Le couplage CPG-IRT permet d'analyser des composés fonctionnalisés en permettant d'identifier des molécules dont les spectres de masse ne sont pas suffisamment différenciés. Ces deux méthodes CPG-IRT et CPG-SM peuvent être couplées formant le couplage CPG-IRT-SM pour profiter à

100% de leur potentialité, à titre d'exemple, ce couplage a été utilisé par Hedges et Coll pour identifier à coté du 1.8-cinéole majoritaire, plusieurs autres constituants présents à de faibles concentrations dans l'huile essentielle d'Eucalyptus australiana [16].

3-6 Conservation et condition de stockage :

L'instabilité des molécules constitutives des HE implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement concrétisées par la mesure d'indices chimiques, par la détermination de grandeurs physiques et/ou par l'analyse chromatographique. Les conséquences sont multiples par exemple, photocyclisation, coupure oxydative, décomposition en cétones et alcools, hydrolyse... Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou carrément mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle. Pour éviter ces tracas, il convient d'utiliser des flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière. Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Par ailleurs, des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques [10].

3-7 Toxicité d'une huile essentielle

Bien qu'en vente libre, y compris en dehors du circuit officinal, les huiles essentielles ne sont pas des produits anodins et présentent certains risques de toxicité. Les huiles essentielles sont susceptibles d'entraîner plusieurs types de toxicité telles que l'épatoxicité, dermatotoxicité, neurotoxicité... La toxicité principale chronique est liée à l'utilisation prolongée d'huiles essentielles phénoliques, dangereuses pour les hépatocytes à long terme [18].

4- Bio-activité de l'huile essentielle du lentisque

De nombreuses recherches sont consacrées à exploiter au maximum les effets thérapeutiques de l'huile essentielle de cette plante médicinale, parmi les plus étudiés on distingue :

4-1 Activité antibactérienne

Une bactérie est caractérisée par son pouvoir pathogène alors que l'hôte par sa réceptivité ou son pouvoir de défense. La maladie infectieuse résulte donc de la rupture de l'équilibre en faveur de la bactérie. Elle est liée à la pénétration et à la multiplication d'un agent microbien virulent ayant la capacité d'entraîner des troubles dans l'organisme infecté [19].

Une substance antibactérienne est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries ou de l'inhiber. On y trouve principalement les antibiotiques qui agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires pour perturber le métabolisme bactérien par plusieurs modes d'action tels que l'inhibition enzymatique, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance bactérienne ou la chélation des métaux tels que le fer, la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique (qui cause une fuite des composants cellulaires), l'influence de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des lipides et la fonction mitochondriale [20]. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe dont le résultat de l'activité antibactérienne peut être bactéricide ou bactériostatique [20,19].

4-2 Activité antioxydante

En condition physiologique, l'oxygène produit en permanence au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées activées (EOA) particulièrement toxiques pour la cellule. Ces EOA, dont font partie les radicaux libres, sont douées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir dans leur environnement d'existence, avec toute une quantité de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose...). Au niveau moléculaire, les EOA peuvent aussi agir comme messagers secondaires, et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies [21]. Pour se protéger, le corps humain improvise en produisant des antioxydants tel que la vitamine A, C, E, polyphénols, protéines, lipides membranaires. Si ces derniers venaient à s'oxyder plus que ce qu'il en faut (trouble de la balance pro-oxydant/antioxydant) ceci induira des dommages intracellulaires irréversibles conduisant à des cancers [22]. Les huiles essentielles comme antioxydants sont très recherchées pour étudier leur rôle protecteur vis-à-vis des lipides [23]. Elles montrent leurs actions comme des agents hépatoprotectives, en plus, les huiles essentielles possèdent des propriétés hypocholestérolémiantes en protégeant contre le cancer. 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 régulatrice de la synthèse du cholestérol [23]. Le principe étant simple, les huiles essentielles contenant surtout les composants phénoliques, sont douées du pouvoir antioxydant, car l'hydrogène du groupement OH est libéré pour se lier aux radicaux peroxydes durant le premier stade de l'oxydation des lipides [23].

4-3 Activité anti-inflammatoire

Une inflammation est la réaction du tissu vascularisé aux blessures locales. Elle résulte d'une réponse immunitaire aux micro-organismes infectieux, ainsi qu'aux traumatismes, à la chirurgie... etc. [19].

Deux types d'inflammations peuvent être rencontrées.

✓ Inflammation aiguë :

L'inflammation aiguë est la réponse précoce, presque immédiate à une blessure. Elle est non spécifique et peut être provoquée par n'importe quelle blessure. En général, elle est de courte durée [19].

✓ Inflammation chronique :

Les infections aiguës sont rapidement contrôlées par les défenses de l'hôte, contrairement aux infections chroniques, qui peuvent durer à perpétuité (des semaines, des mois, voire des années). Elles sont causées par des irritants persistants, dont la plupart résistent aux mécanismes inflammatoires [19].

Le médicament agissant sur une inflammation est dit anti-inflammatoire. Ce dernier se classe en deux catégories à savoir les anti-inflammatoires stéroïdiens qui eux sont une grande variété de dérivés du cortisol, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [19].

5- Formulation d'une pommade

5-1 Définition

La pharmacopée européenne réserve la dénomination « pommade » à des préparations se composant d'un excipient monophasé dans le quel peuvent être dispersées des substances, liquides, ou solides. C'est une préparation semi-solide destinée à être appliquée sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de substances actives [24].

On distingue :

5-1.1 Pommade hydrophobe

Elle ne peut absorber que de petites quantités d'eau. Les substances les plus utilisées pour formuler ce genre de pommade sont la vaseline, la paraffine solide ou liquide, les huiles végétales ou graisses animales, les cires ... etc. [24].

5-1.2 Pommade absorbant l'eau

Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Les bases utilisées sont celles d'une pommade hydrophobe dans les quelles sont incorporés des émulsifiants de type eau dans huile, ou huile dans eau [24].

5-1.3 Pommade hydrophile

Ce sont des pommades dont l'excipient est miscible à l'eau. Cet excipient est généralement constitué de macrogols (polyéthyléneglycols) liquides et solides [24].

5-2 Contrôle qualité

En général, le contrôle qualité est basé sur des tests physico-chimiques et des tests de stabilité [25].

5-2.1 Tests physico-chimiques

Ils consistent à :

- Déterminer les caractères organoleptiques de la pommade (présentation, texture, couleur...),
- Identifier et doser le ou les principes actifs,
- Déterminer la présence d'éventuelles impuretés et faire leur quantification,
- Déterminer les caractères pharmaco-techniques en relation avec la forme pharmaceutique.

5-2.2 Tests de stabilité

Un médicament est considéré comme stable lorsque ses propriétés essentielles ne changent pas, ou changent dans des proportions tolérables jusqu'à sa date de péremption. Pour cela la stabilité des médicaments doit être surveillée selon un programme approprié et continu permettant la détection de tout problème [26].

6- Optimisation

6-1 Définition

L'optimisation est une procédure indispensable qui se définit comme un ensemble homogène d'outils et de méthodes algébro-statistiques visant à établir et à analyser les relations existant entre les grandeurs étudiées (réponses) et leurs sources de variations supposées (facteurs) [27].

Pour mener à bien une optimisation, plusieurs éléments sont indispensables et conditionnent les résultats trouvés. Les éléments cités ci-dessous sont supposés conduire à une réponse qui est l'optimum, qui est supposé être la meilleure combinaison possible :

- Définir les paramètres.
- Choisir la fonction réponse.
- Algorithme d'optimisation.
- Modèle.

6-2 Plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser des essais expérimentaux afin d'obtenir le maximum de renseignement avec un minimum d'expériences.

6-2.1 Terminologie

✓ Réponse

C'est la grandeur étudiée ou grandeur de réponse de chaque essai.

✓ Facteurs

Ce sont les grandeurs supposées influencer sur les variations de la réponse.

✓ Domaine d'étude

Ce domaine est défini par deux niveaux haut (+1) et bas (-1) de tous les facteurs. L'ensemble des valeurs que peut prendre un facteur entre les deux niveaux s'appelle un domaine expérimental.

✓ Matrice d'expérience

C'est un outil mathématique qui représente l'ensemble des essais à réaliser.

6-2.2 Plans factoriels

Ce sont les plus utilisés vu leur simplicité et rapidité d'exécution notés 2^k où 2 correspond aux niveaux maximum et minimum qui délimitent le domaine d'étude. Pour ce type de plan à (k) facteurs, le nombre d'expérience est de 2^k [28].

6-2.3 Avantages

- Facile à construire
- Facile à contrôler
- Modélisation mathématique est immédiate

6-2.4 Inconvénients

‘L'inconvénient majeur de ce plan est le nombre élevé d'essais à réaliser.

1- Matériel et méthodes

L'ensemble des matériels, équipements ainsi que des produits utilisés pour la première étape du travail (récolte, optimisation, extraction) sont mentionnés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Ensemble du matériel utilisé

Etapes	Equipements / matériel	Verrerie	Produits	Outils logistiques
Broyage	Blender BL-124B Proton			
Test Phytochimique	- Plaque chauffante - Balance analytique - Spatule - Pompe à vide - Büchner	- Cristallisoir - Fiole jaugée - Pipette graduée - Tubes à essaie - Becher - Erlenmeyer	- FeCl ₃ 5% - HCl - R.Mayer - R.Wagner - H ₂ SO ₄ 0.1% - Coupon Mg	
Extraction d'HE	- Chauffe ballon 1L - Pincés - Pitacia.L	- Ballons 1L - Clevenger gradué - Pipette pasteur	- Pierre pence - Pistacia Lentiscus	
Optimisation				- Logiciel MODDE 6.0 - Statistica
Caractérisation	- CPG-SM - Réfractomètre ABBE - Tube ependorf gradué			
Formulation	- Plaque chauffante - Balance analytique - pH mètre - microscope	- Cristallisoir - Mortier - Poinçon - Flacon ombré	- Cire d'abeille synthétique - H.d'amande douce - HE lentisque	

2- Récolte

2-1 Choix des stations

L'Algérie comme d'autre pays de la mer méditerranéenne est connue par son tapis végétal très diversifié y compris les plantes médicinales, aromatiques. Cette richesse résulte d'un équilibre délicat entre les différents facteurs environnementaux. Le centre Est de l'Algérie (Tizi-Ouzou) n'est guère exclue de cette définition. L'une des plantes présentes est le *Pistacia Lentiscus*, objet de notre étude, elle pousse spontanément et est récoltée dans deux zones de la région de Tizi-Ouzou : Azeffoune (Sidi Khelifa), Ouadias (Agouni Gueghrane).

2-2 Description des zones d'étude

Les deux zones sont décrites dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Situation géographique et bioclimatique des différentes stations

Stations	Longitude	Latitude	Altitude	Etage bioclimatique
Sidi Khelifa	4°30'59"E	36°53'03"N	32 m	Subhumide
Agouni Gueghran	4°06'12"E	36°30'24"N	1 434 m	Subhumide, humide, perhumide à hiver froid

2-3 Période de la récolte

Pour les stations d'étude, la récolte du matériel végétal a été effectuée au mois de mars, avril et mai. Dans la figure 2.1 est présentée la plante récoltée dans les deux stations.

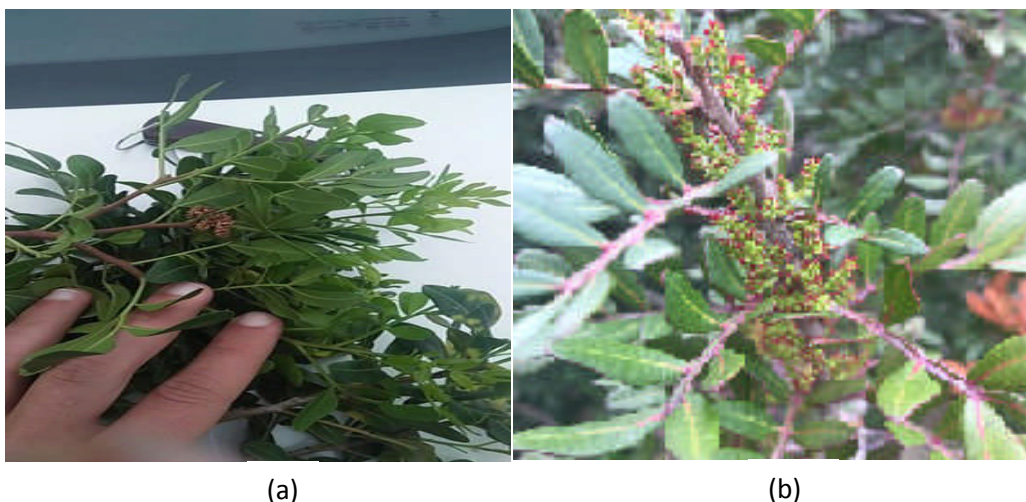


Figure 2.1 : *Pistacia Lentiscus* des deux stations (a) P.L récoltée à Sidi Khelifa
(b) P.L récoltée à Agouni Gueghrane

2-4 Identification de la plante

La plante est identifiée par le professeur SMAIL au niveau du département de biologie de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou.

2-5 Conservation de la plante

Une fois la récolte achevée et après un tri rapide, la plante est séchée à l'ombre et à température ambiante pendant 15 jours.

2-6 Broyage

La matière végétale est broyée à l'aide d'un Blender PROTON modèle BL-124B en une fine poudre.

3- Test phytochimiques

Ces tests ont pour but de caractériser les principales familles phytochimiques contenues dans un organe végétal. Ils se résument en des réactions physicochimiques qui sont basées sur des essais de coloration ou de précipitation. Les groupes phytochimiques qui ont fait l'objet de ces tests sont : les alcaloïdes, les polyphénols (tannins, flavonoïdes et anthocyanes), les saponosides.

3-1 Préparation de l'infusé

L'infusé est préparé par 20g de poudre sèche de la plante, puis complété par de l'eau distillée chaude jusqu'à 100mL. L'infusion est mise de côté pendant 15mn, puis filtrée. Le filtrat obtenu est ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 100mL. (Méthode décrite par Paris et Nothis 1978)

3-2 Tests d'identification

Les principales familles de métabolites secondaires identifiées sont résumées dans le tableau 2.3 :

Tableau 2.3 : Tests d'indentification

Identifications	Protocole
Saponosides,tanins, flavonoïdes, anthocyanes	Voir Annexe 2
Alcaloïdes	Voir Annexe 2

4- Optimisation et extraction

4-1 Plan factoriel

4-1.1 Construction du plan d'expérience

L'outil mathématique utilisé pour déterminer le nombre d'essai à réaliser pour l'extraction de l'HE du lentisque est le plan d'expérience. La matrice d'expériences ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été faites au moyen du logiciel Modde, version 6.

4-1.2 Choix des facteurs

Parmi tant de facteurs trouvés dans la littérature pouvant influencer le rendement d'extraction d'une HE, à défaut de grand nombres d'expérience nous avons choisi d'étudier les facteurs suivants :

- Le temps d'extraction : La qualité ainsi que la quantité d'HE pouvant être extraite d'un organe végétal dépendent du temps d'hydrodistillation, car il y a qu'en un temps d'extraction optimal qu'il puisse y avoir épuisement de toute fraction composant l'HE, et à partir de ce temps-là, la rentabilité de l'extraction commence à diminuer. Le choix du domaine du temps est porté sur l'intervalle 1h-3h, le même utilisé par O. Aissi et al pour la même substance utile extraite et pour la même espèce botanique [29].
- L'altitude des stations de récolte : étant donné que l'latitude varie, ceci impliquera probablement la variabilité de la qualité du sol ainsi que le climat de la zone. Ce paramètre peut influencer ou pas la quantité d'HE bio-synthétisée par la plante.
- La forme végétale : les plantes aromatiques n'ont pas toute, la même localisation des glandes sécrétrices d'HE.
- Le taux d'humidité contenu dans la plante : Pour une même masse végétale à l'état frais et à l'état sec, le rendement en huile essentielle peut différer en raison de la quantité d'eau emprisonnée dans la plante. Ce paramètre est étudié indépendamment de la matrice.

Le tableau 2.4 regroupe les niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées (-1 désignant le niveau bas, 0 le niveau moyen et +1 le niveau haut) et en valeurs réelles.

Tableau 2.4 : Facteurs étudiés et leurs niveaux

	Facteurs	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1	Nature
X ₁	Temps d'extraction	1h	2h	3h	Quantitatif
X ₂	Forme	Broyée		Non broyée	Qualitatif
X ₃	Altitude	Basse		Haute	Qualitatif

4-1.3 Construction du plan factoriel

Le plan factoriel est le plus simple sur le plan technique ; il se prête donc bien à l'introduction d'éléments méthodologiques et Il est souvent utilisé tout en ayant l'avantage d'étudier les interactions entre les différents facteurs.

Le modèle a comme équation :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + \dots \quad (2.1)$$

Y : réponse étudiée

x₁, x₂, x₃ : niveaux des trois facteurs

a₀, a₁, a₂ ... : coefficients du modèle

Le nombre d'essai à effectuer avec ce plan est de :

$$N = 2^k + N_0 \dots \quad (2.2)$$

N : nombre d'essais

K : le nombre de facteurs

N₀ : points au centre

Dans notre cas, nous avons 3 facteurs, donc $N = 2^3 + 3 = 11$ extractions.

La matrice en valeurs codées construite par le logiciel est représentée comme suit :

Tableau 2.5 : Plan d'expérience en valeurs codées

Essais / Facteurs	Temps	Altitude	Forme
1	-1	Basse	Non broyée
2	1	Basse	Non broyée
3	-1	Haute	Non broyée
4	1	Haute	Non broyée
5	-1	Basse	Broyée
6	1	Basse	Broyée
7	-1	Haute	Broyée
8	1	Haute	Broyée
9	0	Basse	Broyée
10	0	Base	Broyée
11	0	Basse	Broyée

4-2 Extraction de l'HE :

L'extraction de notre HE est faite par hydrodistillation en utilisant un Clevenger. 150g de matière végétale sont introduits dans un ballon de 1L, puis 600 mL d'eau distillée y sont versés ainsi que de la pierre ponce afin d'éviter que la matière remonte vers le haut. La figure 2.2 montre le dispositif d'extraction au laboratoire.



Figure 2.2 : Hydro-distillation type Clevenger.

4-2.1 Détermination du rendement

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétal à traiter.

$$R\% = (m/m_0) \times 100 \dots (2.3)$$

m : masse de l'huile essentielle (g).

m_0 : masse du matériel végétal sec (g).

4-2.2 Caractérisation de l'HE

4-2-2.1 Indice de réfraction

L'indice de réfraction (n) d'un milieu est défini comme le rapport du sinus de l'angle formé par le rayon incident et la normale sur le sinus de l'angle formé par le rayon réfracté et la normale. Expérimentalement, l'indice de réfraction est déterminé en utilisant le refractomètre ABBE.

La figure 2.3 représente le refractomètre ABBE utilisé pour la détermination de l'indice de réfraction de l'HE des deux plantes.



Figure 2.3 : Refractomètre ABBE

4-2-2.2 Densité relative

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un volume précis de cette huile à 20°C par la masse du même volume d'eau à la même température.

Elle est calculée suivant la formule :

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} + 0.0012 \dots (2.4)$$

M_0 : la masse de l'ependorf vide (g).

M_1 : la masse de l'ependorf rempli d'eau distillée (g).

M2 : la masse de l'ependorf rempli d'huile essentielle (g).

4-2-2.3 Analyse par CPG-SM

Les échantillons d'HE sont analysés par CPG-SM qui nous permet de définir la nature et la teneur en chacun des constituants de ces premières. Leur identification est basée sur la comparaison de leurs spectres de masses avec ceux issus de la littérature ou d'une banque de données.

L'analyse CPG/SM a été effectuée au niveau de l'USTHB au laboratoire des plantes médicinales.

Les conditions opératoires de cette analyse chromatographique sont résumées dans les tableaux 2.6 et 2.7 :

Le pourcentage de chaque constituant dans l'HE est calculé par intégration des aires du chromatogramme. Une série d'alcane linéaires (C₅-C₃₀) est injectée dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention (selon Van Den Dool) des constituants des huiles essentielles.

Tableau 2.6 : Conditions opératoires de GC

Appareil :	Hewlett- Packard 6890
Colonne	HP5 MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm, diméthylpolysiloxane)
Gaz vecteur	Azote
Débit du gaz	0,5 ml /mn
Température de l'injecteur	250°C
Température du détecteur	250°C
Quantité injectée	0,2 µL
Température de colonne	60°C/8 min jusqu'à 250°C/15 min à raison de 3°C/min.

En ce qui concerne la CPG-SM, la confirmation de l'identification est faite par simple chromatographie gazeuse et la compléter avec un spectromètre de masse. L'analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée dans des conditions d'analyse bien précises.

Afin de calculer les indices de rétention des différents constituants, un mélange d'alcane a été injecté sous les mêmes conditions.

Tableau 2.7: Conditions opératoires GC/MS

Chromatographie gazeuse	Spectrométrie de masse
Appareil : Hewlett- Packard 6890	Appareil : Agilent MSD 5973
Colonne : HP5 MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	Mode d'ionisation : impact électronique
Gaz vecteur : Hélium	Tension d'ionisation : 70 eV, basse résolution
Débit : 0.5 ml /mn	Balayage automatique : m/z 25 à 350
Température de l'injecteur : 250°C	Température de la source : 280°C
Température du détecteur : 250°C	Interface : Couplage direct
Quantité injectée : 0.2 µL	Pression : 2.10 ⁻⁶ Torr
Température de colonne : 60°C/8 min jusqu'à 250°C/15 min à raison de 3°C/min.	

5- Formulation du cérat

Pour formuler le cérat 1%, les ingrédients, matériel et équipement sont mentionnés dans le tableau 2.1 précédent.

5-1 Proportions d'ingrédients et préparation

Dans un bain marie, mettre les 9g de cire d'abeille dans le mortier et y incorporé directement l'huile d'amande douce. Une fois fondu, le mortier est enlevé du bain marie et le tout est agité en forme de huit. Au moment de l'épaississement du cérat, rajouter progressivement la quantité de l'huile essentielle. Continuer d'agiter en forme de huit jusqu'à refroidissement de la formulation. La proportion de chaque ingrédient est citée dans le tableau 2.8.

L'huile essentielle utilisée comme principe actif est un mélange des deux huiles (haute et basse altitude) à un volume 50/50

Tableau 2.8 : Ingrédients pour la formulation du cérat 1%

Composants	Quantité	Fonction	Référentiel
Huile d'amande douce	40.5g	Adoucissant	Ph. Eur.
Huile essentielle lentisque	0.5g	Principe actif	-
Cire d'abeille	9g	Epaississant	Ph. Eur.

5-2 Contrôle qualité

Afin de s'assurer de la bonne qualité du cérat, les tests suivants sont effectués :

5-2.1 Examen macroscopique

Cet examen consiste à définir les caractères organoleptiques de la formulation (odeur, couleur, aspect) ainsi que la réalisation d'un test d'étalement (absence d'agrégats visibles à l'œil nu, et une bonne diffusion à travers la peau).

5-2.2 Mesure du pH

Le pH du cérat est déterminé par un pH mètre. Ce premier doit être neutre pour éviter toute irritation de la peau.

5-2.3 Examen microscopique

La vérification de l'homogénéité du cérat a été vérifiée en utilisant un microscope avec un zoom de 10µm, 40µm. Le critère de qualité étant de vérifier la bonne dispersion des gouttelettes dans la phase

6- Evaluation in vivo des bio-activités de l'huile essentielle

6-1 Matériel et produits

Pour chaque étude biologique, les tableaux 2.9 et 2.10 mentionnent respectivement les produits testés et le matériel ainsi que les produits utilisés.

Tableau 2.9 : Produits testés dans chacune des études biologiques étudiées.

Etude biologique	Anti-inflammatoire	Antioxydante	Anti bactérienne
Produits testés	<ul style="list-style-type: none"> - Mélange 50/50 de l'HE (produit brut) - Placébo - Cérat 1% - H.A.D 	<ul style="list-style-type: none"> - HE de basse altitude - HE de haute altitude 	<ul style="list-style-type: none"> - HE de basse altitude - HE de haute altitude

Tableau 2.10 : Matériels et produits utilisé pour les études biologiques sur l'HE

	Matériels	Produits	Equipement / outil logistique
Etude Anti Inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipette - Emporte-pièce - Pince - Marteau - Ciseaux - Cage en polyéthylène - Enceinte fermée - Seringues de 1ml 	<ul style="list-style-type: none"> - Xylène - Ether diéthylique - Cérat 1% - Diclofénac gel 1% 	<ul style="list-style-type: none"> - Balance analytique - Statistica
Etude Anti Oxydante	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipette - Tubes à essaies - Fioles jaugée - Burettes graduées - Becher 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthanol - DPPH en poudre 	<ul style="list-style-type: none"> - Balance analytique - Spectromètre UV, ZUZI - Statistica
Etude Anti Bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> - Boite de pétrie - Ecouvillon - Bec bunsen 	<ul style="list-style-type: none"> - Eau physiologique - Gélose - Gaz butane 	<ul style="list-style-type: none"> - Etuve

6-2 Activité anti-inflammatoire

L'étude anti-inflammatoire a été faite au laboratoire de pharmacotoxicologie du LNCPP en se référant à la méthode élaborée par le professeur Chader. « L'œdème aigu de l'oreille de souris induit par xylène » est le nom attribué à la méthode utilisée pour effectuer cette étude. Son principe est d'exprimer l'anti-inflammatoire de la substance testée par sa capacité à réduire l'œdème de l'oreille droite sur laquelle sont appliqués 30 µL de xylène de façon

topique. La déduction du poids de l'œdème auriculaire se fait par le calcul de la différence de poids des disques auriculaires de 8mm de diamètre prélevés respectivement sur l'oreille droite traitée par xylène et l'oreille gauche non traitée.

La première étape est de former un lot de 10 souris où l'oreille droite de chacune d'elles est traitée par xylène. Ce lot est appelé « lot témoin négatif ». La différence entre le poids moyen d'œdème du lot témoin négatif et le poids moyen de réduction de l'œdème par la substance est un effet anti-œdème correspondant à l'activité anti-inflammatoire exercée par la substance active.

Le poids d'œdème est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le poids moyen d'œdème} = \left| \frac{\sum(POT - PONT)}{N} \right| \times 100 \dots (2.5)$$

POT : poids de l'oreille traitée

PONT : poids de l'oreille non traitée

N : nombre de souris du lot

Le pourcentage de réduction d'œdème a été calculé comme suit :

$$\text{Le \% de réduction d'œdème} = \left| 1 - \frac{PM \text{ d'œdème traité}}{PM \text{ d'œdème } T(-)} \right| \times 100 \dots (2.6)$$

PM : poids moyen

T (-) : témoin négatif

6-2.1 Préparation des lots

Afin de former un lot homogène, dix souris sont placées dans une cage. La première étape consiste à peser préalablement chaque souris de sorte à former un lot homogène. Ensuite, les souris sont marquées de 1 à 10 à l'aide d'un marqueur.

La formation d'un lot est illustrée par la figure 2.4.



Figure 2.4 : Formation du lot de souris

Trois lots sont formés comme le montre le tableau 2.11.

Tableau 2.11 : Lots utilisés pour l'étude anti-inflammatoire

Lot	Témoin positif	Témoin négatif	Test
Produit testé	Diclofénac gel 1%	Xylène	Produit brut 50/50 Cérat 1% Placébo
Poids du lot	Poids homogène $20 \pm 2g$	Poids homogène $20 \pm 2g$	Poids homogène $20 \pm 2g$

6-2-1.1 Lot témoin positif

100 μ L de Diclofénac ont été appliqués avec une seringue de 1mL (soit 0.1mL pour chaque souris), sur la face interne de l'oreille droite des souris. Après une heure, 30 μ L de xylène ont été appliqués sur le même endroit de l'oreille. La figure 2.5 illustre le Diclofénac utilisé.



Figure 2.5 : Application du Diclofénac 1%

6-2-1.2 Lot test

Les applications ci-dessous ont différé uniquement dans le produit testé et bien évidemment pour chacune d'elles un lot différent a été utilisé. Par contre l'application du xylène est fixée à 30 μ L et le temps de latence à 1h. La même procédure que celle du Diclofénac est utilisée.

✓ Application du produit brut 50/50_:

100 μ L d'huile essentielle (mélange 50/50 de différentes altitudes) sont prélevés avec une micropipette.

✓ Application du cérat 1% :

100 μ L du cérat sont prélevés avec une seringue de 1mL.

✓ Application du placébo :

100 μ L du placébo sont aussi prélevés avec une seringue de 1mL.

✓ Application de de l'huile d'amande douce :

Un lot de trois souris est composé, et 100 µL d'huile d'amande douce sont prélevés avec une seringue de 1mL.

6-2.2 Sacrifice des souris

Pour chacun des lots cités en haut, 4h de temps ont été écoulés après l'application du xylène avant le sacrifice. Les souris sont asphyxiées dans une enceinte fermée à l'éther diéthylique. Les souris sacrifiées, sont récupérées dans leur cage, puis leurs oreilles (gauches et droites) sont découpées afin d'en former des disques de 8mm de diamètre. Ces derniers sont pesés, afin de déterminer la différence de masse entre l'oreille traitée et l'oreille non traitée, par conséquent évaluer l'activité anti-inflammatoire des produits testés.

6-3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles du Pistacia Lentiscus à haute et basse altitude a été effectuée par la méthode du DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le DPPH. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

Le dosage spectrophotométrique a été réalisé en utilisant le radical stable DPPH comme réactif ayant une absorption spécifique à 517nm. La solution de DPPH a été préparée par dissolution de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (0.1mmol/L), ensuite diluée pour une absorbance allant de 0.2 à 0.9.

50 µL de différentes concentrations des solution d'HE (200, 100, 50) mg/mL sont additionnés à 2 mL de DPPH. Après 30min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue contre un blanc à 517nm. L'acide ascorbique est utilisé comme témoins positif (référence).

L'activité antioxydante est calculée par l'équation suivante :

$$I(\%) = 100 \times \frac{(A_b - A_e)}{A_b} \dots (2.7)$$

I% : le pourcentage d'inhibition.

A_b : l'absorbance du blanc.

A_e : l'absorbance de l'échantillon.

A partir de la valeur (**I**), nous pouvons déterminer **IC₅₀** qui représente les concentrations des huiles essentielles nécessaires à 50% de neutralisation en utilisant le graphe de DPPH.

6-4 Activité antibactérienne

6-4.1 Méthode

La technique choisie est celle de diffusion sur disque utilisée pour étudier l'interaction entre l'HE du lentisque de différentes altitudes et les espèces microbiennes en inhibant la croissance de celles-ci.

6-4.2 Souches testées

Les souches testées ainsi que leur origine sont portées sur le tableau 2.12

Tableau 2.12 : Micro-organismes étudiés

Souches	Fournisseur	Souche de référence
• Bactérie à Gram (-) : Escherichia coli	CHU de Tizi Ouzou (laboratoire de microbiologie)	ATCC 25922
• Bactérie à Gram (+) : Staphylococcus aureus		ATCC 29213

6-4.3 Choix du milieu du test

Le milieu choisi pour les souches bactériennes est la gélose Muller-Hinton, 20mL correspondant à 4mm d'épaisseur, sont versés dans des boîtes de pétri stérile.

6-4.4 Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes choisies ont été revivifiées et repiquées dans la gélose nutritive, puis incubées pendant 24h pour l'obtention d'une culture jeune. Par la suite, des suspensions troubles de ces souches ont été préparées en prélevant des colonies bien isolées et identiques. On les dépose dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile. La densité optique de la suspension bactérienne doit être de 0.5 MC.

6-4.5 Test de l'aromatogramme

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman N° 1, avec un diamètre de 6mm, ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C. À l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen les disques sont déposés sur la surface gélosée MH. Un espace de 25mm centre à centre de chaque disque doit être respecté.

Pour chaque boîte de pétri, trois disques y sont déposés, en utilisant une micropipette, le premier est imprégné de 5µL de l'HE à haute altitude, le second est imprégné de 5µL de

l'HE à basse altitude et le troisième est imprégné de 5µL d'eau physiologique stérile comme témoin négatif, pour toutes les souches. Vu la consistance du cérat formulé, l'imprégnation d'un disque avec celui-ci est quasi-impossible, c'est pour cela que la méthode des puis a été adaptée pour étudier l'effet antibactérien du cérat 1%.

Pour cette étude, l'utilisation d'un antibiotique de référence n'a pas été nécessaire, car son but était de déterminer qualitativement l'effet antibactérien et non quantitativement.

6-4.6 Incubation et lecture

Les boîtes de pétris sont ensuite fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures.

La lecture est faite pour chaque HE par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération bactérienne à l'aide d'un pied à coulisse ou une simple règle. Les diamètres sont ainsi mesurés et comparés aux résultats trouvés dans la littérature.

1- Tests phytochimiques :

Le screening phytochimique des feuilles, fleurs et rameaux du lentisque a mis en évidence la présence de plusieurs composés chimiques réputés d'avoir des activités biologiques intéressantes (Tableau 3.1). Il s'agit des substances polyphénoliques dont les tanins et les flavonoïdes. Les mêmes composés sont identifiés dans le Pistacia récolté à l'ouest Algérien (Tlemcen) Zitouni (2017) et au Maroc Bammou et al (2015).

La réactivité des saponosides et les anthocyanes identifiés dans le Pistacia haute et basse altitude est différente. La plante basse altitude (Azeffoune) présente une teneur inférieure de saponosides comparée à celle des hautes altitudes (Ouadias), le résultat est quantifié visuellement par l'épaisseur de la mousse persistante obtenue. Par contre, la plante des Ouadias ne présente aucune présence d'anthocyanes, contrairement à celle d'Azeffoune. Cette différence est éventuellement attribuée à la nature du sol et/ou la différence climatique des deux stations de récoltes.

Tableau 3.1 : Résultats du screening phytochimique

Composés phytochimiques	P.L d'Azeffoune (basse altitude)	P.L des Ouadias(haute altitude)
Tannins	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++
Saponosides	++	+++
Anthocyanes	++	-
Alcaloïdes	-	-

(+++ : Réaction positive ; ++ Réaction moyennement positive ; - : Test négatif).

2- Détermination de la teneur en eau :

L'évolution de la teneur en eau des feuilles et des fleurs du Pistacia lentiscus au cours du séchage à température ambiante est présentée dans la figure 3.1. L'analyse des résultats montre deux phases :

- Une phase décroissante : une diminution progressive du poids des feuilles et fleurs et rameaux est remarquée entre le premier jour du séchage et le cinquième jour.
- Une phase de stabilité : Entre le cinquième et le quatorzième jour, le poids des feuilles et fleurs tend à se stabiliser. Le taux d'humidité final retenu dans la plante est de 50% ce qui correspond à environ la moitié du poids de la plante. Pour la même durée et le même type de séchage (à température ambiante et à l'abri de la lumière) ce résultat est approximativement identique à celui trouvé par Bammou et al, (63.33±1.15%).

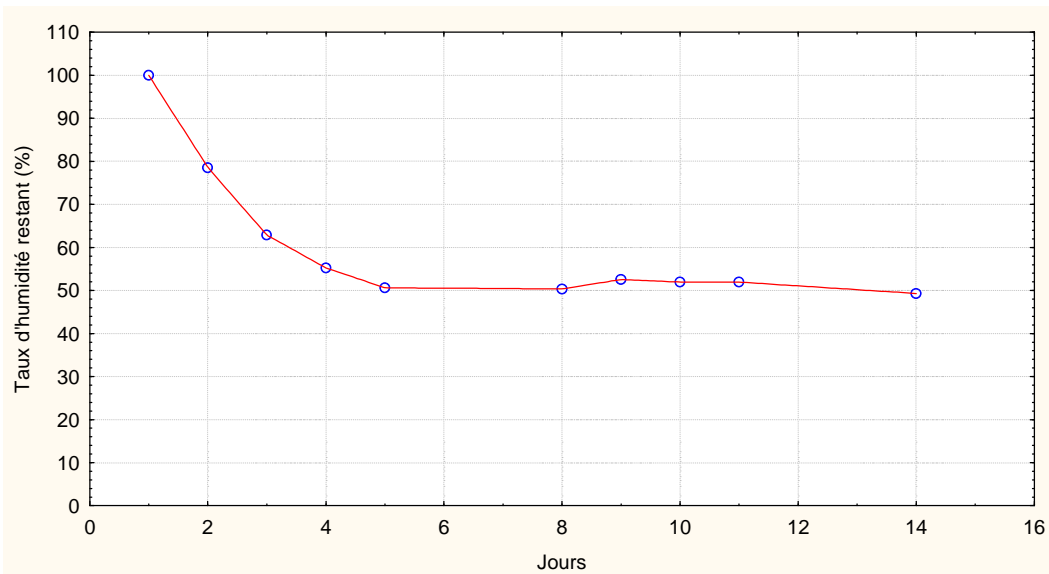


Figure 3.1 : Variation du taux d'humidité restant dans la plante en fonction du temps.

3- Etudes statistiques des résultats du plan d'expérience

Le Tableau 3.2 représente la matrice d'expériences ainsi que les résultats obtenus après l'extraction. Les facteurs étudiés sont exprimés en valeurs codées.

Tableau 3.2 : Matrice du plan factoriel et les réponses enregistrées

N° d'essais	Temps	Altitude	Forme	Rendement
1	-1	basse	Non broyée	0,0159
2	1	basse	Non broyée	0,096
3	-1	haute	Non broyée	0,0186
4	1	haute	Non broyée	0,19
5	-1	basse	Broyée	0,08
6	1	basse	Broyée	0,15
7	-1	haute	Broyée	0,099
8	1	haute	Broyée	0,1706
9	0	haute	Broyée	0,157
10	0	haute	Broyée	0,159
11	0	haute	Broyée	0,147

3-1 Validation du modèle

Pour valider le modèle obtenu dans le domaine étudié, Il faut commencer par vérifier l'adéquation du modèle mathématique, ensuite l'analyse des coefficients du modèle qui permet de déterminer les facteurs significatifs ainsi que les interactions pour pouvoir écrire l'équation du modèle puis l'analyse de la variance et enfin la vérification des résidus.

3-1.1 Adéquation du modèle

L'adéquation du modèle nous permet de voir si les valeurs expérimentales se rapprochent des valeurs théoriques estimées par la matrice. La qualité du modèle polynomial est vérifiée par le coefficient de détermination multiple R^2 et Q^2 qui représentent la capacité du modèle à prédire la réponse. R^2 mesure l'ajustement de la réponse, plus il est élevé plus le modèle est meilleur et Q^2 traduit la capacité du modèle à traduire la réponse, plus il est supérieur à 0.5 plus le modèle peut prédire la réponse.

Pour dire que le modèle utilisé est adéquat il faut que $R^2 > 0.8$ et $Q^2 > 0.5$ et les résultats comme suit : $R^2 = 0.955$, $Q^2 = 0.540$, d'où l'adéquation du modèle.

La figure 3.2 donne une première évaluation du modèle et nous remarquons une dispersion homogène rapprochée de la droite de régression. (R^2 et Q^2)

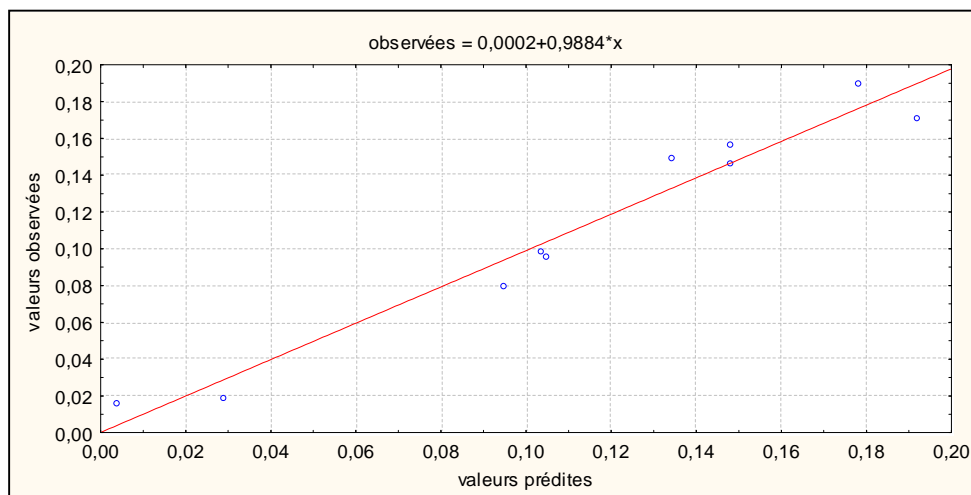


Figure 3.2 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées

3-1.2 Facteurs significatifs

Un facteur est dit significatif lorsque la barre verticale (son intervalle de confiance) ne coupe pas l'axe horizontal. Quand la barre verticale est au-dessus de l'horizontale on dit alors que le facteur influe positivement, si la barre est en dessous alors le facteur influe négativement.

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs sont : le temps d'extraction, l'altitude et que de la forme végétale.

L'influence des facteurs et leurs interactions sur la réponse sont illustrées dans la figure 3.3.

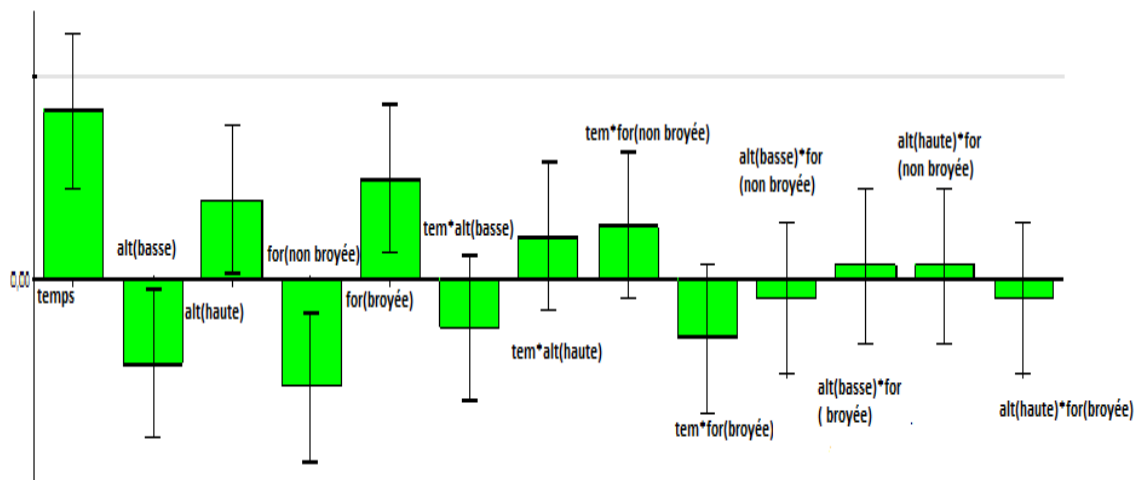


Figure 3.3 : Histogramme de l'influence des coefficients sur le rendement

A partir de l'histogramme illustré dans la figure 3.3 nous déduisons que la durée d'extraction, la forme de la plante et la localisation de la plante influent différemment sur le rendement d'extraction :

• Temps d'extraction

Ce paramètre influe positivement sur la réponse. En effet le rendement est meilleur quand le temps augmente. Globalement la littérature fixe un temps maximal de 3 heures durant lequel plusieurs types de molécules (de la plus volatiles à la plus lourde constituant l'HE) sont extraites O.Aissi et al (2016). Ce temps répond à un consensus entre la qualité et la quantité de l'huile extraite [29].

• Forme de la plante

La forme broyée influe positivement sur le rendement contrairement à la forme non broyée, cette différence s'explique par la localisation de l'huile essentielle dans les glandes sécrétrices androgènes. La forme broyée favorise une meilleure surface de contact entre l'eau et la plante ; l'HE n'a pas besoin de passer à travers le tissu végétal [30].

• Altitude

L'altitude de la station de récolte influe sur le rendement, ceci est probablement dû aux facteurs environnementaux, climatiques, géographiques et la nature du sol. Ce dernier peut justifier l'influence positive de la haute altitude (air montagnard) contrairement à la basse altitude (air marin) vu la salinité élevée du sol de cette dernière induisant l'augmentation du stress hydrique par conséquent la diminution du rendement en HE.

3-1.3 Analyse de la variance

Les modèles avec un $p < 0.05$ (probabilité nulle ou peu significative), met en évidence le grand impact et l'influence que possèdent ces facteurs sur le rendement.

La valeur F de Fisher est déterminée par le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Cette première nous permet de calculer la probabilité de l'inégalité de ces deux carrés.

Si $F_{obs} > F_{crit}$ alors les variations des réponses estimées sont directement liées aux variations des facteurs ce qui indique la validité du modèle étudié.

Le tableau 3.3 de l'analyse de la variance (ANOVA) donne :

$p = 0.012 < 0.05$ ce qui implique la non signification des résidus sur les résultats obtenus $F_{obs} = 14.058$, $F_{crit}(\text{régression, résidus}) = F(6,4) = 4.534$, $F_{obs} > F_{crit}$ avec un intervalle de confiance $\alpha = 0.05$

Tableau 3.3 : Analyse de la variance donnée par MODDE 6.0

	Somme des carrés	DDL	Carrés moyen	F_{obs}	F_{crit}	P
Régression	0,0339799	6	0,00566332	14.058	4.534	0.012
résidus	0,00161141	4	0,000402853			
total	0,0355913	10	0,00355913			

3-1.4 Etude des résidus

Afin d'avoir une analyse complète du modèle, la distribution homogène des résidus est alors vérifiée. Le modèle est statistiquement validé si la distribution des résidus est aléatoire. La figure 3.4 présente l'évolution des résidus estimés en fonction des réponses prévues par le modèle. La répartition des points est alignée aléatoirement le long d'une droite horizontale, ceci prouve que les résidus sont normalement distribués et que le modèle est validé.

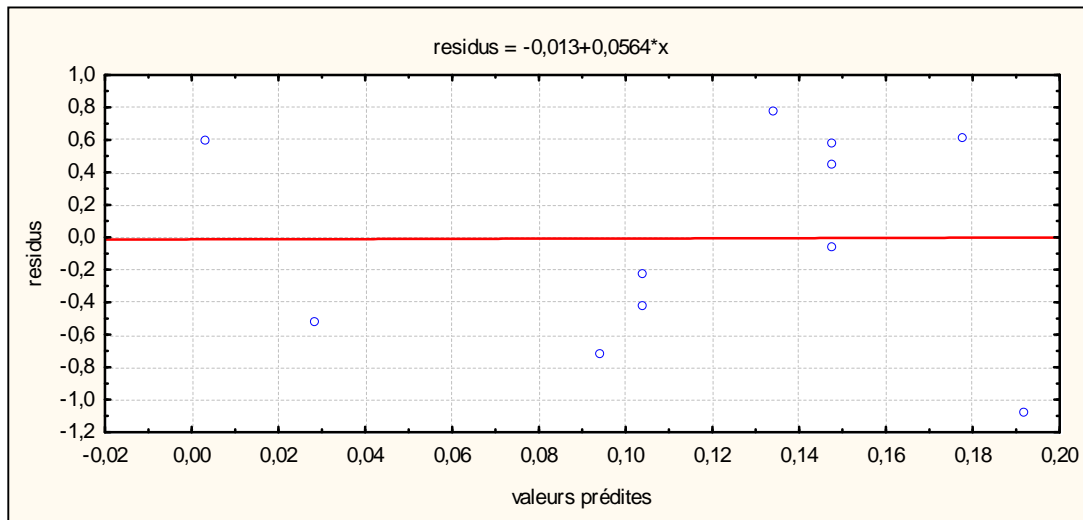


Figure 3.4 : Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues

3-2 Modélisation de la réponse à l’aide du logiciel MODDE 6.0

A partir des différents points vérifiés, nous pouvons dire que le modèle utilisé est validé.

Au seuil de signification de 5%, le modèle peut être décrit par l’équation suivante :

$$R\% = 0,117424 + (0,0415701 * \text{temps}) + (0,0197919 * \text{haute altitude}) + (0,025325 * \text{forme broyée}) - (0,0197919 * \text{basse altitude}) - (0,025325 * \text{forme non broyée}) \dots \text{ (3.1)}$$

3-3 Phase de l’optimisation

Pour obtenir le rendement d’extraction optimal, nous avons utilisé le module OPTIMIZER du logiciel MODDE 6.0.

Les propriétés désirées pour le R% sont représentées dans le tableau 3.4 :

Tableau 3.4 : Valeur souhaitée pour un rendement optimal

Réponse	Critère	Valeur cible	Min
Rendement R%	Maximum	0,188272	0,17077

Le tableau (3.5) l’optimum obtenu par le modde.6.0

Tableau 3.5 : Solutions proposées par le logiciel MODDE 6.0

Temps	Altitude	Forme	Rendement	Log D	Solution
3h	Haute	Broyée	0,1922	-10	(1)
3h	Haute	Non broyée	0,1781	-0,4698	(2)

Parmi les deux solutions données par le logiciel, le choix s'est porté sur la solution 1. En effet, il est apparent que pour la même durée d'extraction et la même zone de récolte (haute altitude) le rendement est nettement supérieur pour la forme broyée. Par ailleurs, il faut noter que pour la forme broyée le nettoyage du ballon utilisé pour l'extraction est beaucoup plus facile ce qui permet un gain de temps considérable.

Le rendement trouvé expérimentalement dans les conditions optimales est de 0.22% qui est proche de celui donné par le logiciel (0.1922%). Notre résultat est plus élevé par rapport à celui trouvé par Benhamou (2006) qui est de l'ordre de 0.07%, et proche de 0.16% obtenu par Bammou et al (2015). Parmi les paramètres à l'origine de ce décalage nous citons la station (EST et OUEST) et la période de récolte, la technique de distillation [26].

4- Influence du séchage sur le rendement d'extraction

L'étude de ce facteur nous renseigne sur l'influence de la teneur en eau de la plante sur le rendement d'extraction en HE.

Le principe consiste à extraire l'HE de la matière fraîche au lieu de la matière sèche, en utilisant les conditions optimales obtenues précédemment par la méthodologie des plans d'expérience.

Les résultats obtenus (tableau 3.6) indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle à partir de la plante fraîche est nettement inférieur à celui obtenu à partir de la plante sèche, ce qui confirme l'influence du séchage sur le rendement d'extraction.

Tableau 3.6 : Résultat de l'étude du facteur séchage

Taux d'humidité	Temps d'extraction	Altitude	Forme végétale	Rendement %
Sèche	3h	Haute	Broyée	0.1922
Fraîche	3h	Haute	Broyée	0.123

L'influence positive du séchage sur le rendement s'explique par une activité physiologique importante (réaction enzymatique importante) [31]. Après la récolte, la plante continue à vivre et son activité de biosynthèse des HE s'accélère l'utilisant comme moyen de défense contre le manque hydrique [32].

5- Caractéristiques de l'HE

Les caractéristiques de l'HE extraite sont identiques à celles cités dans la monographie [9] résumés dans le tableau 3.7:

Tableau 3.7 : Caractéristiques physiques de l'HE du lentisque

	HE extraites (haute et basse)	Monographie
Densité à 20°C	0.875	0.850 - 0.875
Indice de réfraction 20°C	1.485	1,475 - 1,485
Aspect	Liquide, limpide	liquide limpide
Couleur	Jaune pâle	jaune pâle
Odeur	forte et herbacée	fortes et herbacées

6- Caractérisation des HEs par CPG/SM :

L'analyse par CPG-SM des HEs haute et basse altitude a permis d'enregistrer leurs chromatogrammes (annexe 3) et d'identifier leurs constituants, le tableau 3.8 regroupe les compositions des deux HEs :

Tableau 3.8 : Composition chimique de l'HE des deux zones de récolte

N	Composé	Basse altitude		haute altitude	
		IK	%	IK	%
1	Tricyclène	919	1.11	919	0.35%
2	α -thujène	924	0.48%	924	0.24%
3	α -pinène	935	20.89%	933	16.87%
4	Camphène	946	3.29%	954	1.42%
5	Sabinène	973	1.21%	971	4.93%
6	β -pinène	976	12.86 %	974	6.67%
7	β -myrcène	989	2.51%	989	1.44%
8	α - phellandrène	1000	0.92%	1002	7.94%
9	α -terpinène	1014	3.65%	1013	1.93%
10	o-cymène	1021	tr	1022	1.95%
11	β -terpinène	1028	7.82%	1027	8.56%
12	β -ocymène	1046	0.29%	1046	0.12%
13	γ -terpinène	1057	5.61%	1056	3%
14	α -terpinolène	1084	2.19%	1084	1.18%
15	2-nonanone	1088	0.25%	1088	0.24%
16	Linalool	1096	0.25%	1097	0.13%
17	Nonanal	1099	0.18%	1100	0.12%
18	fenchyl alcool	1108	0.14%	1108	0.06%
19	Cis-p-menth-2-en-ol -	1116	0.13%	1117	0.13%
20	campholène aldehyde	1121	0.05%	-	-
21	terpinène 1-ol	1135	0.19%	1135	0.12%
22	Pinocarvone	1158	0.06%	1159	tr

23	Bornéol	1163	0.23%	1162	0.12%
24	terpinène 4-ol	1177	9.32%	1175	5.21%
25	Cryptone	1183	0.17%	1183	0.11%
26	α -terpineol	1189	3.19%	1188	1.58%
27	Myrtenol	1193	0.21%	1192	0.13%
28	3-methylbutylhexanoate	1249	0.17%	1250	0.34%
29	Phellandral	1271	0.08%	-	-
30	Vitispirane	1275	0.06%	-	-
31	bornyl acetate	1283	3.96%	1282	0.47%
32	methyl nonyl ketone / 2-undecanone	1290	0.44%	1290	0.7%
33	δ -elemène	1297	0.09%	1297	0.15%
34	α -copaène	1373	0.08%	1374	1.09%
35	B-boubonène	-	-	1383	0.05%
36	β -elemene	1390	0.10%	1388	0.58%
37	trans-caryophyllène	1421	7.92%	1420	5.86%
38	β -cubebene	1428	0.05%	1428	0.11%
39	α -cubebene	1435	0.16%	-	-
40	α humulène	1453	1.38%	1454	1.88%
41	Aromadendrène	1460	0.14%	1461	0.51%
42	NI	-	-	1474	0.60%
43	γ -murolène	1476	0.27%	1478	1.68%
44	D germacrène	1481	1.72%	1483	6.58%
45	Bicyclogermacrène	1496	0.6%	1493	1.02%
46	α -murolène	1499	0.28%	1500	1.15%
47	NI	1506	0.52%	1507	0.46%
48	α -amorphène	1514	0.18%	1515	0.44%
49	δ -cadinène	1523	1.02%	1525	4.61%
50	cadina-1,4-diène	1532	0.06%	1533	0.31%
51	α -cadinène	1538	0.06%	1538	0.10%
52	B germacrène	1558	0.05%	-	-
53	Nerolidol	1563	0.12%	1565	tr
54	(Z)-3-hexen-1-ol benzoate	1571	0.15%	-	-
55	Spatulenol	1579	0.27%	1581	0,05
56	caryophyllène oxide	1585	0.36%	1585	0.68%
57	Viridiflorol	1594	0.09%	-	-
58	Ylangène	-	-	1611	0.1%
59	Cadina-1,4-diène	1634	0.09%	1631	0.68%
60	tau murolol	1644	0.59%	1645	1.88%
61	α -cadinol	1657	0.60%	1658	1.06%

(IK : indice de Kovats, % : pourcentage de présence, tr : état de trace < 0.05, NI : non identifié)

L'analyse effectuée nous a permis d'identifier 58 et 54 constituants respectivement pour la région basse altitude et haute altitude. Les douze constituants majoritaires contenus dans l'HE extraite de la plante basse altitude sont : α -pinène (20.89%), le β -pinène (12.86%), le Camphène (3.29%), le β -myrcène (2.51%), le α -terpinène (3.65%), le β -terpinène (7.82%), le γ -terpinène (5.61%), le α -terpinolène (2.19%), le terpinène 4-ol (9.32%), le α -terpineol (3.19%), le bornyl acetate (3.96%), le trans-caryophyllène (7.92%). Quant à l'huile essentielle de la région à haute altitude (Ouadias), elle renferme principalement α -pinène (16.87%), le Sabinène (4.93%), β -pinène (6.67%), le α -phellandrène (7.94%), le β -terpinène (8.56%), le γ -terpinène (3%), le terpinène 4-ol (5.21%), le trans-caryophyllène (5.86%), le D germacrène (6.58%), le δ -cadinène (4.61%). L'HE de basse altitude contient une quantité plus élevée en α -pinène que l'HE à haute altitude (tableau 3.8).

Des différences entre les compositions des HEs des deux régions sont observées. Certains composés sont présents dans l'HE à provenance de haute altitude mais absents dans celle à provenance de basse altitude, et réciproquement. Il s'agit essentiellement de α -cubebene (0.16 %), (Z)-3-hexen-1-ol benzoate (0.15 %), Viridiflorol (0.09 %) et Ylangène (0.1%).

En étudiant l'HE du *P. Lentiscus* en provenance de Tlemcen, N.Benhammou (2006) a montré qu'elle est dominée par le α -pinène le même composé étant majoritaire pour nos plantes, ceci confirme que les compositions des deux plantes (Ouest et centre Est) sont proches. Barrero et al (2005) ont montré que l'espèce terpénique prédominante étant le terpinen-4-ol (21.7%), alors que pour le même constituant son pourcentage est de 9.319% pour l'HE extrait de la plante haute altitude et est de 5.212% pour l'HE basse altitude.

Le tableau 3.9 montre le pourcentage des monoterpènes et sesquiterpènes présents dans chaque huile essentielle étudiée :

Tableau 3.9 : Composition globale des deux huiles essentielles extraites

	Basse altitude	Haute altitude
Monoterpènes	72.69 %	70.39 %
Sesquiterpènes	8.25 %	24.06 %
Total	80.94%	94.45 %
Autres	19.06 %	5.55 %

Il est apparent, que l'huile essentielle de haute altitude contient plus de terpènes (monoterpènes et sesquiterpènes) que l'huile essentielle de basse altitude.

La haute teneur en α -pinène dans les deux HEs à provenance différente laisse supposer la présence que d'un seul chimiotype, qui est le chimiotype à α -pinène.

En comparant nos résultats et ceux de la littérature, on constate une très grande variabilité chimique des huiles essentielles extraite du *P. Lentiscus*. Cela confirme l'impact de nombreux facteurs sur la qualité des huiles essentielles : provenance, conditions environnementales (température, luminosité, pluviométrie) et édaphiques [33].

7- Contrôle qualité du cérat :

Les résultats sont figurés dans le tableau 3.10 :

Tableau 3.10 : Tests de contrôle du cérat :

Examen macroscopique	examen microscopique	Mesure de PH
<ul style="list-style-type: none"> - Couleur : jaune (la couleur de la cire d'abeille). - Odeur : l'odeur de l'HE du lentisque. - Bonne homogénéité, consistance d'une pommade - Test d'étalement : absence d'agrégats visible à l'œil nu - Bonne diffusion à travers la peau 	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne dispersion (images figurées dans l'annexe.) -Taille des gouttelettes : homogènes. 	PH= 7.03

8- Evaluation de la bio-activité de l'HE

8-1 Activité anti-inflammatoire :

L'étude de l'activité anti inflammatoire de l'HE du lentisque, porté par l'œdème de l'oreille induit par xylène chez les souris, est basée sur la comparaison de la moyenne de la différence entre les poids des OT et ONT des lots test par rapport à celles des deux lots témoins. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (3.11)

Tableau 3.11 : Résultats obtenus pour chaque lot

Lots	T (-)	T (+)	Essaie HE brut	Essaie du cérat 1%	Essaie du placebo	Essaie H.A.D
Poids d'œdème moyen	1.93 mg	0.94 mg	1.27 mg	0.39 mg	0.65 mg	0.73mg
Pourcentage de réduction d'œdème		51.29%	34.19%	80.21%	66.29 %	62.17%
P value		0.031 (significatif)	0.17 (non significatif)	0.0054 (très significatif)	0.0047 (très significatif)	/

Les résultats du tableau 3.11 montrent que l'HE considérée seule n'a pas un effet anti-inflammatoire significatif (34.19%) devant celui du Diclofénac 1% (51.29%). Contrairement à l'effet du produit cérat 1% (80.21%) qui est largement supérieur à l'effet du produit de référence. Afin d'expliquer cela, l'essai du placebo a été de rigueur, donnant un effet de 66.29%. Pour comprendre cette différence inattendue, l'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'huile d'amande douce (H. D. A) a été vérifié donnant un résultat de 62.17%. Il est vrai que l'HE n'a qu'un léger effet sur l'œdème, mais étant combinée à de l'H.A. D, elle améliore nettement l'effet de cette dernière passant de 66.29 % à 80.21%.

Par conséquent, l'utilisation de l'H.A. D ne peut être prise comme excipient, mais comme principe actif. Par ailleurs, comparé à l'effet anti-inflammatoire de l'huile fixe de la même plante (61.95 %), l'effet anti-inflammatoire, de l'HE du lentisque est faible [19].

8-2 Activité antioxydante

Les absorbances et pourcentages d'inhibition de cette étude sont illustrés dans les tableaux (3.12, 3.13).

Tableau 3.12 : Valeurs des absorbances des HEs et pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations

Echantillons	HE des Ouadias			HE d'Azeffoune		
	200	100	50	200	100	50
[C] : mg/ml						
A _e	0.0986	0.991	1.144	0.781	0.817	0.750
A _b	0.901	1.1	1.1	0.998	0.977	0.869
I%	89.05	9.90	-4	21.74	16.37	13.69

A_e : Absorbance de l'échantillon, A_b : Absorbance du DPPH, I% : pourcentage d'inhibition

Tableau 3.13 : Valeurs des absorbances de l'acides ascorbique et pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations

Echantillons [C] : mg/ml	Acide ascorbique				
	1	0.75	0.5	0.25	0.125
A_e	0.039	0.038	0.138	0.182	0.500
A_b	0.977	0.950	0.820	0.820	0.820
I%	96	96	83.53	77.8	39.02

Le pourcentage d'inhibition, de l'HE issue de la zone de récolte à basse altitude, I%= 21.74% est inférieur à 50%, par conséquent, elle n'a aucune activité antioxydante par rapport à HE issue de la zone de récolte à haute altitude, avec un pourcentage d'inhibition de I%= 89.05%. Ces résultats sont obtenus pour les mêmes concentrations d'HE.

Les figures (3.5) et (3.6) représentent les pourcentages d'inhibition I% en fonction des concentrations des HEs et du témoin de référence (acide ascorbique).

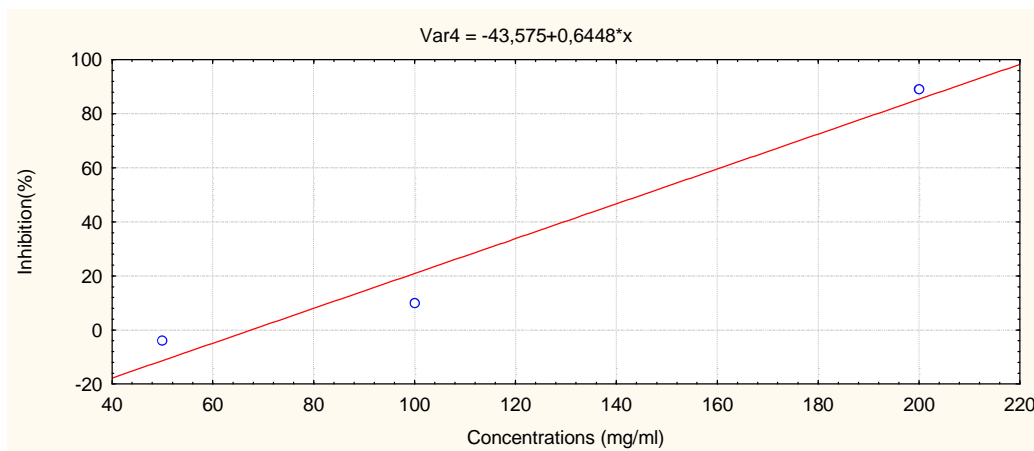


Figure 3.5 : Pourcentage d'inhibition d'HE du Pistacia L. haute altitude en fonction des concentrations

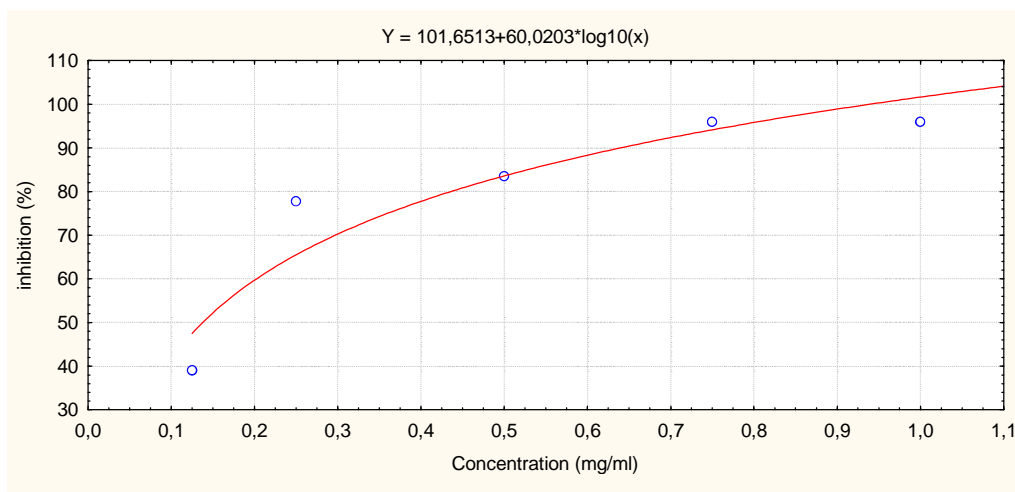


Figure 3.6 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction des concentrations.

A partir de ces graphes les concentrations de neutralisation à 50% ont été déterminés, les résultats sont mentionnés dans le tableau (3.14) :

Tableau 3.14 : Valeurs des IC_{50} de l'HE haute altitude et de l'acide ascorbique

Echantillons	IC_{50}
HE haute altitude (Ouadias)	145.12mg/mL
Acide ascorbique	0.138mg/mL

L'HE de haute altitude est capable de réduire le radical libre DPPH ceci a induit expérimentalement un changement de couleur allant du violet (couleur de DPPH) vers la couleur jaune (disparition du DPPH), et aussi la valeur de IC_{50} pour l'acide ascorbique ($IC_{50}= 0.138\text{mg/mL}$) montre un pouvoir antioxydant plus élevé car pour une faible concentration, l'effet antioxydant est obtenu, contrairement à l'HE à provenance de haute altitude qui pour avoir un effet antioxydant, la concentration minimale a dû être près de trois fois plus élevée que celle de l'acide ascorbique ($IC_{50}=145.12\text{mg/mL}$). Ceci montre que l'effet antioxydant de cette HE n'est pas significatif devant celui de l'acide ascorbique ($p > 0.05$; $p = 0.14$), mais cela n'exclut pas la présence de l'effet antioxydant de l'HE. Comparativement à la littérature, nos résultats sont inférieurs à ceux de BEN HAMMOU et al (2006) qui ont trouvé IC_{50} de l'ordre de 15.63mg/mL . La variation du résultat peut être attribuée au chimiotype de la plante, en effet une même espèce botanique peut fournir différentes huiles essentielles et par conséquent différents constituants de ces dernières [23].

La différence obtenue est tout à fait logique, vu la différence constitutionnelle chimique des deux HE. Le tableau précédent (3.9) a montré une forte teneur en terpènes pour l'HE

des Ouadias (94.45 %) devant ceux comportés par l'HE d'Azeffoune (80.94%). Les terpènes, plus précisément les monoterpènes et les sesquiterpènes, sont les composés principaux doués d'effets antioxydants, comme il est démontré par l'étude de J.Grabmann (2005). Ceci peut expliquer la présence de l'activité antioxydante de l'HE des Ouadias, et non de l'HE d'Azeffoune.

8-3 Activité antibactérienne

Dans la présente étude nous nous sommes intéressées à évaluer qualitativement l'activité antibactérienne de l'HE de *Pistacia lentiscus* des deux stations par la méthode de diffusion sur disque.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 3.15 : Diamètres d'inhibition des HEs

Souches	HE Pistacia L. Haute Altitude	HE Pistacia L. Basse Altitude
<i>Escherichia coli</i>	0mm	0mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	13mm	10mm

La comparaison des activités de cette HE des deux régions révèle une sensibilité plus ou moins légère vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* à 5 μ L.

Il apparait que cette activité est élevée dans le cas de l'HE de P.L des Ouadias (haute altitude) avec un diamètre de zone d'inhibition de 13mm. Les HEs semblent inactives vis-à-vis de la souche à Gram (-) ; autrement dit *Escherichia coli* est caractérisée par une résistance contre cette huile.

Pour la même quantité d'HE (5 μ L) Ben Hammou et al (2006) et Bammou et al (2015) ont obtenu un diamètre d'inhibition de 10 mm et ont conclu que l'HE de *Pistacia lentiscus* n'a aucune activité contre *Escherichia coli* et une activité modérée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, cette conclusion concorde parfaitement avec nos résultats.

L'efficacité différente que présente l'effet antibactérien de l'HE extraite de la plante haute altitude, par rapport à celui de l'HE extraite de la plante basse altitude, est expliqué par la variation de la teneur en terpénols dans chacune des huiles. Les terpénols sont identifiés parmi les composés donnant un effet antibactérien [34]. Vu leur faible proportion dans nos échantillons, la faible activité antibactérienne observée est justifiée.

CONCLUSION

Dans cette étude, deux axes de recherches sont considérés, le premier concerne la détermination du rendement optimal d'extraction de l'huile essentielle du *Pistacia lentiscus*. Par la méthodologie des plans d'expérience, trois facteurs influent le rendement sont examinés, l'altitude de la station de récolte, la plante est récoltée au centre-Est de l'Algérie, le choix s'est porté sur Azeffoune, Sidi Khelifa pour la basse altitude et Ouadias, Agouni Gueghrane pour la haute altitude, la forme broyée ou non broyée du végétal et la durée d'extraction. Un quatrième paramètre n'entrant pas dans la matrice de la méthodologie d'optimisation, le taux d'humidité contenu dans la plante est également étudié.

Le rendement optimal correspondant à la meilleure teneur (0.22 %) en huile essentielle est obtenu dans les conditions suivantes :

- Altitude de la zone de récolte : haute (Ouadias, Agouni Gueghrane)
- La forme végétale : broyée
- Le temps d'extraction : 3h
- Etat de la plante : sèche (± 50 % restant)

Le second axe traite l'étude des profils chimiques, pharmacologiques et biologiques de l'huile essentielle extraite du *Pistacia lentiscus*. L'analyse qualitative et quantitative CPG/SM des deux lots d'huiles essentielles a permis d'identifier le composé majoritaire en commun, l' α -pinène (20.89% ; 16.87%) pour basse altitude et haute altitude respectivement. Cette première provenance présente aussi le β -pinène (12.86%) avec une teneur importante et le terpinène 4-ol (9.32%) avec une teneur appréciable. Par contre, la dernière provenance présente le phellandréne (7.94%) et le β -terpinène (8.56%) avec une teneur acceptable.

La différence de rendement et de composition chimique des deux lots analysés peut être attribuée à plusieurs facteurs tels les caractéristiques des conditions climatiques et édaphiques typiques de chaque région.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré que le mélange de 50/50 des deux huiles essentielles ne présente pas d'effet (34.19%), mais l'effet devient significatif (80.21%) en combinant le mélange à de l'huile d'amande douce. L'étude de l'activité antioxydante des deux huiles essentielles a montré que l'huile extraite de la plante haute altitude a un effet antioxydant contrairement à celle extraite de la plante basse altitude. Le test antibactérien a prouvé que les

deux huiles essentielles ont une activité sur *Staphylococcus aureus*, mais aucune activité sur l'*Escherichia coli*.

Perspectives

- 1- Etudier l'effet anti-inflammatoire des différents lots d'HE séparément,
- 2- Identifier avec précision les composés chimiques responsables de l'effet anti-inflammatoire, antioxydant et antibactérien
- 3- Etude de la toxicité de l'HE de lentisque et identifier le/les composés responsable,
- 4- S'intéresser à d'autres effets pharmacologiques de cette HE telle que l'effet anti-cancéreux, photoprotecteur.

Bibliographie

- [1] : Pharmacopée française 1965
- [2] : ANTON R., LOBSTEIN A., TEUSCHER F., (2005). Plante aromatiques : épices, aromates, condiment et huile essentielle. Ed : Tec et doc. Paris : 521.
- [3] : ESSAWI T., SROUR M., (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharm. 70: 343-349
- [4] : Christine Kajdas , la flore électronique de Tela Botanica, Encyclopédie botanique, disponible sur <https://www.tela-botanica.org/>
- [5] : Ghadha Ben Salem, l'huile de lentisque dans l'Et algérien (2015) : caractérisatiques physico-chimique et composition en acide gras, thèse de magister, Université canstantine 1 : 45p
- [6] : SEIGUE A., (1985). Le foret circumméditerranéen et ses problèmes. Ed : Maisonneuve and larose Paris ,502p
- [7] : Abdelilah Boutayeb, études bibliographiques sur les huiles essentielles ey végétales, thèse de doctorat, université Ibn Tofail : 89p
- [8] : M.Bammou et al Valorisation du lentisque Pistacia lentiscus L.: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien, Journal of Applied Biosciences 86:7966–7975, (2015)
- [9] : l'aromathèque, Myrtea Formations, monographie huile essentielle Pistacia Lentiscus 2-4p
- [10] : Duval aurent, les huiles essentielles à l'officine, thèse de doctorat, UFR de medecine-pharmacie, Rouen (2012), p16.
- [11] : Daniel Festy, huiles essentielles, le guide Aroma indispensable, QUOTIDIEN MALIN édition, 17, rue du Regard 75006 Paris – France. P198
- [12] : Nabila Benhammou, Etudes des activités antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles et des composées phénoliques de Pistacia Lentiscus et Pistacia atlantica de la région de Tlemcen, mémoire de magister, université Aboubekr Belkaid. p12.

[13] : Mohandi Z, étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, thèse de doctorat, université Abou Berkr Belkaïde Tlemcen (2005). P89-92.

[14] : Wikipédia, Définition de l'indice de réfraction, Encyclopédie libre, disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/Indice_de_r%C3%A9fraction

[15] : Wikipédia, Définition de la densité relative, Encyclopédie libre, disponible sur <https://fr.wikipedia.org/wiki/Densit%C3%A9>

[16] : Julien Paolini, caractérisation des huiles essentielles par CPG-SM et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*, thèse de doctorat, université de Corse Pascal Paoli, (2015). p10.

[17] : Margaux Fresenais, nouvelles approches par SM pour la caractérisation de systèmes archéologique et application à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine, thèse de doctorat, Université de Strasbourg, école doctorale des sciences chimiques. (2015). p24.

[18] : Robin Deschepper, Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chimiotype en aromathérapie, université Aix Marseille (2017). p111.

[19] : Boufrik Amina et Chafaa Tiziri évaluation de la cytotoxicité et des activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne de l'huile fixe de *Pistacia Lentiscus*. Thèse de doctorat, USTHB (2018), p8.

[20] : Djennidi Habiba, Etude di Pistachier de l'Atlas : essais de germination, extraction des polyphénols et activité antibactérienne, mémoire de magister, Université Mohamed Kheider, Biskra (2012), p16.

[21] : BENBRINIS Soumia, Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*, mémoire de magister, UNIVERSITE FERHAT Abbas-SETIF, (2012). p2-4.

[22] : Christina Popovici et al, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de Génie Industriel (2009), p25-39.

[23] : Formulaire thérapeutique magistral. p.B-I-3.1

- [24] : Bouchard, les bonnes pratiques de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, enjeux défis et application Les presses de l'université Laval, p313.
- [25] : OMS, 1998. Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques, recueil de directives et autres documents, Genève, volume N°1, p278.
- [26] : Vivier.S, stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par élément finis. thèse de doctorat, université Lille 1, (2002) p89.
- [27] : Dr.Yaliaoui idris, les plans d'expériences, initiation à la construction et l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré, université A.MIRA-Béjaia, (2015). p26-46.
- [28] : O.Aissi et al, essential oil composition in natural population of Pistacia Lentiscus from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities, Industrial Crops and Products 91: (2016) 56–65.
- [29] : Toudert Karima, extraction et caractérisation des huiles essentielles de 10 plantes provenant de la Kabylie, thèse de doctorat, UMMTO (2015) , p52.
- [30] : M.B.Goudjil et al Détermination expérimentale et la cinétique de séchage à l'ombre des HE de Laurus Nobilis Lauracene, Annales des sciences et technologie Vol. 7, N° 1 (2015). p54-56.
- [31] : M.fadil et al, Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de Rosmarinus officinalis L. par la méthodologie de surface de réponse, J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) (2015). p2346-2357.
- [32] : S.O.S. Hassane et al, Composition chimique et bioactivité des huiles essentielles de deux provenances d'Ocimum canum S. de l'île de la Grande Comore, Article original Pharmacologie Phytothérapie (2011) 9: 18–24.
- [33] : C.Ourida, composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Glycyrrhiza glabra, thèse doctorat, université d'Oran (2012), p92
- [34] : BELFADEL Fatima Zohra, Huile de fruits de Pistacia lentiscus Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat), mémoire de magister, UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE (2009), p121.

Annexe 1 : protocoles des tests photochimiques (selon la méthode de Magiatis et al)

1-Identification des Saponosides

2ml de l'infusé sont prélevés puis agités pendant 15s, le mélange est laissé au repos pendant 20min. La présence des Saponosides est évaluée par la persistance et l'apparition de la mousse.

2- Identification des tanins

5ml de l'infusé sont prélevés et additionnés par une à deux gouttes de de solution de FeCl₃ à 5%. L'apparition d'une coloration bleue-noire ou bleue- verte indique leur présence.

3- Identification des flavonoïdes

2ml de l'infusé sont prélevés et additionnés à 4ml d'éthanol et 1ml HCl suivi d'ajouts de coupons de Mg. La présence des flavonoïdes est indiquée par une coloration rouge-orangée.

4- Identification des anthocyanes

5 ml d'infusé sont prélevés puis quelques gouttes d'HCl y sont ajoutés. L'apparition d'une couleur rouge orangée témoigne la présence des anthocyanes.

5- Identification des alcaloïdes

La première étape consiste à préparer une macération. 25ml de H₂SO₄ à 0.1% sont ajoutés à 5g de poudre végétale. Ce mélange est macéré pendant 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La deuxième étape consiste à filtrer la préparation et le filtrat obtenu est ajusté avec de l'eau distillée jusqu'obtention d'un volume de 10ml.

- **Test de Mayer** : 1ml du filtrat additionné à 5 gouttes du réactif de Meyer. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes.
- **Test de Wagner** : 1ml du filtrat additionné à 5 gouttes du réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité brun indique la présence des alcaloïdes.

Annexe 2 : Résultats des tests photochimiques

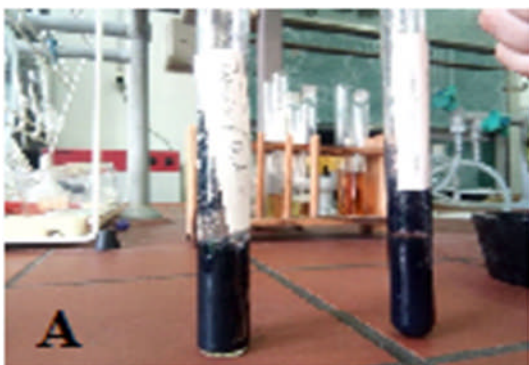


Figure 1.A : Identification des tanins

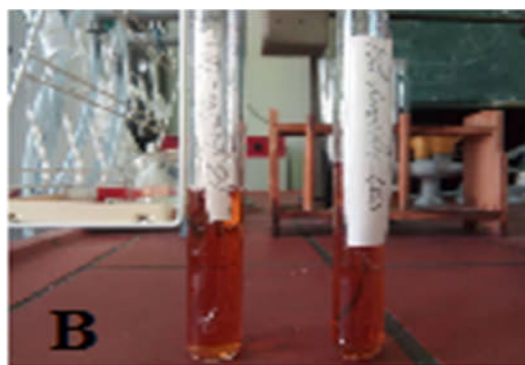


Figure 1.B: Identification des flavonoïdes

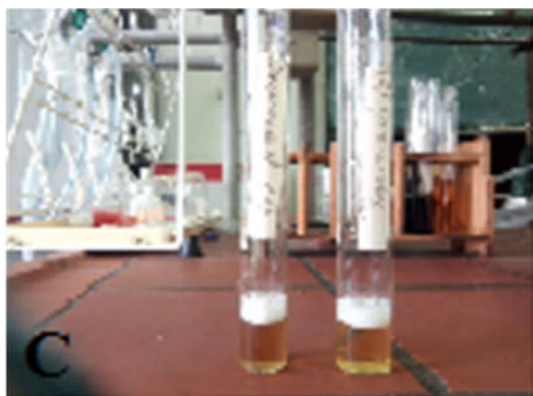


Figure 1.C : Identification des saponosides

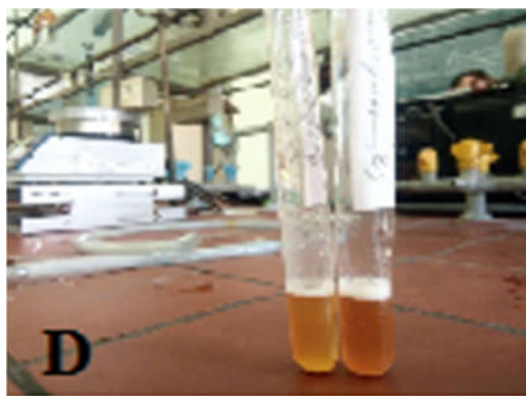


Figure 1.D : Identification des anthocyanes

Annexe 3 : Chromatogrammes des HE haute et basse altitude

Principe

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition, elle fournit le pourcentage de chaque composant d'un mélange complexe en donnant le temps de rétention de chacun. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane à température constante. (Indice de Kovats IK). Ils sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence. L'IK est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{IK = 100 * [t_r(z) - t_r(n) / t_r(n+i) - t_r(n)] + 100 \dots (1)}$$

Avec

$t_r(i)$: temps de rétention d'un composé i

$t_r(n)$: temps de rétention de l'alcane qui précède le composé i

$t_r(n+i)$: temps de rétention de l'alcane qui succède le composé i

L'utilisation d'un spectromètre de masse comme détecteur en chromatographie en phase gazeuse est, aujourd'hui, une technique de référence. En effet le couplage de la CPG-SM permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

Ci-dessous sont représentés les chromatogrammes obtenus pour les deux lots d'HE analysés :

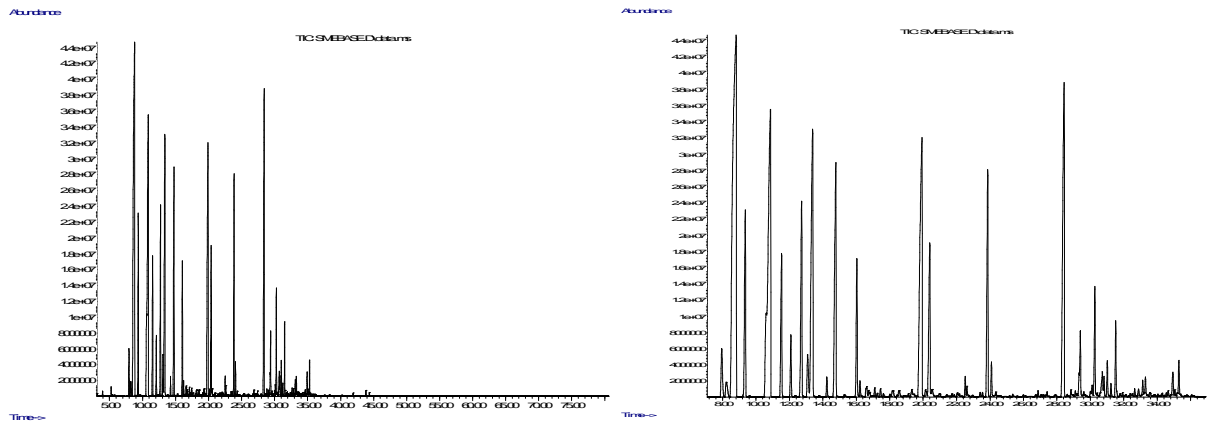


Figure 2.A : Chromatogrammes de l'HE à provenance de basse altitude

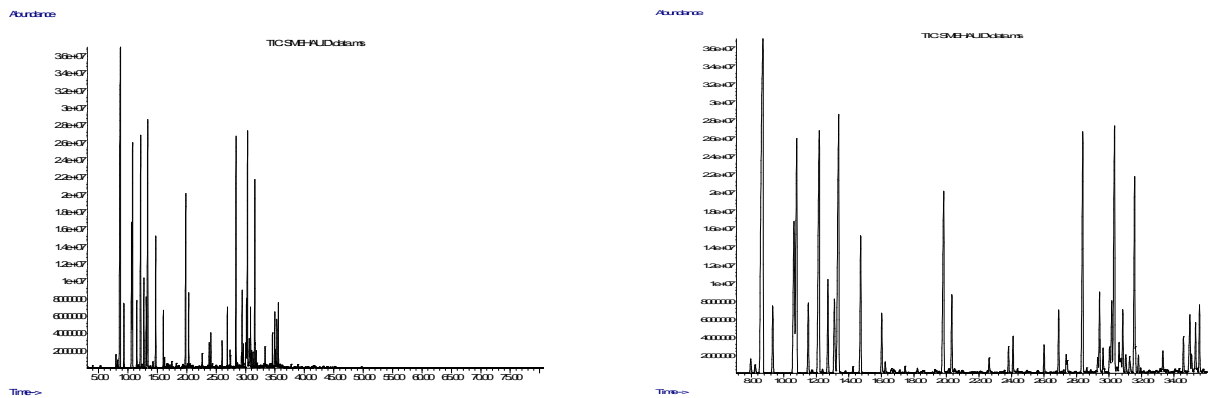


Figure 2.B : Chromatogramme de l'HE à provenance de haute altitude

ANNEXE.4 : Tailles des gouttelettes du cérat 1%



Figure 2 : Microscope SINAL



Figure 3.A : Zoom * 10 μ m

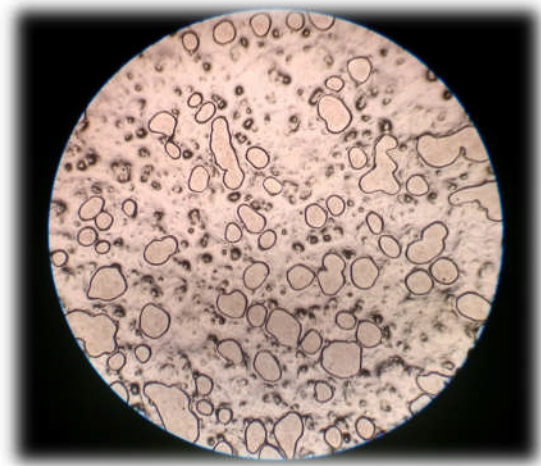


Figure 3.B : Zoom * 4 μ m

ANNEXE.5 : Matériel utilisé pour le test anti-inflammatoire



Figure 3.A : Marteau et emporte pièce



Figure 3.B : Ciseaux



Figure 3.C: Pince



Figure 3.D : Balance analytique

Annexe 6 : résultats de l'étude anti-inflammatoires

Tableau3.16 : Résultat du lot témoin négatif

lot T(-)	OD (mg)	ONT (mg)	différence (mg)
souris 1	2,9	2,1	0,8
souris 2	4,9	2,2	2,7
souris 3	2,5	1,9	0,6
souris 4	3,7	1,8	1,9
souris 5	3	2	1
souris 6	3,8	2,1	1,7
souris 7	6	2,9	3,1
souris 8	4,7	2	2,4
souris 9	6,8	2,8	4
souris 10	3,5	2,7	0,8

PM d'œdème témoin = 1.93mg

Tableau3.17 : Résultat du lot témoin positif

lot T(-)	OD (mg)	ONT (mg)	différence (mg)
souris 1	2,8	2,4	0,4
souris 2	4	2,3	1,7
souris 3	5	2,9	2,1
souris 4	3,2	2,6	0,6
souris 5	3,7	2,3	1,4
souris 6	3,9	2,5	1,4
souris 7	3,2	2,2	1
souris 8	2,4	2,4	0
souris 9	3,9	3,4	0,5
souris 10	3,3	3	0,3

Le PM d'œdème = 0.94
 Le % de réduction d'œdème = 51.29%

Tableau3.28 : Résultats du lot témoin test (HE du lentisque). **Tableau3.19** : Résultat du lot test (pf)

lot	OD (mg)	ONT (mg)	différence (mg)
souris 1	2,8	2,2	0,6
souris 2	5,4	2,8	2,6
souris 3	5,4	3,2	2,2
souris 4	4	2,6	1,4
souris 5	3,4	2,5	0,9
souris 6	3,1	2,8	0,3
souris 7	3,6	2,8	0,8
souris 8	3,3	2,6	0,7
souris 9	4,5	3,6	0,9
souris 10	4,8	2,5	2,3

PM d'œdème = 1.27mg
Le % de réduction d'œdème =34.19%

lot	OD (mg)	ONT (mg)	différence (mg)
souris 1	2,7	1,9	0,8
souris 2	2,3	1,4	0,9
souris 3	2,7	1,9	0,8
souris 4	2,2	2,2	0
souris 5	1,9	1,9	0
souris 6	2,1	2,5	-0,4
souris 7	2,2	4	-1,8
souris 8	3,1	1,8	1,3
souris 9	3,7	2	1,7
souris 10	2,3	1,7	0,6

PM d'œdème = 0.39
Le % de réduction d'œdème =80.21%

Tableau3.20 : résultats du lot test (placébo)

lot	OD (mg)	ONT (mg)	différence (mg)
souris 1	3,8	3,1	0,7
souris 2	3,5	2,4	1,1
souris 3	2,7	2	0,7
souris 4	2,9	2,2	0,7
souris 5	2,9	2	0,9
souris 6	2,6	1,3	1,3
souris 7	2,1	1,6	0,5
souris 8	3	2,4	0,6
souris 9	2,5	2,9	-0,4
souris 10	2,5	2,1	0,4

PM d'œdème = 0.65
Le % de réduction d'œdème =66.29%

Résumé :

Ce travail vise à déterminer, via la méthodologie des plans d'expérience, les facteurs influents sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle du Pistacia lentiscus récoltée au centre-Est de l'Algérie dans deux régions différentes ; « Azeffoune à basse altitude » et « Ouadias à haute altitude ». L'analyse CPG/SM des HEs extraites montre une différence dans la composition chimique des deux échantillons. Un cérat 1% est formulé à base d'un mélange de 50/50 des deux huiles essentielles extraites. Les tests pharmacologiques du produit brut à 50/50 montrent une activité anti-inflammatoire non significative comparée au cérat 1%. Le test antioxydant a montré que l'huile essentielle haute altitude présente un effet contrairement à celle de basse altitude. Les tests biologiques ont montré que les deux huiles essentielles présentent une activité antibactérienne contre les Staphylococcus aureus mais aucune activité contre l'Escherichia coli.

Mots clés : Extraction, hydrodistillation, huile essentielle, plans d'expérience, Pistacia lentiscus, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract:

This work aims to determine, via the experimental design methodology, the factors influencing the extraction yield of the essential oil of Pistacia lentiscus harvested in central-eastern Algeria in two different regions; "Azeffoune at low altitude" and "Ouadias at high altitude". GPC / MS analysis shows a difference in the chemical composition of the two samples. A 1% cerate is formulated based on a 50/50 mixture of the two extracted essential oils. The pharmacological tests of the crude product at 50/50 show an insignificant anti-inflammatory activity compared with the 1% cerate. The antioxidant test showed that the high altitude essential oil has an effect unlike the low altitude one. Biological tests have shown that both essential oils have antibacterial activity against Staphylococcus aureus but no activity against Escherichia coli.

Key words: Extraction, hydrodistillation, essential oil, experimental design, Pistacia lentiscus, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, anti-bacterial activity.

ملخص:

يهدف هذا العمل إلى تحديد، من خلال منهجية التصميم التجريبي، العوامل التي تؤثر على إنتاجية استخراج الزيت العطري من نبات الفستق الحلقي الذي يتم حصاده في وسط شرق الجزائر في منطقتين مختلفتين؛ "أزفون على علو منخفض" و "واضية على علو مرتفع". يظهر تحليل GPC / MS اختلافاً في التركيب الكيميائي للعينتين. صُنعت نسبة 1% على أساس مزيج 50/50 من الزيوت الأساسية المستخرجة. تظهر الاختبارات الدوائية للمنتج الخام في 50/50 نشاطاً ضئيلاً مضاداً للالتهابات مقارنةً بسرة 1%. أظهر اختبار مضادات الأكسدة أن الزيت العطري العالي الارتفاع له تأثير على عكس الارتفاع المنخفض واحد. أظهرت الاختبارات البيولوجية أن كلا الزيوت الأساسية لها نشاط مضاد للجراثيم ضد المكورات العنقودية الذهبية، ولكن لا يوجد نشاط ضد الإشريكية القولونية

الكلمات المفتاحية: الاستخلاص، التكسير المائي، الزيت العطري، التصميم التجريبي، الفستق الحلقي، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.