

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

UNIVERSITE DE MOULOU D MAMMERI DE TIZI TOUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE
MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

***Extraction et évaluation de l'activité antioxydante et
antimicrobienne de l'huile essentielle
du Pistacia Lentiscus***

Présenté par : ZERKEF MIRYAM

FENZI SABRINA

Soutenu publiquement, le 12 septembre 2021, devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Affiliation	Qualité
Mme Ighilahriz Karima	MCB	UMMTO	Présidente
Mr Layeb Hatem	MCB	UMMTO	Examineur
Mr Benchoulak Mounir	MAA	UMMTO	Encadreur
Mme Amroun Dyhia	LSP	CHU Tizi-Ouzou	Co-encadreur

Remerciement

*Nos vifs remerciements sont d'abord adressés à Monsieur le professeur **BENCHOULAK Mounir** qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail de recherche. Ses précieux conseils, sa bienveillance nous ont été d'une aide inestimable. Nous tenons à lui exprimer notre gratitude et notre profond respect.*

*Nous tenons également à exprimer notre très grande considération et notre profonde gratitude à Madame **AMROUN Dyhia**, d'avoir accepté de nous Co-encadrer et nous orienter pour la réalisation de ce travail.*

Nous tenons également à exprimer une reconnaissance aux membres du jury :

*A Madame **IGHIL-AHRIZ Karima** professeur à l'université de MOULOUD MAMMERY de Tizi-Ouzou.*

*A monsieur **LAYEB Hatem** professeur à l'université de MOULOUD MAMMERY de Tizi-Ouzou.*

Un immense merci au personnel de laboratoire de chimie pharmaceutique d'avoir été présents à nos côtés et nous a permis d'assurer la partie pratique. Nous adressons notre profonde reconnaissance pour leurs soutiens et leurs grandes gentillesse.

Nos remerciements vont à tous ceux et celles qui de loin ou de près, ont permis par leurs conseils et leur aide de réaliser ce mémoire. Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation.

Enfin, nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles et à nos amis qui ont su nous soutenir, nous encourager et nous aider tout au long des années.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.	Plantes aromatiques et plantes médicinales	1
1.1	Plantes aromatiques	1
1.2	Plantes médicinales	1
2	Etude botanique.....	1
2.1	Dénomination du Pistacia Lentiscus.....	1
2.2	Classification botanique du Pistacia Lentiscus.....	2
2.3.	Description du Lentisque	2
2.4	Habitat.....	3
3	Partie utilisée.....	3
4	Constituants phytochimiques du lentisque.....	3
4.1	Feuilles.....	3
4.2	Fruits	3
4.3	Résine.....	3
5	Métabolites secondaires	4
5.1	Composés phénoliques	4
5.1.1	Flavonoïdes.....	5
5.1.2	Tanins	5
5.2	Saponines	5
5.2.1	Stéroïdes	5
5.2.2	Terpénoïdes	6
5.3	Alcaloïdes	6
6	Utilisation traditionnelle.....	6
7	Huile essentielle	6
7.1	Définition.....	6
7.2	Aromathérapie	7

7.3	Répartition	7
7.4	Localisation.....	7
7.5	Propriétés physiques	7
7.6	Propriétés chimiques.....	7
7.6.1	Terpénoïde	8
7.6.2	Composés aromatiques.....	8
7.7	Mode d'application des huiles essentielles.....	8
7.8	Précautions d'usage des huiles essentielles	9
7.9	Conservation et stockage des huiles essentielles	9
7.10	Toxicité d'une huile essentielle	9
8	Utilisation de l'HE de lentisque	10
9	Activité antimicrobienne	10
10	Activité antioxydante.....	11
10.1	Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	11
11	Procédés d'extraction	12
11.1	Extraction par hydrodistillation ou distillation dans l'eau.....	12
11.2	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	12
11.3	Extraction sans solvant assistée par micro-onde (SFME)	12
11.4	Détente instantanée contrôlée (DIC).....	12

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE

1	Récolte.....	13
1.1	Zone d'étude de la plante.....	13
1.2	Période de la récolte.....	13
1.3	Identification de la plante.....	13
1.4	Conservation de la plante.....	13
1.5	Broyage.....	14
2	Mode d'extraction	14
3	Tests phytochimiques sur la plante du Pistacia Lentiscus.....	15
4	Paramètres intervenant dans le procédé d'extraction.....	17
4.1	Détermination du rendement de l'huile essentielle.....	17
4.2	Détermination des indices physicochimiques de l'HE extraite	17

4.2.1	Caractéristiques organoleptiques.....	17
4.2.2	Densité relative.....	18
4.2.3	Indice de réfraction.....	18
4.2.4	Indice d'acide.....	19
4.2.5	Indice d'ester.....	19
5	Evaluations antimicrobiennes de l'HE du Pistacia Lentiscus.....	20
5.1	Etude de l'activité antifongique.....	21
5.2	Etude de l'activité antibactérienne sur milieu gélosé.....	22
6	Etude de l'activité antioxydante.....	23
6.1	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	23

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1	Détermination du rendement de l'huile essentielle.....	26
2	Caractérisation organoleptique.....	26
3	Détermination des indices physico-chimiques.....	26
3.1	Indices physiques.....	26
3.1.1	Densité relative.....	26
3.1.2	Indice de réfraction.....	27
3.2	Indices chimiques.....	27
4	Tests phytochimiques.....	27
5	Evaluations antimicrobiennes de l'HE du Pistacia Lentiscus.....	28
6	Eude de l'activité antioxydante.....	30
6.1	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	30
	CONCLUSION	34
	BIBLIOGRAPHIE	
	ANNEXE	
	RESUME	

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac.Asc : Acide ascorbique

AFNOR : Association Française de Normalisation

C.albicans : Candida albicans

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DIC : Détente instantanée contrôlée

DPPH : 2,2-diphényl-1-propylhydrayl

E.coli : Escherichia coli

EOA : Espèces oxygénées actives

HE : Huile essentielle

MH : Muller-Hinton

PAM : Plantes aromatiques et médicinales

PI : Pourcentage d'inhibition

P.L : Pistacia Lentiscus

S.aureus : Staphylococcus aureus

SFME : Extraction sans solvant assistée par micro-onde

UMMTO : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Feuilles du P.L (a). Fruits du P.L (b). Résine (c).

Figure 2.1 : Feuilles du P.L pendant le séchage (a). Feuilles du P.L (b).

Figure 2.2 : Appareil de type Clevenger.

Figure 2.3 : Réfractomètre d'ABBE.

Figure 2.4 : Ensemencement (a), dépôt de disques (b).

Figure 3.1 : Diamètres d'inhibition E.coli (a) ; S.aureus (b) ; A.niger (c).

Figure 3.2 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'HE.

Figure 3.3 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Dénomination du P.L

Tableau 1.2 : Classification botanique

Tableau 2.1 : Situation géographique et état bioclimatique

Tableau 2.2 : Matériel utilisé pour l'étude antimicrobienne

Tableau 2.3 : Souches bactériennes étudiées

Tableau 3.1 : Caractérisation organoleptique de l'HE de Lentisque

Tableau 3.2 : Indices chimiques

Tableau 3.3 : Résultats du screening phytochimique

Tableau 3.4 : Diamètres d'inhibition

Tableau 3.5 : Diamètres d'inhibition et action de l'HE sur les souches

Tableau 3.6 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'HE de Lentisque à différentes concentrations

Tableau 3.7 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique à différentes concentrations

Introduction

Les médications traditionnelles et l'utilisation des plantes en médecine empirique ont souvent été à l'origine de recherches scientifiques de haut niveau. Dans la plupart des cas, ces recherches aboutissent à la découverte de substances originales présentant un intérêt thérapeutique considérable. La pharmacie industrielle jouit largement de ces molécules isolées, purifiées puis utilisées par la médecine conventionnelle ; mais les plantes (source de ces molécules) étaient et sont utilisées avec succès en phytothérapie et en aromathérapie sous diverses formes. Ces médications ont de plus en plus la considération du public et des médecins. Les plantes soignent ou contribuent à guérir, parfois très rapidement, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux, les rhumatismes, les refroidissements, mais aussi de très nombreuses maladies [1].

L'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. L'histoire de l'aromathérapie naquit ainsi et, avec les progrès de la science, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques qui ont permis de faire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) et d'authentiques médicaments.

L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatique médicinales. Elle recèle donc une richesse floristique remarquable estimée à près de 4000 espèces. L'Algérie compte parmi les pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel en phytothérapie transmis d'une génération à l'autre [2].

Parmi les plantes médicinales aromatiques qui existent en Algérie, le Pistacia Lentiscus, qui est un arbrisseau appartenant à la famille des Anacardiaceae. Cette plante est très répandue dans la médecine traditionnelle, son huile essentielle extraite de ces feuilles est utilisée pour traiter les petites blessures et brûlures légères. C'est dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel que s'inscrit cette étude dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de l'huile essentielle du lentisque.

Ce manuscrit comporte trois chapitres. Le premier chapitre aborde une étude bibliographique sur la description botanique de la plante *Pistacia Lentiscus*, les métabolites secondaires. Le deuxième chapitre concerne le matériel et les méthodes utilisées. Le dernier chapitre parlera des résultats et discussions.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Plantes aromatiques et plantes médicinales

La distinction entre les deux est souvent confuse. Cela s'explique par le fait que les plantes aromatiques, dont l'usage est principalement culinaire, possédant quasiment toutes des propriétés médicinales plus ou moins importantes. Les plantes médicinales développant souvent au contraire une odeur et un goût peu agréables qui les rendent inadaptées à la consommation [3].

1.1 Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles. Les plantes aromatiques ont des tiges, des feuilles, des fleurs et des semences qui laissent échapper des odeurs plus ou moins fortes, plus ou moins agréables. Quelques-unes fournissent des produits avec lesquels on aromatise des boissons, des aliments ou des sucreries, les autres produisent des feuilles ou des fleurs qui servent principalement à parfumer des savons, des pommades, des poudres ou autres articles de toilette [4].

1.2 Plantes médicinales

Sont des plantes qui ont des propriétés thérapeutiques. Elles sont utilisées comme des matières premières dans le but d'extraire des principes actifs, pour les exploiter dans de nombreuses spécialités [5].

2 Etude botanique

2.1 Dénomination du Pistacia Lentiscus

Tableau 1.1 : Dénomination du P.L

Nom commun : Arbre au mastic
Noms vernaculaires : Dhrou, Derou, Dharou
Nom berbère: Tidekt, Tidekst, Amadagh [6]

2.2 Classification botanique du Pistacia Lentiscus

Tableau 1.2 : Classification botanique

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Sous famille	Rhoidées
Genre	Pistacia [7]

2.3. Description du Lentisque

Le lentisque est un arbrisseau vivace ramifié. Cet arbrisseau touffu ne dépasse pas 1,5 à 2 mètres bien qu'il puisse atteindre parfois 5 à 6 m de hauteur [8]. Cet arbre a de très petites fleurs, la partie mâle avec cinq étamines (parties reproductives de la fleur) la partie femelle est divisée en trois lobes.

Le fruit qui est rarement présent, est un fruit charnu à noyau, de 4 mm de diamètre, d'abord rouge puis noir quand il mûrit. Son odeur est forte et sa saveur est amère. La période de fructification s'étend de Juillet à Décembre [9]. Les tiges et le tronc sont rougeâtres quand l'arbre est jeune et deviennent gris quand l'arbre vieillit.

La résine appelée aussi mastic, est une substance aromatique et résineuse qui est extraite du tronc et des branches principales du lentisque. La récolte de ce produit s'effectue principalement de la variété chia [10].

1.4 Habitat

Le Pistachier lentisque pousse dans les zones sèches et rocailleuses du bassin méditerranéen, il résiste aux fortes gelées et pousse sur tous types de sols, même dans les zones calcaires et les environnements salins et secs ; on le trouve donc en plus grand nombre sur les côtes et également dans les bois, pâturages, forêts de chênes, garrigues, maquis, collines, gorges rocailleuses. En Algérie il s'étend d'Est en Ouest en pénétrant jusqu'aux régions sub-sahariennes [11].

3 Partie utilisée

Les feuilles : Elles sont persistantes paripennées, avec 4 à 10 paires de folioles oblongues, elliptiques, vertes foncées et luisantes dessus, plus pâles et mûtes en dessous, elles prennent en hiver une teinte pourprée [6]. Système racinaire est à croissance rapide et très pivotant. La partie male est la partie reproductive de la fleur qui se présente avec 5 sépales et 5 étamines. Tant dis que la partie femelle est composée de 3 ou 4 sépales entourant l'ovaire.

4 Constituants phytochimiques du lentisque

4.1 Feuilles

Elles contiennent les composés phénoliques dont les acides phénoliques notamment l'acide gallique et ses dérivés glycosylés. Elles contiennent également les flavonoïdes dont les flavones et les flavonols, des hétérosides, des anthocyanines et des tannins. En outre, il a été rapporté que les parties aériennes sont extrêmement riches en monoterpènes et en huiles essentielles [12].

4.2 Fruits

Riches en tannins, en monoterpènes, en flavonoïdes, en dérivés de galloyl et en acides phénoliques. Ils sont également riches en acides gras insaturés comme l'acide oléique et linoléique [12].

4.3 Résine

Elle a une odeur forte, de couleur jaune, qui est obtenue par incision du tronc. Elle est formée de 80 à 90% d'acide masticique et de 10 à 20% de masticine. L'huile essentielle de mastic est un liquide incolore, d'odeur balsamique très prononcée [13].

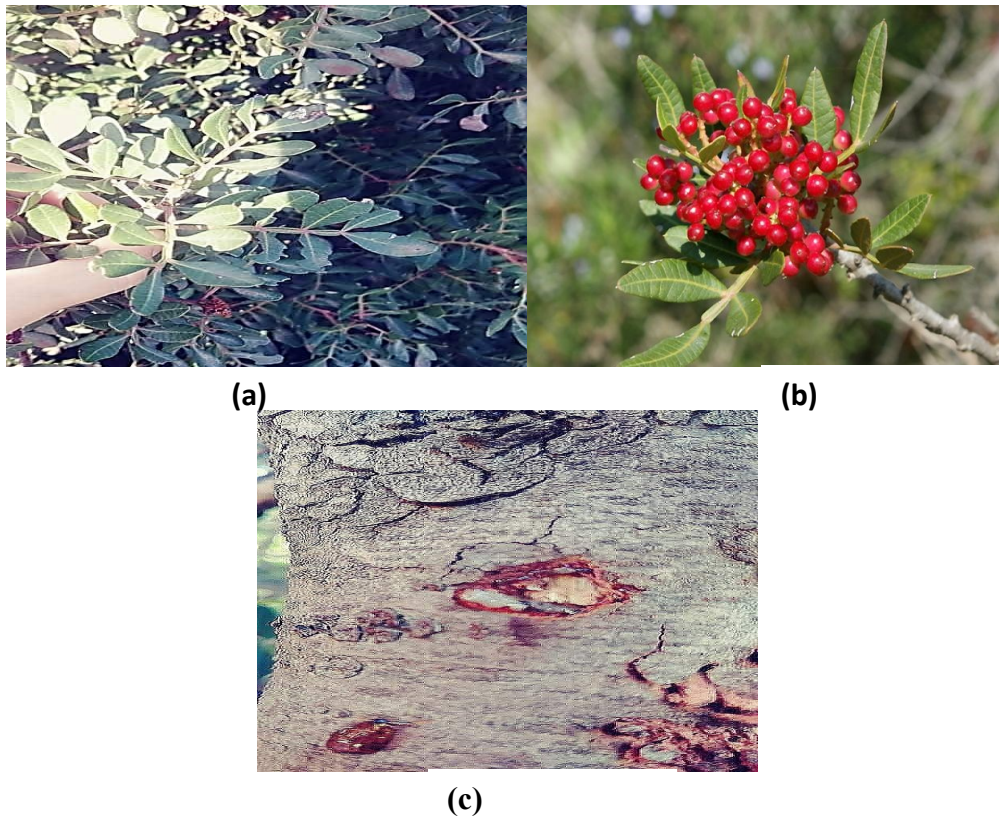


Figure 1.1 : Feuilles du P.L(a).Fruits du P.L (b).Résine (c)

5 Métabolites secondaires

L'organisme des végétaux se compose de métabolites secondaires dont leur répartition est limitée. Ils y jouent des rôles très importants, comme moyen de défense contre les agressions externes. Les produits des métabolismes secondaires sont très nombreux. Ils sont d'une variété structurale extraordinaire mais en faible quantité [14]. Parmi les métabolites secondaires on trouve : les tanins, les flavonoïdes, les saponosides, les alcaloïdes, les terpénoïdes et l'huile essentielle.

5.1 Composés phénoliques

Les substances phénoliques englobent une vaste gamme de composés possédant tous un groupement hydroxyle attaché à un cycle aromatique. Ils sont présents dans presque toutes les plantes et ils s'accumulent dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits [15].

5.1.1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques solubles dans l'eau, ils sont répartis en plusieurs classes telles que les anthocyanes les flavonols et les flavones. Ils contribuent entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un champ d'action important et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Certains flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires et antivirales et des effets protecteurs sur le foie [8].

5.1.2 Tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles. Les tanins sont des composés polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour tanner les peaux. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tannins sont utilisées pour rendre les tissus souples comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [8].

5.2 Saponines

Principaux constituant de nombreuses plantes médicinales. Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant [16]. Les saponines existent sous deux formes selon la nature de leur génine : les stéroïdes et les triterpénoïdes.

5.2.1 Stéroïdes

La structure de stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone) et à de nombreuses plantes qui en contiennent un effet sur l'activité hormonale.

5.2.2 Terpénoïdes

Les terpénoïdes de plantes sont beaucoup utilisés en raison de leurs qualités aromatiques. Ils jouent un rôle dans les remèdes en herboristerie traditionnelle et font l'objet de recherche pour découvrir des effets antibactériens, antinéoplasiques ou autres effets pharmaceutiques [8].

5.3 Alcaloïdes

Ils possèdent presque tous une molécule d'azote (-N-) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées. C'est le cas de la pervenche de Madagascar employé pour traiter certains types de cancer [8].

6 Utilisation traditionnelle

Dans la médecine traditionnelle le lentisque est utilisé pour traiter des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux et la jaunisse, il est utilisé aussi pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal [17].

7 Huile essentielle

7.1 Définition

Une huile essentielle ou autrement dite essence végétale, est un liquide hydrophobe constitué de composés odoriférants volatils sécrétés par une plante. Ce mélange complexe de diverses molécules (alcools, terpènes, cétones, etc.) est obtenu soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'art d'utiliser les huiles essentielles est appelé « aromathérapie ». C'est une part de la phytothérapie : soin par les plantes [18].

Bien qu'on les appelle huiles, ces substances ne contiennent aucun corps gras : une goutte déposée sur un papier s'évapore sans laisser de trace contrairement à une huile végétale [19].

7.2 Aromathérapie

L'aromathérapie est la thérapie par les arômes. C'est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, préventives ou curatives soit par voie interne ou cutanée ou par inhalation [20].

7.3 Répartition

Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, on les trouve stockées dans les fleurs, les feuilles et elles sont moins abondantes dans les écorces, les bois, les rhizomes, les fruits et les graines. Les constituants qui composent les HE sont répartis dans de nombreuses familles exemple :Anacardiaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, etc [21].

7.4 Localisation

Les HE sont généralement localisées sur la surface de la plante ou à proximité de cette dernière, exemple, cellules à huiles essentielles des Lauraceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae, etc [21].

7.5 Propriétés physiques

Les HE sont liquides à température ambiante, volatiles ce qui les différencie des huiles végétales grasses « fixes », la volatilité est liée à la composition chimique, par exemple, les monoterpènes sont plus volatils que les sesquiterpènes. Très peu soluble dans l'eau, et fortement soluble dans les huiles grasses [5]. La majorité des HE ont une couleur jaune presque imperceptible et elle devient foncée au cours de leur vieillissement ce qui est dû à la réaction d'oxydation. Leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques huiles (HE d'oignon), qui a une densité beaucoup plus élevée. Leur indice de réfraction est généralement élevé. En ce qui concerne le pouvoir rotatoire, les HE sont actives sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent [22].

7.6 Propriétés chimiques

Les HE sont des mélanges complexes qui renferment de nombreux constituants appartenant à deux grands groupes chimiques : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui est moins fréquent. Elles peuvent toutefois renfermer d'autres produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils [21].

7.6.1 Terpénoïde

On trouve les monoterpènes : les carbures peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques et constituent plus de 90% de l'HE, exemple, alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, phénols. On rencontre également les sesquiterpènes tels que les carbures mono- ou polycycliques, alcools, cétones, aldéhydes, esters [21].

7.6.2 Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane $R-C_6H_4-C_3H_7$ sont moins répandus que les terpénoïdes et sont souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes tels l'anéthol, l'eugénol. On peut également rencontrer des composés en $R-C_6H_4CH_3$ comme la vanilline qui est assez fréquente ou l'antranilate de méthyle [21].

7.7 Mode d'application des huiles essentielles

La façon d'utiliser une huile détermine ses effets. C'est extrêmement important : les effets et les risques varient de manière radicale selon qu'on les ingère, diffuse ou applique localement. Il faut retenir que plus une huile est appliquée proche de l'organe cible, plus elle sera efficace. L'application locale est la plus polyvalente, l'huile essentielle traverse très bien la peau, ce qui lui permet d'atteindre les organes en dessous. Ainsi, on peut avoir un effet tonique, reposant, anti-infectieux, respiratoire ou digestif, etc. On peut l'appliquer sur le ventre pour atteindre le système digestif, sur le torse ou le haut du dos pour atteindre les poumons ou encore sur la colonne vertébrale pour atteindre le système nerveux central. Toutefois, c'est aussi une voie peu rentable : l'HE s'évapore très vite, seule une partie arrive dans le système. Par contre, c'est la meilleure voie pour traiter les problèmes musculaires.

L'ingestion est indiquée pour les systèmes digestifs et respiratoires. Elle est aussi efficace pour donner des effets psychiques. C'est le mode d'action le plus efficace : 100% de l'huile consommée arrive dans le corps et passe par le système digestif. Ce mode requiert parfois des précautions supplémentaires.

Diffuser une huile essentielle permet d'atteindre rapidement et efficacement les voies respiratoires, c'est donc la meilleure voie contre les infections les affectant. Elle est aussi efficace pour les aspects psychiques [23].

7.8 Précautions d'usage des huiles essentielles

La première précaution est d'apprendre à les utiliser, à faible dose elles sont presque inoffensives, contrairement aux antibiotiques et autres médicaments qui heurtent toujours d'une façon ou d'une autre l'organisme et qui ont de vrais effets secondaires néfastes. Ainsi, il est possible d'expérimenter en toute sécurité les doses qui nous conviennent en suivant les directives [23]. D'une façon générale, les faibles dosages sont les plus souvent calmants ; les dosages élevés plutôt stimulants ; les dosages trop élevés souvent toxiques. Les huiles essentielles sont des substances hautement concentrées d'où la nécessité de les diluer avant leurs utilisations [24]. La plupart peuvent se mettre pures sur la peau sans autre conséquence qu'un léger assèchement. Certaines, au contraire, sont irritantes sur la peau. En aucun cas il ne faut en mettre sur les muqueuses, dans l'œil ou l'oreille [23].

7.9 Conservation et stockage des huiles essentielles

Les molécules constitutives des HE nécessitent des précautions particulières pour garantir leurs bonnes conservations. En effet, les possibilités de dégradations sont nombreuses, elles peuvent être mises en évidence par la mesure d'indices chimiques tels que l'indice de peroxyde, l'indice d'acide, etc, par la mesure d'indices physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, densité, etc.) et/ou par l'analyse chromatographique. Les conséquences de dégradations sont multiples et peuvent altérer les propriétés de l'HE et/ou mettre en cause sont innocuité, parmi ces conséquences on trouve : l'hydrolyse, photocyclisation, coupure oxydative, thermo-isomérisation, photo-isomérisation, transestérification. Pour éviter cela il faut préconiser l'utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre est rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte). L'HE doit être conservée à l'abri de la lumière et de toute source de chaleur : cela impose sa conservation à une température comprise entre 4°C (réfrigérateur), et 30°C à 35°C maximum[19].Un antioxydant peut être ajouté à l'huile d'où la nécessité de le mentionner lors de la vente ou l'utilisation de l'huile.

7.10 Toxicité d'une huile essentielle

Les HE sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, leurs utilisations n'est pas anodin, elles sont susceptibles d'engendrer plusieurs types de toxicité voire l'hépatotoxicité, néphrotoxicité,

dermatotoxicité, l'ingestion de plus de 10ml d'HE est neurotoxique et épileptogène et cela par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques [25]. L'intoxication chronique reste la principale en aromathérapie, elle est due à l'utilisation prolongée d'huiles essentielles phénoliques dangereuses pour les hépatocytes. Tandis que, l'intoxication aigüe demeure relativement rare [22].

8 Utilisation de l'HE de lentisque

Son usage recouvre un domaine très large, allant d'une utilisation en aromathérapie jusqu'aux effets thérapeutiques importants. L'HE est efficace contre la bronchite, l'asthme, la sinusite, l'eczéma et joue un rôle important dans le processus de guérison de la peau [26]. Elle est également employée pour le massage lors de douleurs du dos, varices et jambes lourdes [6]. En industrie pharmaceutique, les HE sont employées sous forme d'excipients, par exemple, d'arôme pour masquer le goût désagréable d'un principe actif, comme agent de pénétration percutanée, ou également comme source de précurseur d'hémisynthèse [22].

9 Activité antimicrobienne

Depuis l'antiquité, les HE ont été considérées comme des agents antibactériens les plus efficaces. La première mise en évidence de l'action des HE contre les bactéries a été réalisée en 1881 par DE LA CROIX. Depuis de nombreuses huiles ont été définies comme étant antibactériennes. Certaines d'entre elles sont dotées d'un spectre d'action bien étendu, elles agissent sur diverses bactéries y compris celles qui résistent aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une HE à une autre et d'une souche bactérienne à une autre [23]. Elles peuvent être inhibitrice (microbiostatique) : blocage de la multiplication des cellules microbiennes, ou létale (microbicide) : mort des cellules microbiennes et cela est lié à la composition chimique d'une HE et à ces composés volatils. Il en ressort que les bactéries à Gram négatif (-) sont moins sensibles que les bactéries à Gram positif (+), en raison de la différence dans la composition pariétale. En effet, la paroi des bactéries à Gram positif (+) est homogène, son épaisseur varie de (10 à 80) nm, elle est riche en acide téichoïque et pauvre en lipide (moins de 2%). Quant aux bactéries à Gram positif (-), la structure de leur paroi est plus complexe, son épaisseur est d'environ 10 nm [41] et leur membrane externe contiennent des lipopolysaccharides qui créent une barrière contre les macromolécules et les composés hydrophobes. Ces composés naturels

renferment un grand nombre de principes actifs et leur principale cible est la membrane cytoplasmique [28].

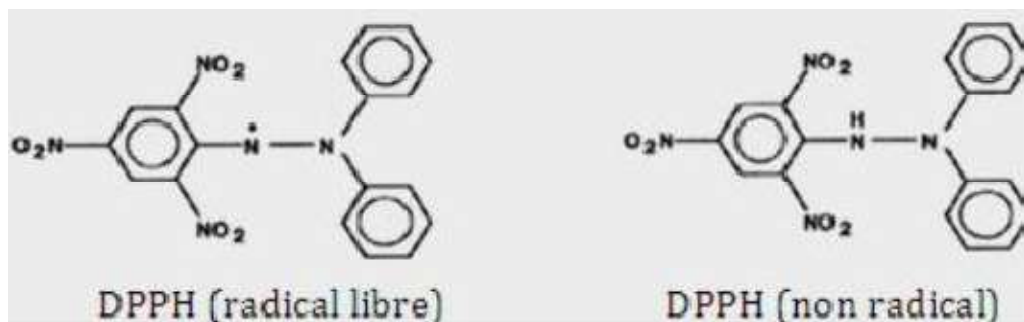
10 Activité antioxydante

L'oxydation est un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. L'oxygène produit par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces oxygénées actives (EOA) tels que les radicaux libres qui sont à l'origine de diverses pathologies : cancer, obésité, inflammation, athérosclérose et les maladies dégénératives [29]. Parmi les antioxydants les plus connus on trouve le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et les composés phénoliques qui jouent un rôle dans le piégeage des radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{HO}\bullet$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet$). Pour cela, il existe différentes méthodes pour évaluer l'activité antioxydante comme par exemple, la méthode utilisant le radical libre DPPH $^\circ$ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [30].

10.1 Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Ce test permet de mesurer le pouvoir anti-radicalaire d'un antioxydant ou d'un extrait antioxydant, c'est à dire sa capacité à réduire le radical DPPH $^\circ$ par transfert d'un hydrogène. Plus un composé aura la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus il sera efficace en tant qu'antioxydant. La rapidité de la réaction dépend de la nature de l'antioxydant et la quantité de DPPH-H formée dépend de la concentration en antioxydant.

Le DPPH $^\circ$ est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, il est de coloration violette. La réduction de ce radical est mesurée par spectrophotométrie à 515 nm [18].



11 Procédés d'extraction

11.1 Extraction par hydrodistillation ou distillation dans l'eau

L'hydrodistillation consiste à broyer la plante aromatique puis la mettre dans un récipient et l'immerger dans l'eau qui est portée à ébullition. L'HE forme un mélange azéotrope avec la vapeur d'eau, les vapeurs sont ensuite condensées par un système de réfrigération par courant d'eau et l'HE est séparée par différence de densité. L'avantage de cette méthode c'est que les HE sont distillées à pression réduite, ce qui évite les dommages liés à la chaleur. Le point faible c'est que la plante reste continuellement en contact avec l'eau ce qui peut altérer les HE car cela apporte de l'hydrolyse et ainsi modifier la composition de l'HE obtenue [18].

11.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Selon la pharmacopée européenne, le principe consiste au passage de la vapeur d'eau à travers la matière première végétale ou par de l'eau portée à ébullition dans laquelle la matière végétale est immergée. La vapeur d'eau peut être fournie par une source externe ou par de l'eau portée à ébullition en dessous de la matière première. Les vapeurs d'eau et d'HE sont condensées puis séparées par décantation [31].

11.3 Extraction sans solvant assistée par micro-onde (SFME)

Cette méthode permet de réaliser des extractions de produits naturels à pression atmosphérique et sans solvant. L'eau intrinsèque de la plante chauffe et provoque la distillation azéotropique d'un mélange eau/ huile essentielle, les vapeurs sont condensées par un système de refroidissement et sont redirigées dans l'appareil de Clevenger dans lequel les vapeurs recondensées sont séparées par simple séparation de phase, c'est-à-dire par leur densité. Un système de cohobation permet à la phase aqueuse éliminée du réacteur de distillation de retourner dans celui-ci et ainsi le taux d'humidité naturel de la plante est maintenu [18].

11.4 Détente instantanée contrôlée (DIC)

Elle consiste en un traitement du matériel végétal frais pendant une courte durée à haute température (180°) et haute pression (10 bars) suivie d'une détente abrupte vers le vide qui provoque l'auto-vaporisation instantanée d'une partie de l'eau et des composés volatils. C'est un procédé sans solvant et qui présente comme inconvénient la formation d'une émulsion stable des huiles essentielles dans l'eau [18].

CHAPITRE II
ETUDE EXPERIMENTALE

1 Récolte

1.1 Zone d'étude de la plante

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement. L'Algérie, par la richesse et la diversité de l'origine de sa flore, constitue un véritable réservoir phytogénétique, dont plusieurs espèces et sous espèces de plantes médicinales. La wilaya de Tizi-Ouzou n'est pas exclue de cette diversité, elle est située au Nord de l'Algérie, dans la région de la Kabylie. Parmi les plantes médicinales présentes on trouve le Pistacia Lentiscus, qui est l'objet de notre étude. La récolte a été faite exactement dans le village Ihesnawen, situé à 10 km au sud-est de la commune de Tizi-Ouzou.

La zone d'étude est décrite dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Situation géographique et état bioclimatique

Station	Longitude	Latitude	Altitude	Etage bioclimatique
Ihesnawen	4°3',588 E	36°39',846 N	600 m	Subhumide

1.2 Période de la récolte

La récolte a été effectuée au mois d'avril 2021.

1.3 Identification de la plante

La plante a été identifiée par le professeur Mme Smail au département de biologie de l'UMMTO.

1.4 Conservation de la plante

Une fois la récolte est terminée et après le tri, la plante a été laissée sécher à l'ombre et à température ambiante pour une durée de 20 jours. Après le séchage, elle a été conservée dans des sacs en papier jusqu'à son utilisation.



(a)



(b)

Figure 2.1 : Feuilles du P.L pendant le séchage **(a)**. Feuilles du P.L après le séchage **(b)**

1.5 Broyage

Le broyage a été fait à l'aide d'un broyeur afin d'avoir une fine poudre.

2 Mode d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée avec un appareil de type Clevenger. Une masse de 300g de notre plante lentisque est introduite dans un ballon en verre de 4L contenant une quantité suffisante d'eau distillée (3L). Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon, les vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes produites s'accumulent dans le tube. En raison de la différence de densité, l'huile essentielle surnage à la surface de l'eau. L'hydrodistillation a duré 3heures. Les huiles essentielles obtenues sont recueillies dans des flacons à l'abri de la lumière et stockées à 4-6°C jusqu'aux tests antioxydants et antimicrobiens.



Figure 2.2 : Appareil de type Clevenger

3 Tests phytochimiques sur la plante du *Pistacia Lentiscus*

Il s'agit d'une étude qualitative visant à la recherche des principaux groupes chimiques (alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, composés réducteurs, composés cyanogénétiques, ...). Les tests de caractérisations sont basés sur des réactions de précipitations et de complexations avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée est provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié et est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une instauration dans une molécule.

Préparation de l'infusion

L'infusé est préparé en utilisant 10g de poudre par 100ml d'eau.

Alcaloïdes

Ils ont été caractérisés grâce aux réactifs de Mayer ; un extrait sulfurique a été préparé à partir de 5 g de poudre et de 25 ml de H_2O_4 à 10%. Après agitation, il fut laissé en macération pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire, puis filtré sur papier filtre et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 25 ml. Le procédé a consisté à utiliser 1 ml de ce filtrat dans un tube à essai et lui ajouter 5 gouttes du réactif de Mayer, l'apparition de précipités indique la présence d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes ont été également caractérisés avec le réactif de Wagner, en réalisant les mêmes étapes dans les mêmes conditions [32].

Tanins

La présence des tanins est caractérisée par l'ajout à 1ml de l'extrait, 1ml d'eau et une à deux gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques et l'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins galliques [32].

Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine ; à 5ml de l'extrait de l'infusé présentant une coloration plus ou moins foncée, on ajoute 5ml d'acide sulfurique à 10% puis une base (NH_4OH). Si la coloration augmente par acidification, puis vire au bleu-violacé en milieu basique, la présence d'anthocyanes est confirmée.

L'identification des flavonoïdes se fait par la réaction de la cyanidine, qui permet de caractériser le type de flavonoïdes présent dans les extraits en développant des colorations variées : rouge cerise pour les flavonols, orange pour les flavones et violacée pour les flavanones (réaction exothermique).

A 1ml de chaque extrait, on ajoute 1ml d' HCl concentré puis quelques copeaux de magnésium et on observe ainsi la coloration formée.

Les mucilages ont été également caractérisés par l'introduction de 1 ml de l'infusé à 10 % dans un tube à essai et ajout de 5 ml d'Éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages [32].

Stérols et des Triterpènes

Leur détection a été réalisée sur l'extrait obtenu à partir de 1 g de poudre et 20 ml d'Ether de pétrole laissés en macération pendant 24 heures, puis filtrés et complétés à 20 ml avec de l'éther de pétrole. Après avoir évaporé à sec 10 ml de l'extrait, le résidu a été dissout dans 1ml d'anhydride acétique, puis 1 ml de chloroforme et recueilli dans deux tubes à essai, dont l'un sert de référence. A l'aide d'une pipette, 1 à 2 ml de H_2SO_4 concentré ont été déposés au fond du tube à essai sans agitation. A la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet ; la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et de triterpènes [32].

Saponosides

10 ml de l'extrait total aqueux ont été versés dans un tube à essai ; le tube, agité pendant 15 secondes a été laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides [32].

4 Paramètres intervenant dans le procédé d'extraction

4.1 Détermination du rendement de l'huile essentielle

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse sèche de la matière végétale. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R\% = \frac{M}{M_0} \times 100$$

- R (%) : Rendement exprimé en %.
- M : Masse d'huiles essentielles récupérées.
- M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

4.2 Détermination des indices physicochimiques de l'HE extraite

Les propriétés physicochimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE.

Ces tests ci-dessous ont été réalisés au niveau de la faculté des sciences de l'UMMTO au laboratoire de chimie pharmaceutique.

4.2.1 Caractéristiques organoleptiques

Aspect : limpide

Couleur : jaune pâle

Odeur : odeur intense et herbacée [33]

4.2.2 Densité relative

C'est le rapport entre la masse d'un certain volume d'HE et la masse d'un volume égal d'eau à 20 °C. La densité relative est mesurée expérimentalement en utilisant un Eppendorf de 1.5ml et calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

M_0 : masse de l'Eppendorf vide (en g)

M_1 : masse de l'Eppendorf remplie d'eau distillée (en g)

M_2 : masse de l'Eppendorf remplie d'huile essentielle (en g).

4.2.3 Indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

Protocol expérimental :

L'indice de réfraction a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE à 20°C. Pour se faire, une goutte d'HE a été déposée sur l'une des faces des prismes déjà nettoyées, puis on a effectué le réglage à l'aide de la micro visse de façon à ce qu'on amène les zones sombres et éclairées au centre du réticule et on lit la valeur. Cet indice est calculé selon l'équation suivante :

$$n_D^T = n_D^{T'} + 0,0004 * (T' - T)$$

Où la température de référence est de 20 °C

n_D^T : Indice de réfraction à 20 °C

$n_D^{T'}$: Valeur de lecture [13].

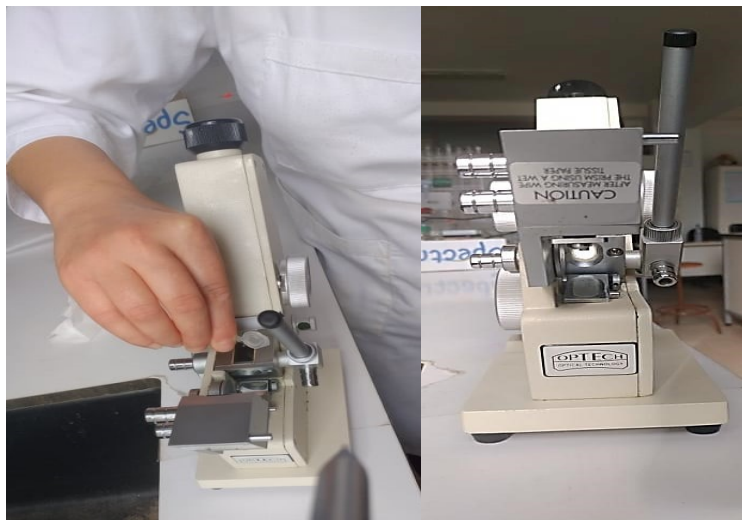


Figure 2.3 : Réfractomètre d'ABBE

4.2.4 Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour neutraliser les acides libres présents dans 1 g d'HE. Il s'agit de neutraliser les acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée, en présence de phénolphaléine. Si l'acidité est forte, nous ajoutons du KOH alcoolique titré, jusqu'au virage rose dans la solution alcoolique du corps gras.

Pour cela on a procédé comme suit :

0.1g d'HE, 0.5ml d'éthanol à 96% et une (1) goutte d'indicateur coloré (phénolphaléine) ont été mis dans un erlenmeyer. Ensuite, on a titré par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.1N jusqu'à ce que la solution vire au rose [13].

4.2.5 Indice d'ester

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'HE. L'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage en retour de l'excès d'alcalin par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

Protocole expérimental :

Dans un ballon de 100ml, on a introduit 0.1g d'HE et 2.5ml d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5N à l'aide d'une burette. L'ensemble a été

porté au reflux pendant 15min. Après refroidissement de la solution on a ajouté 2ml d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de phénophtaléine. L'excès de KOH a été titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.2N jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Une opération à blanc a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment [34].

5 Evaluations antimicrobiennes de l'HE du Pistacia Lentiscus

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du Pistacia Lentiscus est celle de la diffusion sur milieu gélosé. Cette technique permet de déterminer la sensibilité des germes vis-à-vis de notre échantillon. Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie au CHU de Tizi-Ouzou.

Matériel

Le matériel dont on s'est servi pour effectuer ces études est résumé dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Matériel utilisé pour l'étude antimicrobienne

Matériel
Boites de pétri
Micropipette
Pipette pasteur stérile
Ecouvillons stériles
Bec bunsen
Disques en papier Wattman
Eau physiologique stérile à 0.9%
Gélose Muller-Hinton
Souches bactériennes
Souches fongiques
Etuve
Pinces

Milieu de culture

- Gélose nutritive (GN)
- Sabouraud chloramphénicol
- Muller-Hinton

5.1 Etude de l'activité antifongique

Souches testées

Pour cette étude deux souches fongiques ont été utilisées pour tester l'efficacité de notre huile essentielle : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

Repiquage des souches fongiques

L'*Aspergillus niger* et le *Candida albicans* ont été repiquées chacune dans le milieu Sabouraud chloramphénicol et laisser dans une étuve à 37°C pour une durée de 48h.

Préparation de l'inoculum

Après une incubation de 48h, les jeunes souches bien isolées et identiques ont été misent dans 10ml d'eau physiologiques stériles.

Ensemencement et dépôt de disques

En se servant d'un écouvillon qu'on trempe dans nos suspensions, on effectue un ensemencement de ces dernières sur les milieux MH. Ensuite deux disques de 6mm en papier wattman ont été déposés sur les géloses : une qui contient l'*Aspergillus niger* et l'autre qui contient le *Candida albicans* (une distance de 25 mm entre les disques doit être respectée).

Pour chaque milieu MH, un disque est imprégné de 5 µl de notre HE et l'autre de 5µl d'eau physiologique stérile.

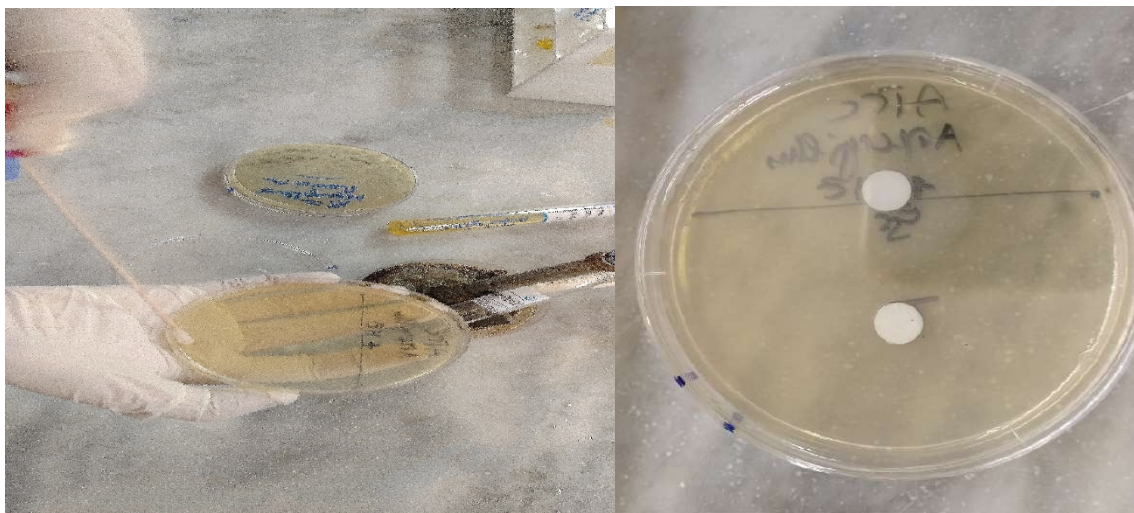


Figure 2.4 : Ensemencement (a), dépôt de disques (b)

Incubation

Les milieux MH ont été laissés pour une incubation de 48h à 37°C.

Lecture

La lecture a été faite en mesurant la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse [35].

5.2 Etude de l'activité antibactérienne sur milieu gélosé

Méthode

Pour évaluer l'activité antibactérienne de notre huile essentielle on a opté pour la méthode de diffusion sur disque, en raison de sa simplicité et de son efficacité à inhiber la croissance des bactéries.

Souches testées

Les micro-organismes utilisés ainsi que leur référence sont mentionnés sur le tableau 2.3

Tableau 2.3 : Souches bactériennes étudiées

Souches bactériennes	Références
Bactérie à Gram (-) : <i>Escherichia coli</i>	25922
Bactérie à Gram (+) : <i>Staphylococcus aureus</i>	25923

Repiquages des souches bactériennes

Les souches bactériennes à Gram (+) et à Gram (-) ont été mises chacune dans des boîtes de pétri sur une gélose nutritive, puis elles ont été laissées en incubation dans une étuve à 37°C pendant 24h pour l'obtention de cultures jeunes.

Préparation de la suspension bactérienne (inoculum)

Après incubation, des colonies isolées et identiques ont été prélevées en utilisant une pipette pasteur stérile, puis elles ont été déposées dans 10ml d'eau physiologique stérile.

Ensemencement et dépôt de disque

A l'aide d'un écouvillon qu'on trempe dans la suspension bactérienne, on effectue un ensemencement de cette dernière sur le milieu MH. On se servant d'une pince stérile, deux disques de 6mm pour chaque boîte de pétri ont été déposés sur la surface gélosée MH : un espace de 25mm entre les disques doit être respecté.

Pour chaque boîte de pétri, un disque est imprégné de 5 µl de notre HE et l'autre disque de 5 µl d'eau physiologique stérile comme témoin négatif.

Incubation

Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

Expression des résultats

La lecture se fait en mesurant la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse et on compare ainsi les résultats à ceux trouvés dans la littérature [24].

6 Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de notre HE a été réalisée par deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur des ions ferriques.

6.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le caractère antioxydant de l'HE du *Pistacia Lentiscusa* a été évalué à l'aide du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ce dernier est considéré comme étant stable en forme radical libre et qui porte une coloration violette.

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE

Une solution éthanolique de DPPH a été préparée en dissolvant 4mg de ce dernier dans 100ml d'éthanol. Puis 0.5 mg d'HE a été dissout dans 1ml d'éthanol, cette solution dite solution mère a subi ensuite des dilutions [37].

A 40µl de différentes concentrations des solutions d'HE, sont additionnés 2ml de DPPH, puis les absorbances ont été mesurées à 517nm après 1h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif (référence).

Le pourcentage d'activité antioxydante (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{écha}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Avec :

I% : Pourcentage d'inhibition ;

A_{blanc} : Représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (huile essentielle) à une concentration donnée ;

A_{écha} : Absorbance de l'échantillon testé après 1h [34].

Détermination de la concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC₅₀)

L'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50%) est défini comme étant la concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres et qui est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petite [35].

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

1 Détermination du rendement de l'huile essentielle

$$R\% = (M / M_0) * 100$$

$$R\% = (0,84 / 300) * 100$$

$$R\% = 0,28\%$$

Le rendement obtenu par cette extraction est conforme aux normes trouvées dans la littérature qui est de 0,2% [35].

2 Caractérisation organoleptique

Selon la monographie, les caractéristiques de notre HE sont similaires et sont résumés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de Lentisque

Caractéristiques organoleptiques	HE extraite	Monographie
Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide mobile
Couleur	Jaune pâle	Jaune pâle
Odeur	Intense et herbacée	Forte et herbacée

3 Détermination des indices physico-chimiques

3.1 Indices physiques

Selon la monographie, la densité relative à 20°C de l'HE du P.L est de [0,850 – 0,875] et l'indice de réfraction est compris entre [1,475-1,485] ce qui concorde avec nos résultats qui sont les suivants :

3.1.1 Densité relative

Masse de l'Eppendorf vide (m_0) : 0,77 (g)

Masse de l'Eppendorf rempli d'eau distillée (m_1) : 1,80 (g)

Masse de l'Eppendorf rempli d'HE (m_2) : 1,63 (g)

$$d_{20}^{20} = m_2 - m_0 / m_1 - m_0$$

$$d_{20}^{20} = 1,63 - 0,77 / 1,80 - 0,77$$

$$d_{20}^{20} = 0,83$$

3.1.2 Indice de réfraction

La valeur de l'indice de réfraction pour l'HE du Pistachier Lentisque à 20°C est de : 1,486

3.2 Indices chimiques

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Indices chimiques

Indices chimiques	Résultats	Références
Indice d'acide	0,028	2,036
Indice d'ester	28,05	21,19

La valeur de l'indice d'acide trouvé pour l'HE du P.L est de 0,028 et celle de l'indice d'ester est de 28,05, qui sont des valeurs différentes de celles trouvées par *Belhachat* [35] représentés dans le tableau 3.2. Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence du lieu de la récolte, la période, mais également la perturbation climatique qui a eu lieu cette année causant des altérations partiales de la plante.

Les valeurs rapportées par *Afnor* [38] pour l'indice d'acide sont inférieures à 5 pour des huiles fraîches qui ne contiennent que très peu d'acides gras, contrairement aux huiles stockées qui ont subi des dégradations. En ce qui concerne l'indice d'ester, plus il est élevé plus l'huile est de bonne qualité.

4 Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont consignés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Résultats du screening phytochimique

Composés phytochimiques	Feuilles	Tiges	Racines
Alcaloïdes	-	-	-
Flavonoïdes	+	-	+
Tanins	+++	+++	+++
Anthocyanes	-	-	-
Mucilages	-	-	-
Saponosides	++	++	+++
Stérols et triterpènes	+++	+++	+

(+++ : Test fortement positif ; ++ : Test moyennement positif ; - : Test négatif)

Le screening phytochimique a permis la détection des composés phytochimiques présents dans les feuilles, les tiges et les racines. Nos résultats ont démontré la présence des tanins et des saponosides dans les feuilles, tiges et racines, qui est de même pour ceux trouver par *Zitouni* [39]. Nous avons également la présence des flavonoïdes dans les feuilles et les racines qui sont en accord avec les résultats de *Zitouni* [39]. La teneur en saponosides dans les racines est supérieure comparée à celle des feuilles et des tiges. En revanche, on note l'absence des alcaloïdes ainsi que les mucilages et les anthocyanes dans la plante contrairement aux résultats trouver par *Zitouni* [39] qui révèlent leur présence.

Ces résultats peuvent être expliqués par la différence du lieu de culture et la période.

5 Evaluations antimicrobiennes de l'HE du *Pistacia Lentiscus*

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'effet de notre HE de P.L sur quatre souches microbiennes, nos résultats sont mentionnés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Diamètres d'inhibition

Souches bactériennes	Souches fongiques
Bactérie à Gram (-) : <i>Escherichia coli</i> : 0 mm	<i>Aspergillus niger</i> : 12 mm
Bactérie à Gram (+) : <i>Staphylococcus aureus</i> : 12 mm	<i>Candida albicans</i> : 10 mm

L'interprétation de nos résultats est réalisée par la comparaison entre les résultats des tests effectués avec ceux donnés par l'échelle ci-dessous considérée comme témoin comparatif.

Tableau 3.5 : Diamètres d'inhibition et action de l'HE sur les souches [35]

Diamètres d'inhibition(d)	Action
d > 28 mm	Fortement inhibitrice
16 < d < 28 mm	Modérément inhibitrice
10 < d < 16 mm	Légèrement inhibitrice
d < 10 mm	Non inhibitrice

Les résultats de notre étude révèlent que l'HE de P.L n'a aucun effet sur *E.coli*. Par contre, *S.aureus* laisse apparaître une certaine sensibilité qui se traduit par un diamètre de 12 mm et qui est en cohérence avec les résultats trouver par *Bammou et al* [32]. Ces résultats s'expliquent par le fait que les bactéries à Gram (+) ont une plus forte sensibilité pour les HE que les bactéries à Gram (-) et cela est dû à la différence de composition de leur paroi cellulaire [40].

Quant aux souches fongiques nous avons remarqué que notre HE a une légère activité inhibitrice vis-à-vis de l'*Aspergillus niger* et du *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibitions de 12 mm et 10 mm respectivement [35].

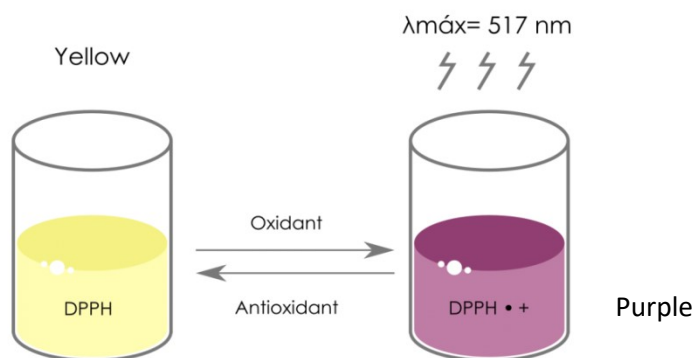


Figure 3.1 : Diamètres d'inhibition *E.coli* (a) ; *S.aureus* (b) ; *A.niger* (c)

6 Etude de l'activité antioxydante

6.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le radical DPPH• est largement utilisé pour examiner la capacité des composés d'agir en tant que piègeurs des radicaux ou donateurs d'hydrogène pour évaluer l'activité antioxydante. Le composé (DPPH•+) est un cation radicalaire coloré et stable de couleur pourpre qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm.



L'évaluation de l'activité antioxydante peut être exprimée par la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps donné (pourcentage de DPPH consommé) en mesurant l'absorbance du mélange réactionnel par rapport à un témoin.

Les résultats du test d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH• par l'huile essentielle du lentisque, sont présentés dans le Tableau. L'huile essentielle a inhibé l'absorbance du radical DPPH• de manière dose dépendante. Aux concentrations de 0,5 et 0.25 mg/ml, l'huile du lentisque a présenté une activité antioxydante modérée, le meilleur PI de l'absorbance du radical DPPH• étant de (70,24)% pour la fraction aqueuse à 0,5 mg/ml.

Tableau 3.5 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'HE de Lentisque à différentes concentrations

Concentration	0,5	0,25	0,13	0,06	0,031
PI(%)	70,25	41,42	26,25	13,77	12,60

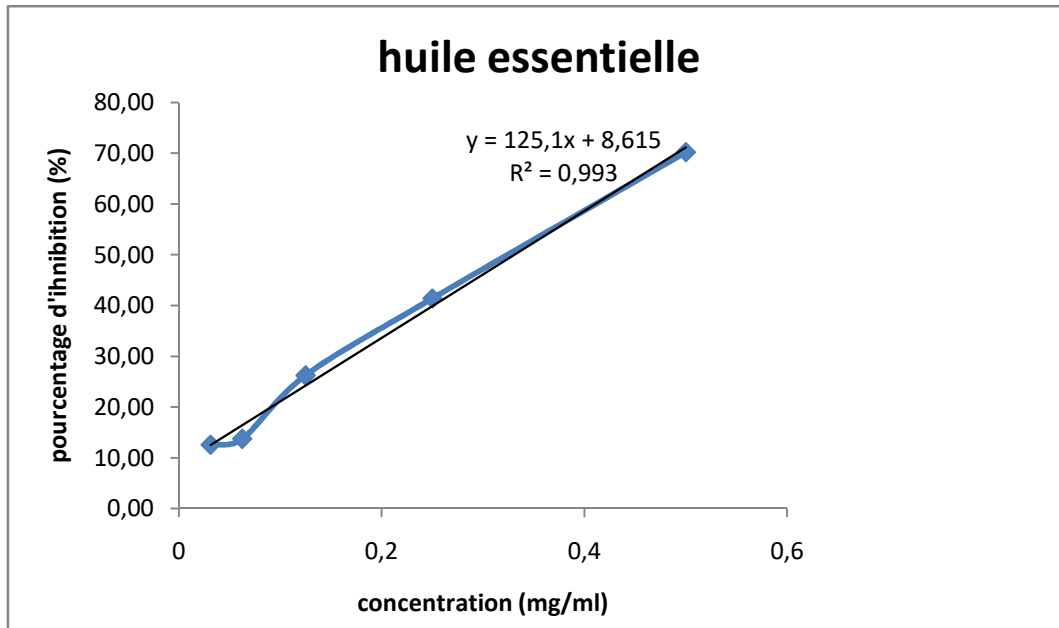


Figure 3.2 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'HE

D'autre part les résultats du test d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH, par l'acide ascorbique sont présentés dans le tableau 3.6. L'inhibition de l'absorbance du radical DPPH par l'acide ascorbique est beaucoup plus élevée par rapport à l'huile essentielle du lentisque. A de faibles concentrations de l'acide ascorbique (0,03mg/ml), l'inhibition est de 84,36%.

Tableau 3.6 : pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique à différentes concentrations

Concentration	0,03	0,015	0,0075	0,00375	0,001875	0,000937
PI(%)	84,36	70,36	62,19	45,74	39,09	29,17

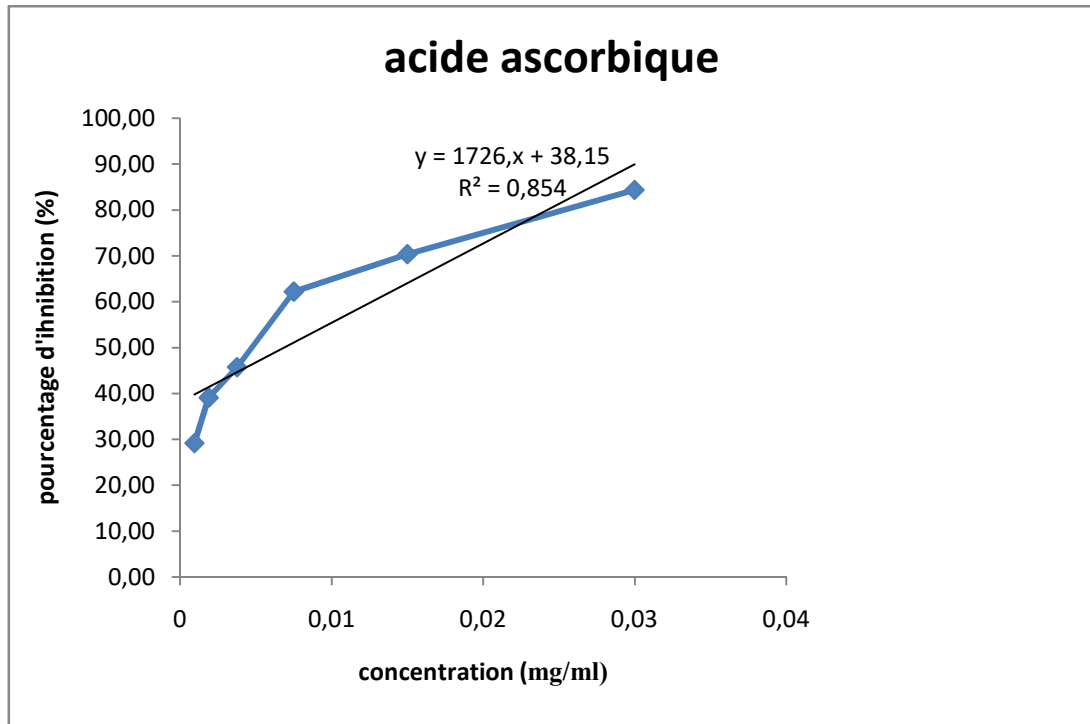


Figure 3.3 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'Ac.Asc

Détermination de la concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC₅₀)

La concentration d'inhibitrice de 50% des radicaux de l'acide ascorbique est de 0.006mg/ml et celle de l'huile essentielle du PL est de 0,331mg/ml. A force que la IC₅₀ est petite le pouvoir antioxydant est grand.

L'activité antioxydant de l'huile essentielle du lentisque est due à sa richesse en polyphénols : flavones qui sont des molécules organiques hydrosolubles. Les polyphénols naturels forment un ensemble de molécules comportant au moins un groupe phénolique dans leur structure et sont en général de haut poids moléculaire. On retrouve plusieurs sous-groupes caractérisés par la structure de leur squelette carboné. Les polyphénols sont capables de piégés des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le fer et le cuivre qui permettent de catalyser les oxydations [41].

CONCLUSION

Conclusion

Depuis plusieurs années, l'utilisation de plantes médicinales ou de préparations à base de plantes connaît un succès croissant. Aujourd'hui plus de la moitié de la population mondiale pratique la phytothérapie.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à l'extraction de l'HE du Pistacia Lentiscus par l'hydrodistillation de type Clevenger (d'où le rendement obtenu est de 0.2%) ainsi à sa caractérisation physicochimique et à la détermination de ces propriétés biologiques.

Sur le plan phytochimique, les résultats obtenus par ce travail montrent une richesse de la plante en métabolites secondaires : flavones, tannins, stérols, triterpènes et saponosides.

L'HE extraite de cette plante possède des propriétés organoleptiques très appréciées et sera convoité en aromathérapie.

Les caractéristiques physicochimiques obtenues sont comparables aux normes, dont la densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acide et l'indice d'ester.

L'étude antimicrobienne a permis de démontrer la résistance de *Escherichia coli* vis-à-vis de l'HE du Lentisque et la sensibilité de *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

Dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait intéressant de

- D'analyser et déterminer les différents composants de l'huile essentielle du Pistacia Lentiscus par CPG-SM.
- Etendre l'étude de cette huile essentielle sur d'autres activités biologique telles que l'activité anti-inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. Zehiri, D. Baudoux, huiles essentielles chemotypees et leurs synergies. Edition Inspire development. Luxembourg. 2005. 2-919905-27-9
- [2] M. Beldi, H. Merzougui, A. Lazli. Etude ethnobotanique du Pistachier lentisque *Pistacia lentiscus* L. dans la wilaya d'El Tarf (Nord-est algérien). *Ethnobotany Research & Applications*, 21(09).2021
- [3] F. Toninoli, V. Meglioli. Huiles essentielles l'encyclopédie. Judena édition, France. 2013.9782369170099.
- [4] G. Heuzé. Les plantes industrielles. Paris : imprimerie de CH. Lahure.
- [5] O. Catier, D.Roux.Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. 3^{ème} édition. Wolters Kluwer. France.2007. P978-2-915585-52-0.
- [6] A. Lucienne. Les plantes médicinales d'Algérie.2eds. Alger. BERTI Editions, 2010.
- [7] J. Verdrager. Ces médicaments qui nous viennent des plantes. Edition Maloine, Paris. 1978.
- [8] A. Chevallier. Encyclopédie des plantes médicinales : 500 plantes médicinales et leurs usages thérapeutiques. Sélection du Reader's Digest, 2014. ISBN 2924382173, 9782924382172.
- [9] O. Aissi, M.Boussaid, &C.Messaoud. Essential oil composition in natural populations of *Pistacia Lentiscus* L. From Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and anti acetyl cholin esterase activities. *Industrial Crops and Products*, 2016.
- [10] K. Boudieb. Valorisation et caractérisations physicochimique et phytochimique du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) d'Algérie et l'incorporation de la poudre des fruits dans une préparation laitière. Doctorat : Sciences Biologiques. Université M'Hamed Bouguara-Boumerdes. 2020.
- [11] <https://www.codif-recherche-et-nature.com>, 25 Avril 2021, 18:00.
- [12] S. Djedaia. Etude physico-chimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia Lentiscus*. L). Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba. 2017.
- [13] C. Keller-Didier. Les plantes médicinales. ALS. 2004.
- [14] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset. *LebensmWiss. Technol.* 28 .1995
- [15] Raven, Evert, Eichhorn. *Biologie végétale*. 2 eds. De boeck superieurs. A. Bruxelles. 2007. 978-2-8041-5020-4

BIBLIOGRAPHIE

- [16] N. Boutaghane. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista uliginosa* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Doctorat: chimie pharmaceutique. Université de Constantine 1. 2013.
- [17] M. Bammou, A. Daoudi, I. Slimani, M. Najem, E. Bouimamrine, J. Ibijbijen, L. Nassiri. Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien, *J. Appl. Biosci.* 86, 2015.
- [18] F. Lanfranchi, B. Mai, M. Girard. La fabrication d'huile de lentisque (*Lentiscus* ou chessa) en Sardaigne. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée.* 41, 2, . 81-100. 1999
- [19] M. Faucon. Aromathérapie : pratique et usuelle. Edition Sang de la terre. Paris. 2009. 978-2-86985-212-9.
- [20] N. Grosjean. Huiles essentielles : se soigner par l'aromathérapie. Eyrolles. 2004. 978-2-86985-228-0.
- [21] J. Bruneton. Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales. 3^{ème} édition. Tec&Doc. Paris. 2008. 2-7430-0315-4.
- [22] R. Hemma. Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires du lentisque (*Pistacia Lentiscus*) et étude de leurs activités biologiques. Doctorat : biologie et santé. Université Saad Dahlab de Blida. 2019.
- [23] A. Baumann. Science et huiles essentielles. L'Harmattan. Paris. 2015. 978-2-343-07469-6.
- [24] E. Teuscher, R. Anton, A. Lobstein. Plantes aromatiques : épices, aromates condiments et huiles essentielles. Tec&Doc. Paris.
- [25] N. Ouis. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre de fenouil et de persil. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1. 2015.
- [26] X. Fernandez, F. Chemat. La chimie des huiles essentielles. Vuibert. Paris. 2012. 978-2-311-01028-2.
- [27] M. Toure Daouda. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse : biochimie. Université Felix Houphouët- Boigny. 2015.
- [28] G. Aiche-Iratni. Activité biologique d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de *Pistacia Lentiscus* et d'*origanum majorana*. Thèse de Doctorat : microbiologie : Ummto, 2016.

BIBLIOGRAPHIE

- [29] O. Sarr, A. DiorfalL. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de vitex doniana (verbenacea). International journal of biological and chemical sciences 9 (3). 2015.
- [30] C.Popovici, I.Saykova, B.Tylkowski. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel. 4. 2009. 1313-8871.
- [31] Pharmacopée européenne 6^{ème} édition.
- [32] R. Ben Abdallah, D. Frikha, S. Maalej, S. Sassi. in Vitro Evaluation of the Antibacterial and Antifungal Activities of Marine Algae. 2016.
- [33] P. Martin. Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles de plantes aromatiques du Maquis Corse. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lille. 2018.
- [34] P. Minis. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). 2015.
- [35] D. Belhachat. Etude phytochimique des extraits de *PistaciaLentiscus*. Activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique- El-Harrach-Alger. 2019.
- [36] N. Amara, A. Benrima, C. Anba, H. Belkhir. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits du pistachier lentisque (*Pistacia Lentiscus* L) antimicrobial activity of the essential oil fruits of the lentisque Pistachio (*PistaciaLentiscus* l.). 9. 2019.
- [37] F. Amarti. Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Bot. Gall.*, 158. 2011.
- [38] AFNOR (Association française de normalisation). Recueil des normes françaises. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés. Paris, la Défense. 327. 1981-1982.
- [39] A. Zitouni. Profil polyphénolique et activité antioxydante de deux plantes médicinales *Pistacialentiscus*. L et *Gymnocarposdecander*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 2017.
- [40] R. Deschepper. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie. 2017.
- [41] A. Guillouty. Plantes médicinales et antioxydants. Université de Toulouse III Paul Sabatier, 2016.

Annexe

ANNEXES

Annexe 1 : Tests d'identification des composés phytochimiques des feuilles

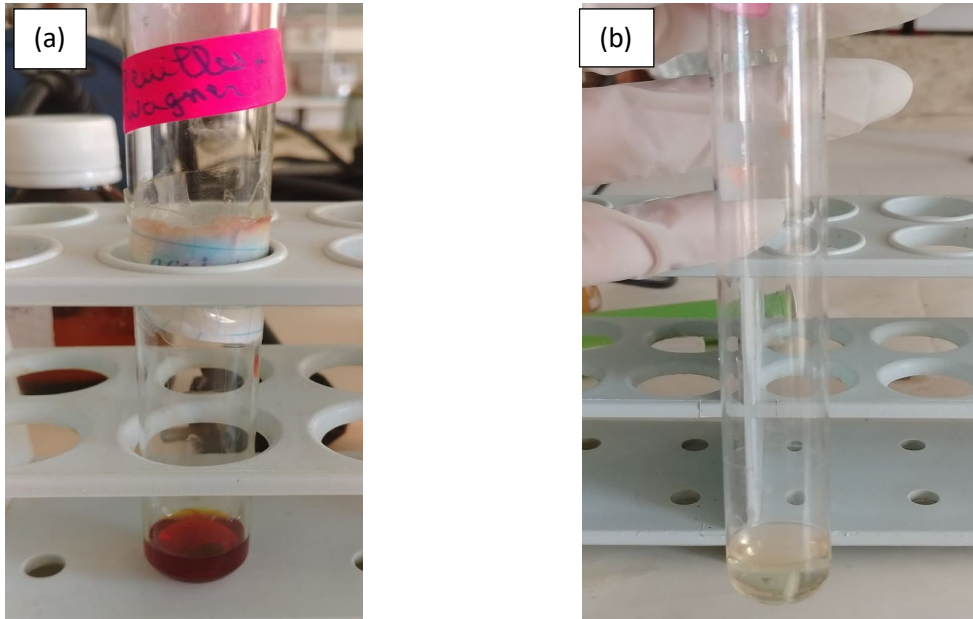


Figure 1 : Identification des alcaloïdes avec le réactif de Wagner (a) et Mayer (b)

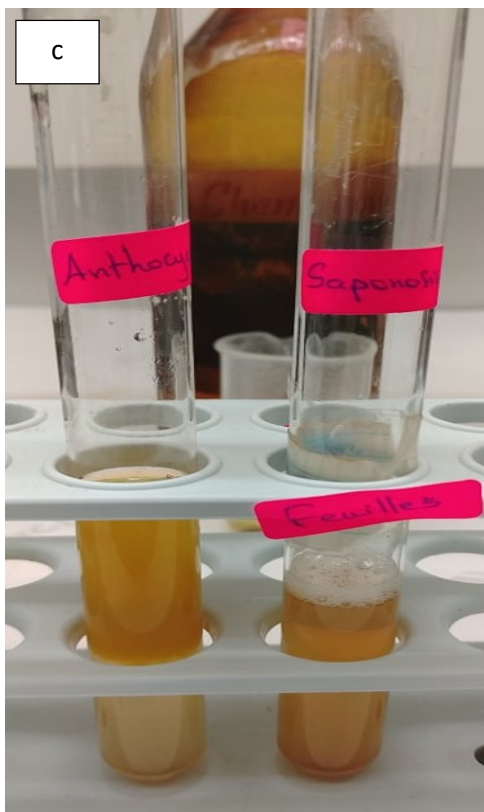


Figure 2 : Identification des anthocyanes (c) et des saponosides (d)

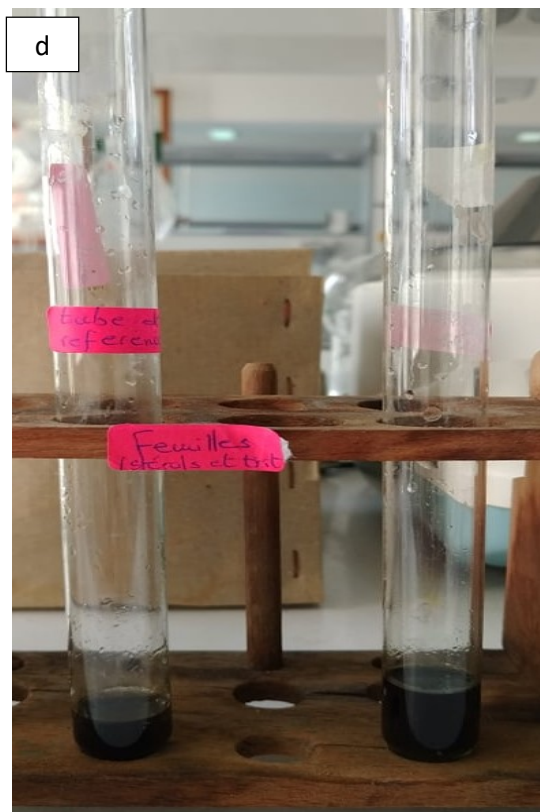


Figure 3 : Identification des stérols et des triterpènes

ANNEXES

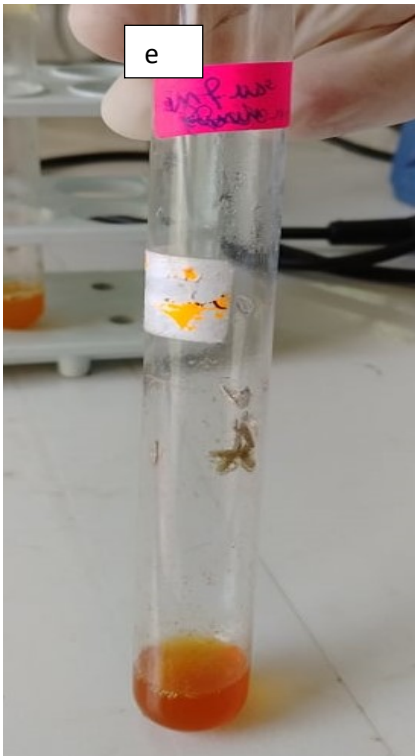


Figure 4 : Identification des flavonoïdes (e)



Figure 5 : Identification des mucilages (f)

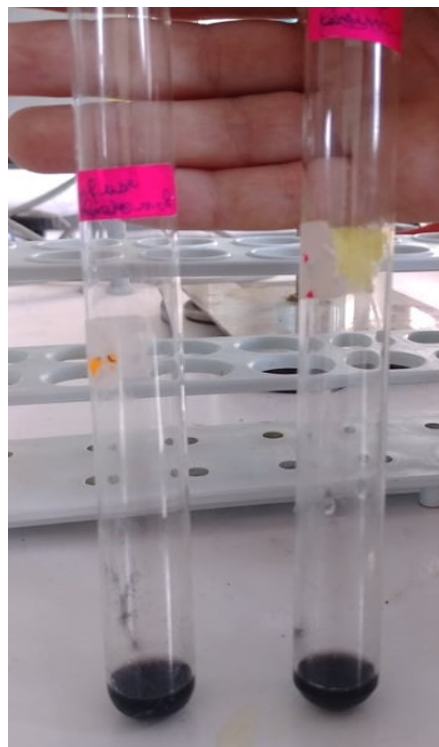


Figure 6 : Identification des tannins

ANNEXES

Annexe 2 : Tests d'identification des composés phytochimiques des tiges

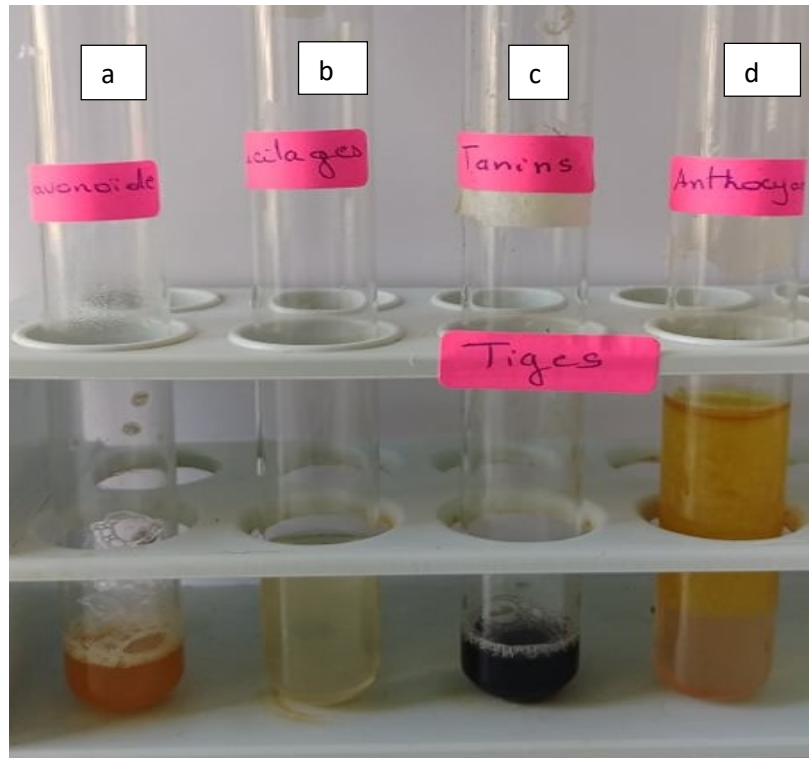


Figure 1 : Identification des flavonoïdes (a), mucilages (b), tannins (c), anthocyanes (d)

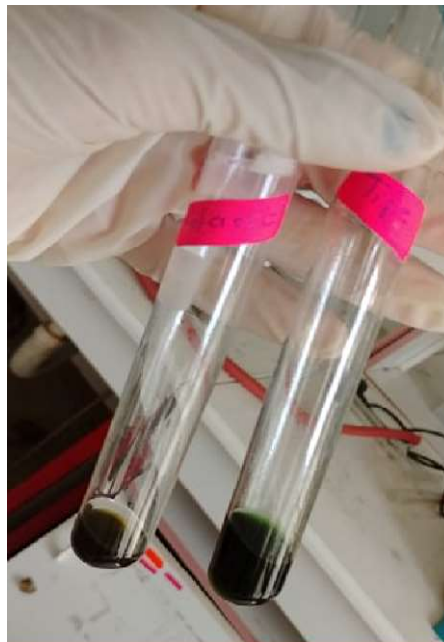


Figure 2 : Identification des stérols et triterpènes

ANNEXES

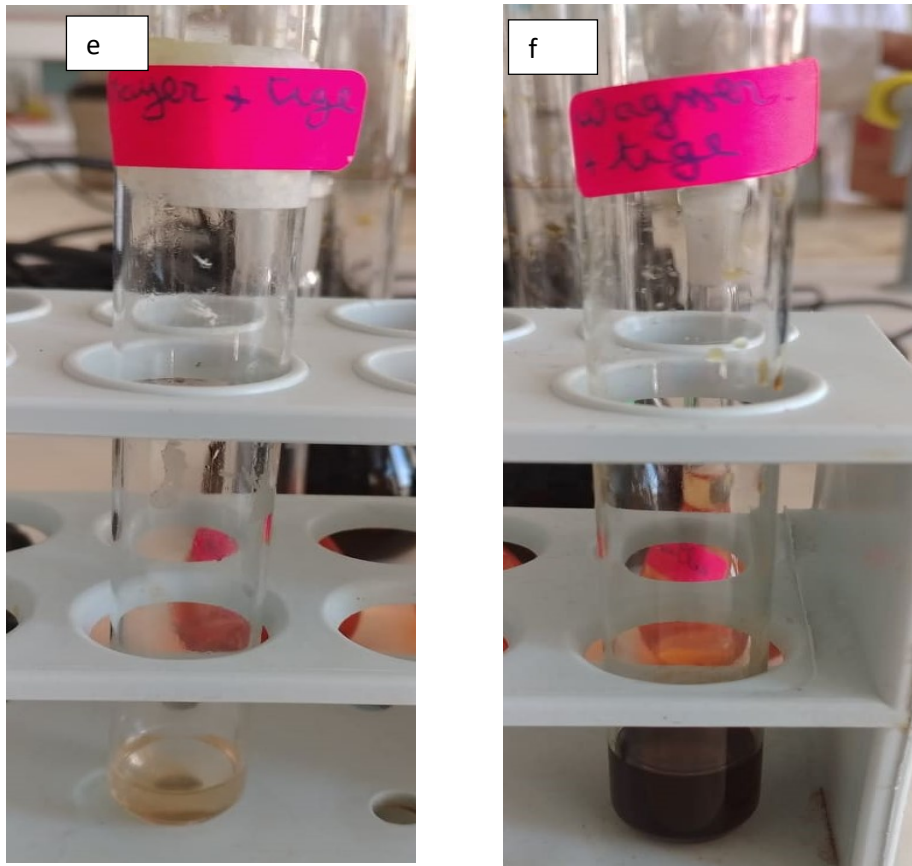


Figure 3 : Identification des alcaloïdes par le réactif de Mayer (e) et réactif de Wagner (f)

ANNEXES

Annexe 3 : Tests d'identification des composés phytochimiques des racines

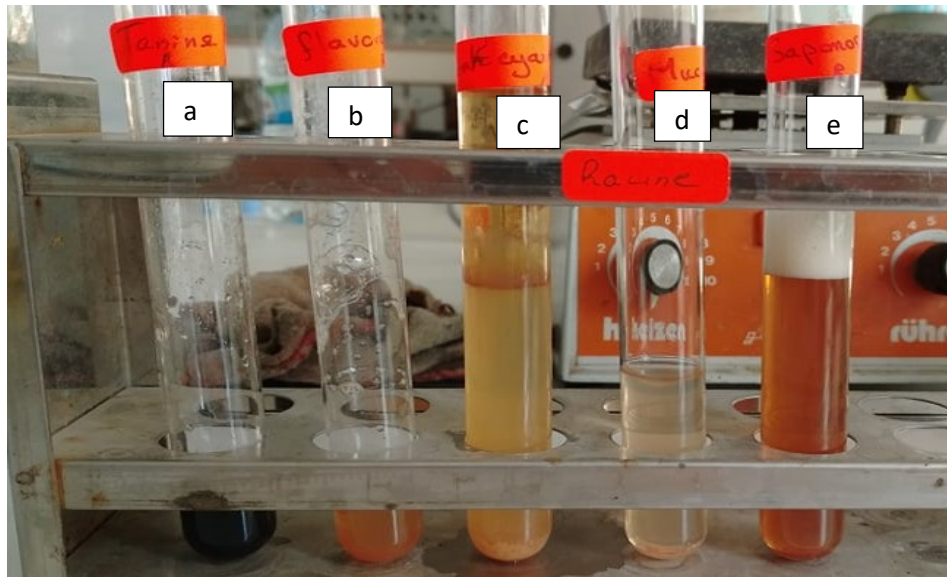


Figure 1 : Identification des tannins (a), flavonoïdes (b), anthocyanes (c), mucilages (d), saponosides (e)



Figure 2 : Identification des alcaloïdes par le réactif de Mayer (f) et le réactif de Wagner (g)

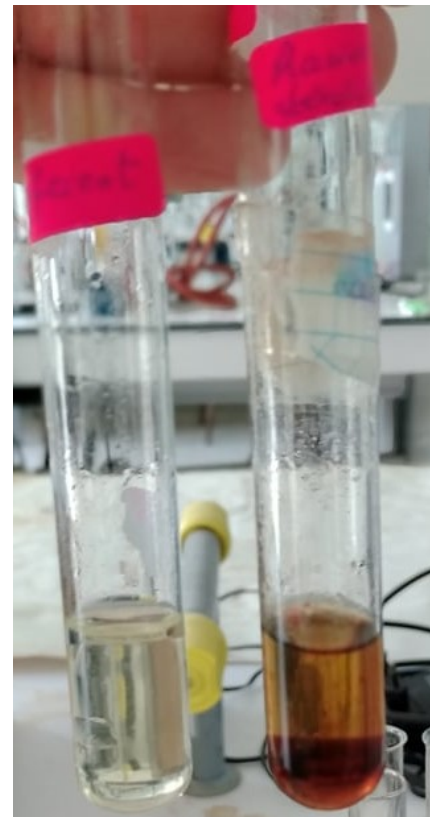


Figure 3 : Identification des Stérols et triterpènes

ANNEXES

Annexe 4 : Examen microscopique de l'Aspergillus niger et Candida albicans

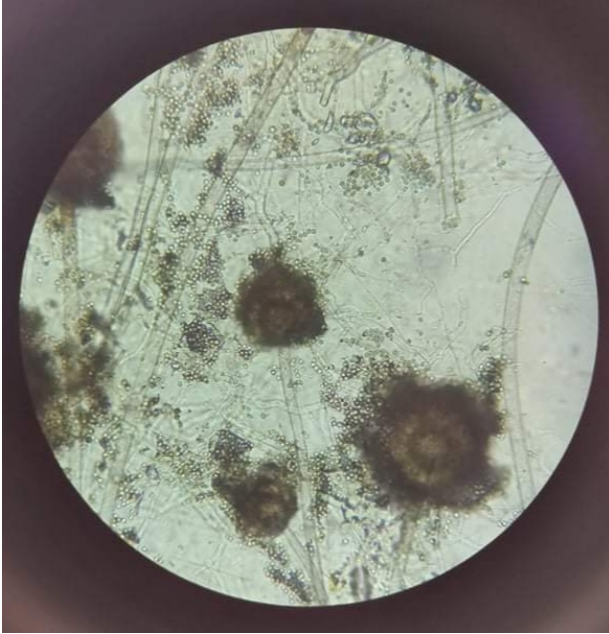


Figure 1 : Aspergillus niger

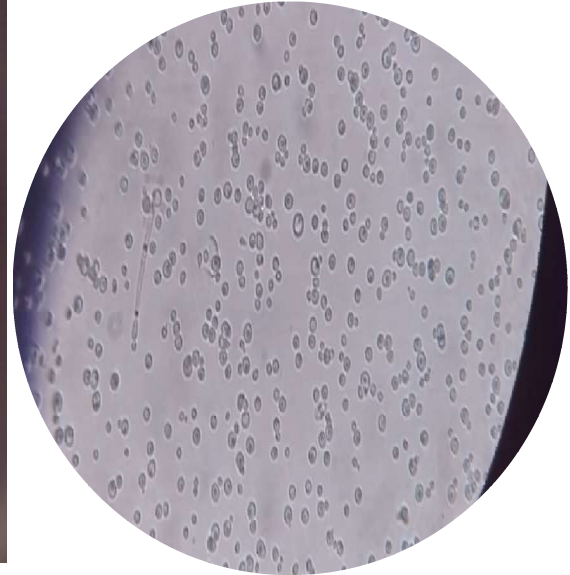


Figure 2 : Candida albicans

Résumé

Cette étude vise à extraire, à caractériser l'huile essentielle du *Pistacia Lentiscus* et à évaluer son activité biologique. La plante a été récoltée au sud-est de la wilaya de Tizi-Ouzou en Algérie. L'extraction de l'huile essentielle a été faite par la méthode de l'hydrodistillation de type Clevenger et le rendement obtenu est de 0.28%. Les tests phytochimiques réalisés sur la plante ont révélé l'existence de plusieurs métabolites secondaires principalement les triterpènes et les tannins. L'activité antimicrobienne de l'huile extraite s'est avérée variable selon la nature de la souche testée avec une sensibilité de *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans* vis-à-vis de l'huile essentielle. L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de réduction du radical DPPH. Les résultats obtenus révèlent que l'huile essentielle de *Pistacia Lentiscus* présente un pouvoir antioxydant un peu faible par rapport à l'acide ascorbique d'où leurs IC_{50} est respectivement de 0,331 mg/ml et 0,006mg/ml.

Mots clés : *Pistacia Lentiscus*, huile essentielle, hydrodistillation, activité antimicrobienne, activité antioxydante, DPPH.

Abstract

This study aims to extract and characterize the essential oil of *Pistacia Lentiscus* and to evaluate its biological activity. The plant was harvested in the south-east of the wilaya of Tizi-Ouzou in Algeria. The extraction of the essential oil was done by the Clevenger hydrodistillation method and the yield obtained was 0.28%. The phytochemical tests carried out on the plant revealed the existence of several secondary metabolites, mainly triterpenes and tannins. The antimicrobial activity of the extracted oil was found to be variable depending on the nature of the strain tested with sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* towards the essential oil. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH radical reduction method. The results obtained reveal that the essential oil of *Pistacia lentiscus* presents a weak antioxidant power compared to ascorbic acid, hence their IC_{50} is respectively 0.331mg/ml and 0.006mg/ml.

Keywords: *Pistacia Lentiscus*, essential oil, hydrodistillation, antimicrobial activity, antioxidant activity, DPPH.