

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

***EVALUATION DU POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UNE SERIE
D'EXTRAITS DE QUATRE PLANTES MEDICINALES***

Présenté par : **BOURSLIA
HACENE**

**Thinhinane
Ilham Rahil**

Soutenu publiquement, le 01 / octobre / 2022, devant le Jury composé de :

DERRIDJ Fazia	Professeur	UMMTO	Président
FERNANE Farida	Professeur	UMMTO	Encadreur
MANSOUR Malika	MCB	UMMTO	Examineur
ZERROUKI Nacira	Professeur	UMMTO	Co-Encadreur

Remerciements

Avant tout, nous remercions le bon Dieu, le tout puissant, de nous avoir accordé la force et la patience pour mener à terme ce modeste travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements à notre encadreur Madame FERNANE Farida, pour son dévouement, sa gentillesse et la patience dont elle a fait preuve afin que ce travail se fasse dans de bonnes conditions. Nous la remercions pour sa disponibilité et son assistance qui ont assuré le bon déroulement de notre projet de fin d'étude.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude à notre Co-encadreur, Madame ZERROUKI Nacira qui a été d'une aide précieuse, à travers ses explications et ses conseils.

Nous remercions les membres du jury, Madame DERRIDJ Fazia, d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance et Madame MANSOUR Malika qui nous fait le grand honneur d'évaluer ce travail.

Nous adressons un grand merci aux ingénieurs des laboratoires pédagogiques du département chimie de la faculté des Sciences de l'UMMTO. Nous citons en particulier : Mme BELGAID Sadjia ; ingénieur du laboratoire d'Electrochimie, Mmes KACI Célia" et Souad ; ingénieures du laboratoire de Chimie organique et Mme BOUABDELLAH Salih, ingénieur principal des laboratoires. Enfin, nous tenons à remercier Monsieur FETMOUCHE Karim, responsable du magasin de matériel et produits chimiques, pour sa disponibilité et sa précieuse aide.

Nous remercions également le personnel du laboratoire de microbiologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi ousou, pour nous avoir permis d'effectuer les tests antibactériens.

Pour en finir, nous adressons un grand merci à nos amis et à nos familles pour nous avoir encouragées et soutenues durant la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces,

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés je n'arriverai jamais à leurs exprimer mon amour sincère :

A ma très chère maman, à la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargnée aucun effort pour me rendre heureuse. Quoi que j'en fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit, Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles,

A mon adorable sœur, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille,

A tous mes proches, mes cousins, mes cousines et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité,

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite beaucoup de succès,

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

TINA

Dédicaces,

Je dédie ce travail à ma famille qui m'a doté d'une éducation digne. Son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

Particulièrement à mon père pour le goût à l'effort qu'il a suscité en moi, de par sa rigueur,

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flemme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, ma très chère maman,

À ma chère sœur Amel qui n'a jamais cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu la protège et lui offre la chance et le bonheur,

À mon adorable petite sœur Kika, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille. Qui a toujours été à mes côtés et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Ainsi qu'à son mari qui n'a pas cessé de me soutenir,

À mes chers frères, Amar et Mouloud, qu'ils trouvent ici l'expression de mes grands attachements et le témoignage de mes immenses affections en leurs souhaitant la réussite et tout le bonheur du monde. À tous mes proches, mes cousins spécialement Khtitouche et Walid.

À mes amis et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité. À ma très chère amie Wiwi, qui malgré son absence, demeure toujours dans mon cœur.

Rahil

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Thymus numidicus</i> L.....	04
Figure 2 : <i>Lavandula stoechas</i> L.....	05
Figure 3 : <i>Origanum glandulosum</i> Poiret.....	06
Figure 4 : Feuilles et fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	06
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes	09
Figure 6 : Structure d'un tanin hydrolysable.....	10
Figure 7 : Structure de base des tanins condensés.....	10
Figure 8 : Dispositif Soxhlet utilisé lors de l'extraction des métabolites secondaires.....	17
Figure 9 : Réaction de DPPH en présence d'un antioxydant AH.....	21
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance des solutions d'acide gallique mesurées à 765 nm.....	31
Figure 11 : Teneur en composés phénoliques contenus dans les extraits des feuilles et tiges de lentisque ainsi que les sommités de lavande.....	32
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	33
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des feuilles de lentisque.....	34
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des tiges du lentisque.....	34
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des sommités de lavande.....	35
Figure 16 : Valeur d'IC 50 des extraits polyphénoliques des feuilles et tiges de lentisque, des sommités de lavande et de l'acide gallique	35
Figure 17 : Evolution du pouvoir réducteur des extraits des feuilles et tiges de lentisque, des sommités de lavande et de l'acide ascorbique.....	36
Figure 18 - Activité antibactérienne des trois huiles essentielles et l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes A : <i>S. Aureus</i> ; B : <i>E. Coli</i>	37
Figure 19 - Activité antibactérienne de l'association de chaque huile essentielle avec l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes A : <i>E. Coli</i> ; B : <i>S. Aureus</i>	39

Figure 20 - Activité antibactérienne du mélange des trois huiles essentielles et de leur association deux à deux vis-à-vis des deux souches bactériennes.....	40
Figure 21 - Activité antibactérienne du mélange des deux huiles essentielles avec l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes.....	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition chimique en % des principaux composés détectés par analyse GC/MS des huiles essentielles LS, TN, OG	15
Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées	23
Tableau 3 : Paramètres physico-chimiques de l'huile végétale de pistacia lentiscus.....	26
Tableau 4 : Rendement d'extraction avec différents solvants, par décoction et macération, des métabolites secondaires contenus dans les sommités de <i>Lavandula Stoechas</i>	27
Tableau 5 : Rendement d'extraction avec différents solvants, par décoction et macération, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles de <i>Pistacia Lentiscus</i> .	27
Tableau 6 : Rendement d'extraction avec un mélange de solvants, par décoction au bain marie et bain de sable et par macération, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles de <i>Pistacia Lentiscus</i>	28
Tableau 7 : Rendement d'extraction avec un mélange de solvants, par décoction au bain marie et bain de sable, des métabolites secondaires contenus dans les sommités de <i>Lavandula Stoechas</i>	29
Tableau 8 : Rendement d'extraction (en %) par Soxhlet et avec deux solvants, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles et tiges de <i>Pistacia Lentiscus</i>	29
Tableau 9 : Rendement d'extraction (en %) par Soxhlet et avec deux solvants, des métabolites secondaires contenus dans les sommités de <i>Lavandula Stoechas</i>	29
Tableau 10 : Résultats du Screening phytochimique sur les extraits de feuilles de Lentisque et sommités de Lavande.....	31
Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition des différents extraits polyphénoliques.....	33
Tableau 12 : Diamètres d'inhibition (mm) de l'huile végétale <i>L. Pistachier</i> et les huiles essentielles <i>L. Stoechas</i> , <i>T. Numidicus</i> et <i>O. Glandulosum</i> vis-à-vis de la croissance des bactéries <i>E. Coli</i> et <i>S. Aureus</i>	37
Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition enregistrés avec les mélanges huile végétale de lentisque et chacune des trois HEs vis à vis des deux souches bactériennes.....	39
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition enregistrés avec le mélange des différentes HEs vis à vis des deux souches bactériennes.....	41

Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition de l'association (huile végétale+ huiles essentielles) vis-à-vis de la croissance des deux bactéries..... **42**

Liste des abréviations

A. Ascorbique : acide ascorbique.

Abs : absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : American type culture collection.

C.H.U : centre hospitalier universitaire.

Cppt : concentration des polyphénols totaux.

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

FRAP : ferric reducing antioxidant power.

E.coli : *Escherichia coli*

GC/MS (CG/SM) : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HE : Huile essentielle

HV : huile végétale

HPLC : high performance liquid chromatography.

IC50 : concentration inhibitrice à 50%.

M : mole.

MC : million de cellules

mg AGE/ g E : milligramme d'acide gallique équivalent par gramme d'extrait.

MH : Muller-Hilton.

nm : nanomètre.

OMS : organisation mondiale de la santé.

pH : potentiel hydrogène.

S.aureus : Staphylocoque aureus

tr/min : tour par minute.

UV : ultraviolet.

°C : degré celsius.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction	1
--------------------	----------

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

1- introduction.....	03
2- Famille des Lamiaceae.....	03
2-1- <i>Thymus numidicus</i>.....	03
2-2- <i>Lavandula stoechas</i>.....	04
2-3- <i>Origanum glandulosum</i>.....	05
3- Famille des Anacardiaceae.....	06
3-1- Lentisque pistachier	
4- Huiles essentielles.....	07
5-Huiles végétales.....	08
6- Métabolites secondaires	08
6-1- Alcaloïdes	08
6-2- Terpènes	08
6-3- Stérols	09
6-4- Saponines.....	09
6-5- Flavonoïdes	09
6-6- Tanins.....	09
6-7- Coumarines.....	10
7- Procédés d'extraction des métabolites secondaires	11
7-1- Macération.....	11
7-2- Décoction.....	11
7-3- Extraction par Soxhlet	11
8- Dosage des polyphénols.....	11
9- Activité antioxydante des extraits de végétaux.....	11
9-1- Les antioxydants.....	11
9-2- Les radicaux libres.....	12
9-3- Sources d'antioxydants.....	12

10- Activités antibactériennes des huiles essentielles.....	13
Chapitre II : Matériels et méthodes	
1-Matériel	14
2-Méthodes.....	14
3-Evaluation des propriétés physicochimiques de l'huile végétale de Lentisque.....	14
3-1- Densité relative à 20°C.....	14
3-2- Indice de réfraction à 20°C.....	15
3-3- Indice d'acide.....	15
3-4- Indice de peroxyde.....	15
3-5- Indice de saponification.....	16
3-6- Indice d'ester.....	16
4-Extraction des métabolites secondaires.....	17
4-1- Recherche des alcaloïdes	18
4-2- Recherche des tanins catéchiques et des tanins galliques.....	18
4-3- Recherche des polyphénols.....	
4-3-1- Mise en évidence et dosage des polyphénols.....	18
4-3-2- Dosage des polyphénols totaux.....	
4-4- Recherche des flavonoïdes.....	19
4-5- Recherche des composés réducteurs et dosage de l'activité antioxydante.....	19
4-6- Recherche des Stérols et des Triterpènes.....	19
4-7- Recherche des coumarines et des saponines.....	19
5-Dosage des phénols totaux	19
6-Activité antioxydante.....	20
6-1- Méthode de piégeage du DPPH.....	20
6-2- Méthode de réduction du fer (FRAP).....	21
7-Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre huiles.....	22
7-1- Milieu de culture	23
7-2- Ensemencement.....	23
7-3- Test de l'antibiogramme.....	23

7-4- Incubation et lecture.....	24
---------------------------------	----

Chapitre III : Résultats et discussions

1-Composition chimique des trois huiles essentielles.....	25
2-Propriétés physicochimiques de l’huile végétale de lentisque.....	25
3-Extraction des métabolites secondaires et screening phytochimique.....	26
3-1- Extraction des métabolites	26
3-2- Screening phytochimique.....	30
4-Dosage des polyphénols totaux	31
5-Mesure de l’activité antioxydante.....	32
5-1- Détermination du pourcentage de capture du radical DPPH.....	32
5-2- Test de la réduction du fer (FRAP).....	36
6-Activité antibactérienne des différentes huiles.....	37
6-1- Activité antibactérienne des quatre huiles prises séparément.....	37
6-2- Activité antibactérienne des mélanges HE/huile végétale.....	38
6-3- Activité antibactérienne des mélanges entre huiles essentielles.....	40
6-4- Activité antibactérienne du mélange de deux huiles essentielles avec l’huile végétale.....	41
Conclusion.....	44

Références bibliographiques

Annexes



Introduction générale

Introduction

A travers des siècles, l'être humain a su développer les connaissances et l'usage des plantes médicinales dans le but de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé et le bien être humain (**Iserin, 2001**).

Ces dernières décennies, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être utilisés pour se protéger contre les effets du stress oxydant lequel est à l'origine de plusieurs pathologies tels que le cancer. En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires (**Iserin, 2001**).

Les chercheurs s'intéressent aussi aux composés biologiquement actifs isolés des espèces végétales pour l'élimination des microorganismes pathogènes en raison de la résistance que ces derniers développent vis à vis des antibiotiques d'origine synthétique (**Iserin, 2001**).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité: méditerranéenne, saharienne et paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Parmi cette végétation, nous trouvons les plantes aromatiques utilisées pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales (**Quezel, et Santa 1963**).

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne nous nous sommes intéressés à trois espèces de la famille des Lamiaceae et une de la famille des Anacardiaceae. Les espèces sur lesquelles a porté notre choix sont *Thymus numidicus* ; *Lavandula stoechas* et *Origanum glandulosum* de la famille des Lamiaceae et *Pistacia lentiscus*. Notre choix pour ces espèces est justifié d'une part par le fait qu'elles renferment beaucoup de composés phénoliques notamment les flavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses. D'autre part, ces espèces figurent en tête de liste des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle Algérienne.

Ce présent mémoire comporte trois chapitres et une conclusion générale. Les trois chapitres sont répartis comme suit :

- Le premier chapitre, comporte une synthèse bibliographique consacrée à une présentation des espèces *Thymus numidicus*, *Lavandula stoechas*, *Origanum glandulosum* et *Pistacia lentiscus*. Ainsi qu'une brève synthèse des travaux antérieurs concernant les huiles essentielles et les métabolites secondaires les plus courants.

Introduction

- Le second chapitre est consacré à la partie expérimentale.
- Le dernier chapitre comporte la présentation des principaux résultats obtenus et leurs éventuelles interprétations.



Chapitre I :

Synthèse bibliographique



1- Introduction

De tout temps, le règne végétal a offert à l'être humain des ressources naturelles pour ses soins ; hygiène et alimentation (**Kabouche 2005 ; Benayache 2013 ; Touhami, 2017**).

Depuis trois décennies, des études sont menées sur l'exploitation, dans différents domaines, des extraits des plantes aromatiques et médicinales (PAM), notamment leurs huiles essentielles (**Benayache, 2013**).

Selon la norme AFNOR NF T 75-006, les huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Elles dégagent une odeur caractéristique et sont, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (**Essawi et al., 2000**).

Dans le cadre de notre présent travail, nous nous intéressons à trois espèces de la famille des Labiées et une espèce de la famille des Anacardiaceae. Il s'agit des espèces *Lavandula stoechas*, *Thymus numidicus* et *Origanum glandulosum* de la famille des *Lamiaceae* et de *Pistacia lentiscus* pour la famille des Anacardiaceae.

2- Famille des Lamiaceae

Les Lamiaceae, ou encore les Labiées, sont une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6700 espèces et près de 250 genres. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, productrices d'huiles essentielles, largement répandus autour du monde (**Miller et al, 2006**).

Parmi les espèces réputées dans cette famille, nous pouvons citer le *Lavandula Stoechas*, le *Thymus numidicus* et l'*Origanum glandulosum* auxquelles nous nous intéressons dans ce présent travail.

2-1- *Thymus numidicus*

Le terme *thymus* signifie en latin "parfumer" et en grec "courage" (**Benayache 2013**). Son nom vernaculaire en arabe est "Zâatar" (**Kabouche 2005**).

Le genre *thymus* est composé d'environ 110 espèces (**Dimitrios et al. 2015**). C'est un petit arbrisseau qui ne dépasse pas les 20 cm. Ses feuilles florales nettement plus larges comportent des fleurs roses sessiles ou presque pelouse (**figure 1**)

En Algérie, *T. Numidicus* est répartie le long du territoire national. Du Nord Algérois à l'Atlas saharien et du Constantinois à l'Oranais, il préfère les montagnes surtout les endroits rocheux (**Touhami, 2017**).



Figure 1 – Photo de l'espèce *Thymus numidicus* (photo originale)

Thymus numidicus possède des propriétés antiseptiques, antifongiques, désinfectantes et anti oxydantes (**Djeddi et al. 2015**). Il est utilisé par voie orale pour traiter les perturbations gastro-intestinales, la toux due au froid, la bronchite, l'angine, les douleurs dentaires et les infections de la bouche (aphtes, gingivites) ainsi que les maladies de la peau (acné, eczéma, varicelle...) (**Zeghib 2013**)

2-2- *Lavandula stoechas*

Le terme *Lavandula* dérive du latin "lavare" qui signifie "laver" (**Menaceur 2015**). Son nom vernaculaire en arabe est "El halhal" et en Kabyle "Amzir" (**Tedjani 2016**).

Cette espèce originaire du pourtour méditerranéen (Europe méridionale, l'Afrique du nord, et le moyen orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie – Egypte (**Lis-Balchin, 2002 ; Lim, 2014**), s'accommode aux divers types de sols sauf ceux qui seraient exagérément humides. Elle préfère les sols siliceux et les terrains acides. La floraison, plus précoce que chez les autres lavandes, se déroule d'Avril à Mai puis en automne (**Peter, 2004 ; Lim, 2014**).

Elle se présente sous la forme d'arbrisseau vivace très aromatique et ramifié pouvant atteindre un mètre de haut avec une lourde odeur semblable à celle du pin. Les feuilles opposées de 2 à 4cm de longueur sont sessiles, tomenteuses, oblongues, linéaires, étroites, et recourbées sur les bords. Elles sont souvent grises (**Figure 2**).



Figure 2 - Photo de l'espèce *Lavandula stoechas* (photo originale)

Lavandula stoechas est utilisée pour traiter l'épilepsie et les maux de tête et possède des propriétés antispasmodiques, antimicrobiennes, anti oxydantes, insecticides, anti-inflammatoires, expectorantes et antidépresseurs (Dif et al. 2016 ; Gainard 2016 ; Lamiae et al. 2016). Elle est également utilisée pour régulariser le taux de glycémie dans le sang (Menaceur 2015).

De plus, la commission Européenne a approuvée l'usage interne de la lavande, en infusion et en huile essentielle, pour le traitement de l'agitation et de l'insomnie ainsi que pour les troubles digestifs d'origine nerveuse (malaises intestinaux, ballonnements).

2-3- *Origanum glandulosum*

Le terme *Origan* provient de deux mots grecs "oros" et "genos", signifiant "éclat des Montagnes" (Piccaglia R 1993)

L'Origanum glandulosum pousse spontanément dans tout le nord de l'Afrique en particulier dans les montagnes à une altitude de 300 à 1600 m, surtout dans les endroits rocheux (Ietswaart JH 1980).

Selon Quezel et Santa (Quezel P 1963), l'espèce *Origanum* est une plante à tiges toutes dressées. L'inflorescence est en épis denses, à fleurs restant contigües après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure (Figure3).

L'Origanum glandulosum est utilisée dans les préparations culinaires et jouit d'une grande faveur populaire comme remède contre la toux et les infections respiratoires. En effet, cette plante expectorante, stomachique, stimulante, tonique possède des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antitussives (Baba Aissa F 1999). Elle est aussi utilisée comme désinfectant puissant, et comme agent odoriférant dans les parfums (Chiej R 1984).



Figure 3 - Photo de l'espèce *Origanum glandulosum*
(David j. stang. First published at ZipcodeZoo.com)

3- Famille des Anacardiaceae

La famille des Anacardiaceae regroupe des plantes dicotylédones. Selon Watson et Dallwitz, elle comprend environ 600 espèces réparties en 70 genres. Ce sont des arbres ou des arbustes des régions tempérées (bassin méditerranéen) à tropicales. On le trouve à l'état naturel dans tout le nord algérien (Quezel et Santa, 1993).

Parmi les espèces de cette famille qui nous intéresse, nous citons le *Pistacia lentiscus*.

Le *Pistacia lentiscus* est une plante à feuillage persistant; se dénomme en dialecte algérien dans la région de Jijel "*dhro*" et en kabylie "*tidekt*" (Figure 4). C'est un arbuste de 1 à 3 mètres de hauteur, d'origine méditerranéenne (Belakhdar, 2003). Résineux, aromatique à croissance très lente, il pousse à l'état sauvage dans les garrigues, les maquis, les rocailloux secs, clairières et bois clairs et sur tous types de sol.

Le *Pistacia lentiscus* joue un rôle fondamental dans l'entretien des écosystèmes par sa forte résistance aux changements climatiques. Il donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs.



Figure 4 - Feuilles et fruits du *Pistacia lentiscus* (Bammou et al,2015)

Le lentisque est utilisé sous forme de poudre, ou décoction, d'écorce et de feuilles pour traiter les troubles gastro-intestinaux, l'eczéma, la diarrhée et les infections de la gorge (**Kivçak et Akay, 2005**).

L'huile extraite des fruits, servant de liniment en cas de douleurs dorsales, conseillé pour les diabétiques, pour le traitement des douleurs d'estomac et en cas de plaies (**Hmimsa, 2004**). En application locale externe, elle est appliquée sous forme d'onguent pour soigner les brûlures (**Bensegueni et al, 2007**).

4- Les huiles essentielles

Selon la pharmacopée européenne, l'huile essentielle est définie comme "Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou 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 (**Lehman Hélène 2013**).

Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux. Elles peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les fruits, les écorces et les graines (**Taleb-Toudert 2015**)

L'analyse physico-chimique des huiles essentielles peut être effectuée par diverses techniques plus au moins élaborées. La chromatographie en phase gazeuse sur phases stationnaires polaires ou apolaires couplées avec une détection par spectrométrie de masse est une technique de référence qui présente de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques) et des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine...etc). Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe (**Gaborieau 2015**).

Les principaux référentiels tels que la Pharmacopée Européenne, ISO, AFNOR, définissent la qualité des huiles essentielles en recourant à des méthodes beaucoup plus simples telles que : (**Gaborieau 2015**)

- Indices physiques : densité relative, indice de réfraction, solubilité dans l'alcool...
- Indices chimiques : indice d'acide, indice d'esters, indice de peroxyde...

5- Les huiles végétales

En général, les huiles végétales proviennent de la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau et se trouvent enfermées dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes (Salas *et al.*, 2009).

Retrouvées dans l'enveloppe charnue du fruit, ces huiles sont présentes dans plusieurs plantes notamment des fruits du palmier et de l'olivier, de l'arachide, des fleurs de tournesol, ou encore du coton et du soja. Au-delà du secteur agro-alimentaire, les huiles végétales sont utilisées dans différents domaines de l'industrie tels que les secteurs cosmétique, pharmaceutique ou chimique.

Une huile végétale est un mélange à consistance liquide ou semi-liquide à température ambiante, de substances majoritairement hydrophobes, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires, non volatiles : on parle alors d'huile fixe ou grasse (Karleskind A., 1992 et FAO, 1993).

Les huiles végétales s'extraient naturellement par compression de la matière qui les contient, préalablement concassée. La compression est exercée à froid ou à chaud.

6- Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique (Macheix Jean-Jacques *et al.* 2005).

Ils sont utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (Macheix Jean-Jacques *et al.* 2005).

Parmi les familles de métabolites secondaires qui suscitent notre intérêt, nous pouvons distinguer les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les coumarines ...etc.

6-1- Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques comme la morphine et la codéine (Muanda Nsemi F, 2010).

6-2- Terpènes

Les terpènes, forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ils sont des dérivés de l'isoprène C₅H₈. Leur squelette de carbone

est constitué d'unités isopréniques reliées entre elles. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien sous forme des cycles (**Muanda Nsemi F,2010**).

6-3- Stérols

Les stérols sont des dérivés des phytostérols. Ils sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle (**Muanda Nsemi F,2010**).

6-4- Saponines

Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Une saponine est un glycoside de stéroïde ou de tri terpène (**Muanda Nsemi F,2010**).

6-5- Flavonoïdes

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**De Rijke E,2006**). On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Iwueke A.V,2008**) Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels poly phénoliques (**Figure 5**)

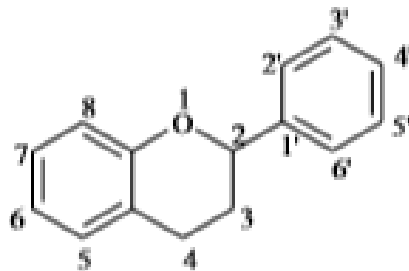


Figure 5- Structure de base des flavonoïdes (**Medi-Saric et al., 2004**)

6-6- Tanins

Les tanins sont un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire. Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (**Muanda Nsemi F, 2010**). Nous distinguons les tanins hydrolysables et les tanins condensés :

- **Tanins Hydrolysables** : Ce sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère (**Figure 6**).

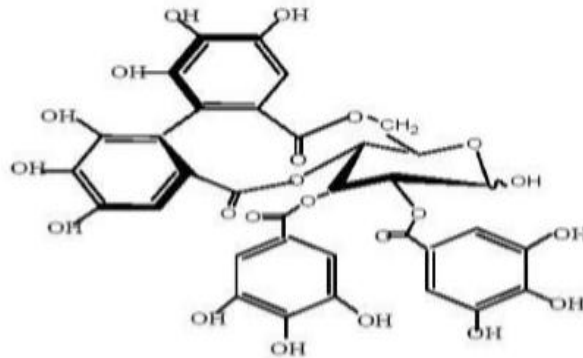


Figure 6 - Structure d'un tanin hydrolysable (**Hatano et al., 2005**)

- **Tanins condensés** : Ce sont des poly phénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes (**Figure 7**).

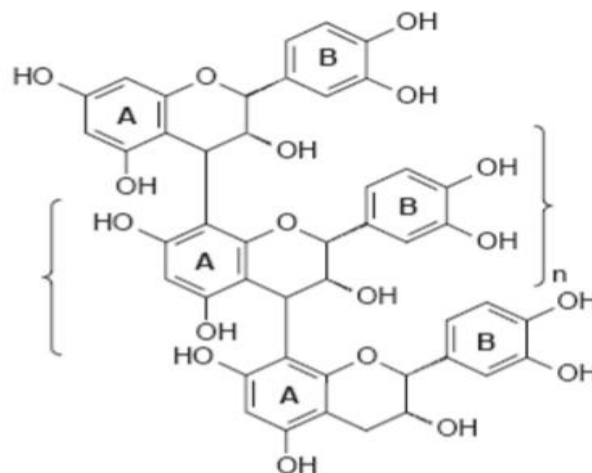


Figure 7 -Exemple de structure de base des tanins condensés (**Ferradji, 2011**).

6-7- Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Muanda Nsemi F, 2010**)

7- Procédés d'extraction des métabolites secondaires

7-1- Macération

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide discontinue qui consiste à faire tremper une partie d'un végétal dans un solvant froid ou chaud pour en extraire les substances d'intérêts (**Yazag 2011**).

7-2- Décoction

Elle consiste à chauffer une partie d'un végétal avec un solvant (eau, alcool...) jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante, pour en extraire les substances actives (**Kalla 2012**).

7-3- Extraction par Soxhlet

Cette technique permet de faire en continu l'épuisement de matières végétales avec un solvant volatil. Elle consiste à placer l'échantillon dans une cartouche poreuse et l'extraction se fait en continu jusqu'à épuisement de l'échantillon.

L'opération est équivalente à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations.

8- Dosage des polyphénols dans les végétaux

La quasi-totalité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits des végétaux sont attribuées aux polyphénols présents. Le dosage de ces polyphénols est souvent effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdiques ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 755-770 nm (**Chaabi, 2008**).

L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (Acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans un extrait. La lecture de l'absorbance se fait à 765 nm (**Chaabi, 2008**).

9- Evaluation de l'activité anti oxydante des extraits de végétaux

9-1- Les antioxydants

Des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et des métaux de transition (**Ekoumou, 2003**). Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont : l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles ROOH, le

radical superoxyde, les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxydes RO (**Cavin A.**) Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines. (**Ahamet S,2003**).

9-2- Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques (**Muanda Nsemi F,2010**).

9-3- Sources d'antioxydants

Certaines classes thérapeutiques telles que les AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), les β -bloquants et antihypertenseurs sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (**Ahamet S,2003**).

Le plus simple des capteurs des radicaux libres est l'alcool éthylique, agent de transfert d'hydrogène qui conduit à un composé biologiquement compatible.

- **Acide ascorbique : Vitamine C**

L'acide ascorbique contient une forme ènediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'hydrogène. Cette forme est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase. Elle joue un rôle important dans la régénération de vitamine E (**Bossokpi.I.P. L,2002**)

- **Vitamine E**

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes (**Bossokpi.I.P. L 2002**).

- **β -carotène**

Parmi les photo-protecteurs actifs, le β -carotène apparaît comme un piègeur efficace. Sa constitution polyénique lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une oléfine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydro peroxydes (insertion d'oxygène dans toutes les liaisons C-H conjuguées d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leur tour (**Bossokpi.I.P. L2002**).

- **Antioxydants naturels**

Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique).

10- Activités antibactériennes des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques.

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle vers une autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et al, 2003**). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur celles à Gram négatif. Toutefois, les bactéries Gram à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**).

1- Matériel

Les huiles essentielles de *Thymus numidicus* (TN) ; *Lavandula stoechas* (LS) et *Origanum glandulosum* (OG) sont obtenues par hydrodistillation lors des travaux de Master effectués en 2019. Ces huiles ont été conservées à 4°C dans des flacons en verre ambré pour éviter toute altération de leur composition chimique et de leurs propriétés physicochimiques.

L'huile végétale de *Pistacia lentiscus* (PL) a été fournie par un herboriste de la Wilaya de Jijel. Elle a été extraite par pression à froid à partir des fruits mûrs de *Pistacia* récoltés en automne 2019.

Les parties aériennes (feuilles, tiges et sommités) des échantillons de *Lavandula stoechas* et de *Pistacia lentiscus* récoltés l'année 2019, ont été séchées à l'air libre et conservées dans des cartons en papier loin de l'humidité et de la lumière.

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles l'utilisation d'un antibiotique de référence a été nécessaire afin d'évaluer quantitativement l'effet antibactérien des quatre huiles. Pour cela un disque d'antibiotique Amikacin 10 µg servira de témoin positif.

L'Amikacin est un antibiotique de la classe des aminosides, utilisé pour le traitement des infections bactériennes telles les infections des voies urinaires, intra-abdominales, articulaires ou le traitement de la tuberculose multirésistante. La molécule est administrée uniquement par injection intraveineuse ou intramusculaire. L'Amikacin est le plus souvent utilisé pour traiter les infections graves gram négatives aérobies multirésistantes, en particulier *E. Coli*, *Klebsiella* et *Serratia*. Les seules bactéries Gram positives fortement sensibles à l'Amikacin sont les genres *Staphylococcus* et *Nocardia*

2- Méthodes

La composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* (LS), de *Thymus numidicus* (TN) et d'*Origanum glandulosum* (OG) a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) sur un équipement de type Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse DSQ II. La séparation est effectuée sur une colonne capillaire TR-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)

Un microlitre d'échantillon d'huile essentielle est injecté en mode splitless à 200°C. La température du four est fixée à 50°C pendant 5 minutes puis augmentée, à raison de 7°C/min, jusqu'à 330°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur réglé à un débit de 1mL/min.

Les chromatogrammes et les spectres de masses sont analysés avec le Logiciel Xcalibur (Thermo, France). L'identification des composés correspondants aux pics

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

chromatographiques se fait à la fois par comparaison des spectres de masse du chromatogramme avec ceux présents dans la base de données NIST.

Les principaux composés chimiques détectés et annotés par l'analyse GC/MS pour les trois huiles essentielles de *Lavandula Stoechas* (LS), *Thymus Numidicus* (TN) et *Origanum Glandulosum* (OG) sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1– Composition chimique en % des principaux composés détectés par analyse GC/MS des huiles essentielles LS, TN et OG

Composés	HE LS	HE TN	HE OG
	%	%	%
β -Myrcène	T	2,36	T
α -Pinène	T	5,56	T
Camphène	0,42	0,13	T
β -Pinène	T	5,31	T
β -Cymène	T	7,67	44,07
Eucalyptol	8,02	T	T
γ -Terpinène	T	9,4	16,13
Fenchone	21,54	T	T
Camphor	22,29	T	T
Linalol	T	33,62	0,1
Thymol	T	2,1	30,11
Carvacrol	T	27,83	6,88
β -Caryophyllène	T	1,48	0,96
β -Bisabolène	T	0,57	1,18

T : Traces

Les huiles essentielles de *Thymus numidicus* et d'*Origanum glandulosum* sont composées principalement de monoterpènes et de sesquiterpènes :

- Monoterpènes oxygénés avec la fonction alcool : thymol, carvacrol(cymophénol) et fenchone
- Monoterpènes aliphatiques, tels que β -cymène, et le γ -terpinène.
- Sesquiterpènes aliphatiques : β -bisabolène, et le β -caryophyllène.

Notons au préalable, que les trois huiles essentielles LS, TN et OG possèdent une densité de 0,863 ; 0,915 et 0,917 respectivement ainsi qu'une couleur et odeur caractéristiques des composés majoritaires détectés par CG/SM.

3- Evaluation des propriétés physicochimiques de l'huile végétale de Lentisque

Les propriétés physicochimiques étudiées ont été déterminées selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO).

3-1- Densité relative à 20°C

La densité relative d'une huile est le rapport entre la masse d'un volume de cette huile à celle du même volume d'eau distillée pris à 20°C. Elle a été déterminée selon la norme NF T 75-111, 1982/ISO 279-1993 en se servant d'un pycnomètre tarré et de l'équation (1) pour le calcul (M. Bourkhiss,2015)

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} + 0.0012 \quad (1)$$

Avec : m_0 : masse du pycnomètre à vide (g)

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (g)

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile (g)

3-2- Indice de réfraction à 20°C

L'indice de réfraction est une grandeur physique sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci. Il dépend de la longueur d'onde de mesure mais aussi des caractéristiques de l'environnement (notamment la pression et la température).

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction dans le milieu considéré (M. Bourkhiss,2015).

Les indices ont été déterminés selon la norme NF T 75-112, 1977/ISO 280-1976, grâce à un réfractomètre de marque Mod.RMT S/N 280067

3-3- Indice d'acide

L'indice d'acide (IA) d'une huile représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 gramme de cette huile (M. Bourkhiss,2015)

La neutralisation des acides libres se fait à l'aide d'une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium titrée. Il a été déterminé selon la norme NF T 75-103, 1982/ISO1242-1982 et calculé à l'aide de l'équation (2) (M. Bourkhiss,2015)

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

$$IA = \frac{56.1 * V * N}{Pr} \quad (2)$$

Avec : V : volume de la solution de KOH utilisée lors du dosage (en ml)

N : normalité de la solution de KOH

Pr : prise d'essai pour l'huile (1 g)

3-4- Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) d'un corps gras représente le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif contenu dans 1 kg de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode et titration de celui-ci par le thiosulfate de sodium. Ce paramètre nous renseigne sur le degré d'oxydation des huiles (M. Bourkhiss, 2015).

L'indice de peroxyde est exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif par kg d'huile

$$IP = \frac{(V - V_0) * T}{PE} * 100 \quad (3)$$

T : titre ou normalité de la solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$)

V_0 : volume de thiosulfate versé dans le blanc (en ml)

V : volume de thiosulfate versé dans la prise d'essai (en ml)

PE : prise d'essai en grammes.

3-5- Indice de saponification

L'indice de saponification est la quantité de potasse (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier 1g de corps gras (M. Bourkhiss, 2015)

Le principe consiste à introduire dans une fiole une prise d'essai de 1g d'huile et 25 ml de potasse alcoolique (0,5N). Cette dernière est portée à ébullition au bain-marie pendant une heure. On y ajoute 3gouttes de phénolphaléine, puis on effectue un titrage à chaud de l'excès de potasse à l'aide de l'acide chlorhydrique 0,5N jusqu'à décoloration. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions (ISO 3657 : 1977).

L'indice de saponification est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$IS = \frac{(V_0 - V_1) * N}{P} * 56.1 \quad (4)$$

V_0 : Volume de la solution d'HCl versé lors du dosage à blanc.

V_1 : Volume de la solution d'HCl versé en présence de l'huile

N : Normalité de la solution de HCl.

P : Masse de l'échantillon d'huile (prise d'essai)

3-6- Indice d'ester

L'indice d'ester (IE) représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1 gramme d'échantillon d'huile.

Cet indice est déterminé selon la norme NF T75-128, 1984/ISO 7660-1983.

$$\mathbf{IE = IS - IA} \quad \mathbf{(5)}$$

4- Extraction des métabolites secondaires

L'extraction des métabolites secondaires contenus dans les feuilles, les tiges du lentisque, les sommités de lavande a été conduite selon trois méthodes : macération, décoction et extraction au soxhlet.

Pour les extractions par macération ou par décoction, nous avons adopté le protocole décrit par **Sqalli et al (2007)**. Le protocole consiste à mettre en contact 5g de matière végétale sèche avec 50 ml de solvant durant 24h à 40°C pour la décoction et 48h à température ambiante pour la macération. Parmi les solvants testés, nous avons opté pour : le méthanol, l'éthanol, l'hexane, le diéthyléther et l'eau.

Une autre série d'extraction a été effectuée, en décoction et macération, en utilisant les mélanges de solvant Méthanol/Eau et Ethanol/Eau à raison d'un rapport de 50%.

Le mélange est ensuite filtré sur du papier filtre. Le filtrat est transvasé dans un ballon préalablement taré puis évaporé sous vide pour éliminer tout le solvant et obtenir un résidu sec. La masse de résidu sec ($m_{\text{résidu}}$) est pesée et le rendement d'extraction est calculé à l'aide de l'équation (6).

$$\mathbf{Rendement (\%) = \frac{m_{\text{résidu}}}{m_i} \times 100\%} \quad \mathbf{(6)}$$

Avec $m_i = 5\text{g}$

Pour l'extraction au soxhlet, la matière végétale est broyée avant d'être placée dans la cartouche. Ceci dans le but d'assurer un bon contact entre le solvant et la matière végétale.

Le dispositif de soxhlet est représenté sur la figure 8

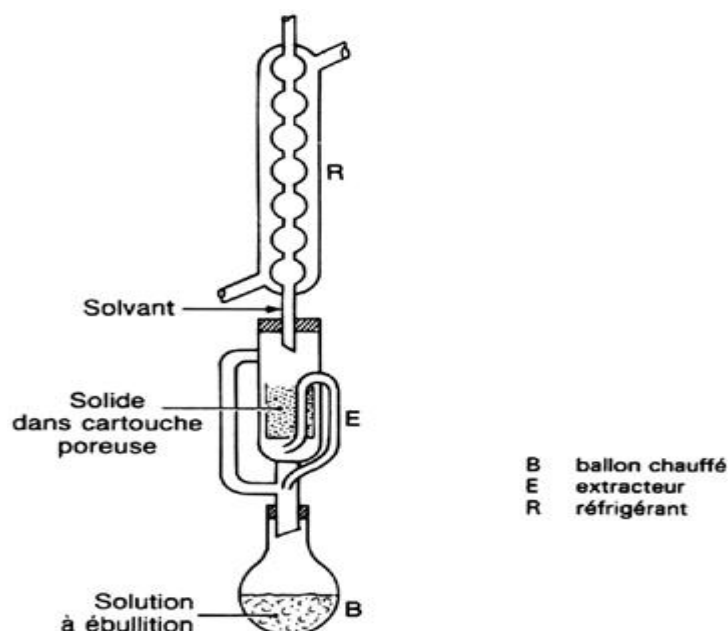


Figure 8- Dispositif Soxhlet utilisé lors de l'extraction des métabolites secondaires

Les extraits obtenus sont ensuite utilisés pour les tests d'identification phytochimique ou Screening phytochimique. Le screening phytochimique est une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques contenus dans les extraits : Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, composés réducteurs.... (**Bammou et al, 2015**)

Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation 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. Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites dans les travaux de **Bekro et al. (2007)** ; **Dohou et al., (2003)** ; **Longanga Otshudi et al., (2000)** ; **Tona et al., (1998)** et **Randerath et Nguyen, (1971)**.

4-1- Recherche d'alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés grâce au réactif de Mayer : Dans un tube à essai, verser 5 gouttes du réactif de Mayer sur 1 ml de l'extrait. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre témoigne de la présence des alcaloïdes (**Bammou et al,2015**).

4-2- Recherche des tanins catéchiques et des tanins galliques

L'identification de la présence des tanins catéchiques est effectuée à l'aide du réactif de Stiasny. 5ml d'extrait est évaporé à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de Stiasny au

résidu, le mélange fut maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'apparition d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiqes. (Bammou et al,2015)

Quant aux tanins galliques, la solution précédente a été filtrée et le filtrat recueilli est saturé par une solution d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes d'une solution de FeCl₃ provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, témoignant de la présence des tanins galliques (Bammou et al,2015).

4-3- Dosage des polyphénols

4-3-1 Mise en évidence et dosage des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) permet de caractériser les polyphénols.

4-3-2 Dosage des polyphénols totaux

Ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%, à 2ml de chaque extrait. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le témoin de la présence des polyphénols (BERRANI Assia et al, 2019).

4-4- Recherche de flavonoïdes

Quelques gouttes d'HCl concentré sont mises en contact avec 5ml de l'extrait méthanolique. Ensuite, 3 copeaux de magnésium sont ajoutés. La présence des flavonoïdes est confirmée par la formation d'une couleur rouge pour les flavonols, orange pour les flavonnes et violet pour les flavonones (MEGNOUNIF.I,2011)

4-5- Recherche de composés réducteurs et dosage de l'activité anti oxydante

Pour la mise en évidence de la présence des composés réducteurs, 5 ml de décocté aqueux à 10 % ont été introduits dans un bécher de 100 ml et évaporés à sec au bain marie. Au résidu, fut ajouté 1 ml du réactif de Fehling et l'obtention d'un précipité rouge-brique indique la présence de composés réducteurs (Bammou et al,2015).

4-6- Recherche de Stérols et de Triterpènes

La détection de la présence des Stérols et des Triterpènes a été réalisée sur l'extrait obtenu à partir de 1 g de poudre végétale et 20 ml d'Ether laissés en macération pendant 24 heures, puis filtrés et complétés à 20 ml avec de l'éther. 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 ensuite recueilli dans deux tubes à essai, dont l'un sert de référence. A l'aide d'une pipette, 1

à 2 ml de H₂SO₄ 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 surnageant devenant verte ou violette révèle la présence des stéroïdes et des triterpènes (Bammou et al,2015)

4-7- Recherche de coumarines et de saponines

Verser 3ml de NaOH à 10% dans l'extrait aqueux. La présence des coumarines est détectée par l'apparition d'une couleur jaune (N. E.H DAIRA et al,2016)

Pour la recherche des saponines, 10 ml de l'extrait total aqueux est versé dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence des saponines (Bammou et al,2015)

5- Dosage des phénols totaux

Le dosage des principes actifs fait partie du contrôle qualité des plantes médicinales. Ils attestent du degré d'activité thérapeutique de la drogue et déterminent donc sa qualité pharmaceutique (J. Chabrier,2010)

Le principe de dosage des phénols totaux repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques. Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium (Na₂CO₃). Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (M. DIF et al, 2016).

Mode opératoire :

Un volume de 1ml de chaque extrait méthanolique obtenu par macération (des feuilles et tiges du Lentisque ainsi que des sommités de lavande) à une concentration de 1mg/ml est introduit dans des tubes à essais contenant 5ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au dixième. Après un repos de 3 min, 4ml d'une solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (1M) est additionné. Les tubes sont agités et conservés pendant 15 min à une température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV de marque SHIMADZU UV-1900I par rapport à l'acide gallique qui est un composé polyphénolique de référence. (F. Pourmourad et al, 2006).

Au préalable, une courbe d'étalonnage a été établie dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant des solutions diluées d'acide gallique à différentes

concentrations (0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml) dans un mélange eau-méthanol (50/50 : v/v). Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en termes de masse en acide gallique équivalent,

6- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux

6-1- Méthode de piégeage du DPPH

Le test au DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Figure 9) **Ferradji, A. (2011)**.

La réduction du DPPH est facilement mesurée par UV-Visible à (515-518 nm) (λ_{max} du DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant.

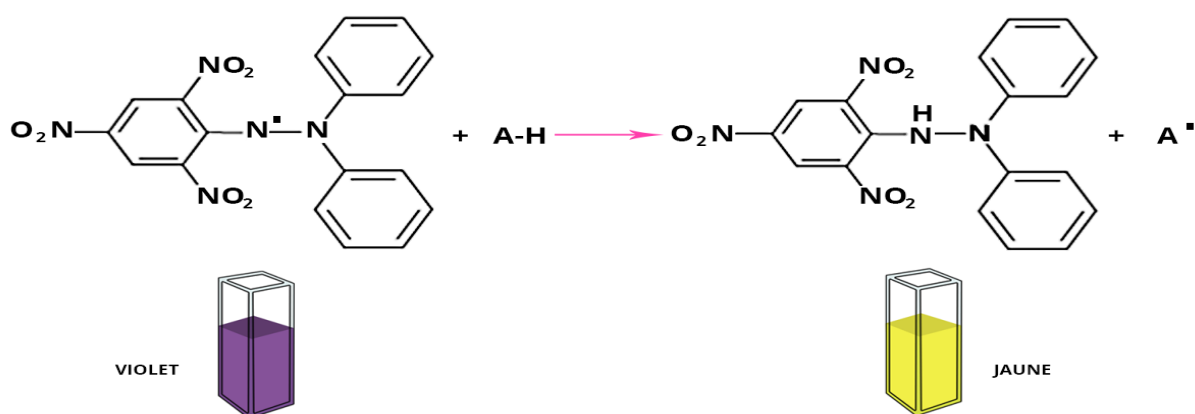


Figure 9 – Réaction du DDPH en présence d'un antioxydant AH

Mode opératoire :

Pour mesurer l'activité antioxydante, une prise d'essai d'1ml de chaque solution méthanolique des extraits polyphénoliques à différentes concentrations (0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml) est mélangée avec 40µl d'une solution de DPPH (40µg/ml). Après une agitation vigoureuse le mélange est laissé au repos pendant 60min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en se référant à un témoin (acide ascorbique) préparé dans les mêmes conditions.

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et son calcul est effectué comme suit :

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100\% \quad (7)$$

Inhibition (%) : pourcentage d'inhibition des radicaux libres.

Abs témoin : absorbance du témoin.

Abs échantillon : absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est définie comme étant la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire de 50% l'activité du DPPH (S. Khoudali et al,2014). La valeur de l'IC50 est déterminée graphiquement par la régression linéaire où l'abscisse X est représentée par la concentration de l'échantillon testé (mg/ml) et l'ordonnée Y par le pourcentage d'inhibition (I%).

6-2- Méthode de réduction du fer

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (A. Khadhri et al,2012).

Le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduits en Fe^{2+} par les antioxydants présents dans l'extrait végétal (A. Khadhri et al,2012).

Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage préparée en utilisant l'acide ascorbique dans les mêmes conditions que celle des extraits.

Mode opératoire :

Un volume de 2,5ml de chaque dilution est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% est ajoutés pour inhiber la réaction et les tubes sont centrifugés à 5000 tr/min pendant 10min. Une aliquote (5ml) du surnageant est combinée avec 5ml d'eau distillée et 1ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%.

La détermination de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par du méthanol qui permet de calibrer l'appareil UV-Visible (R. E. K. DIBACTO et al,2021).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (N. Bougandoura and N. Bendimerad,2012).

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

7- Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre huiles

L'activité antibactérienne de l'huile végétale du Lentisque et des huiles essentielles de *Lavandula stoechas*, *Thymus numidicus* et *Origanum glandulosum* extraites a été évaluée par la méthode de l'aromatogramme. Les tests ont été effectués au niveau du laboratoire microbiologique de l'hôpital Neddir Mohamed de Tizi-Ouzou ville.

Les souches bactériennes utilisées sont énumérées dans le tableau 2.

Tableau 2- Souches bactériennes utilisées

Bactérie	Gram	Provenance
Escherichia coli	Négatif	ECBU
Staphylococcus Aureus	Positif	PUS

La technique utilisée est celle de diffusion sur disque dite antibiogramme pour étudier l'interaction entre les différentes huiles et les espèces microbiennes en inhibant la croissance de celles-ci.

7-1- Milieu de culture

Le milieu de culture choisi pour les souches bactériennes est la gélose Muller Hinton. Un volume de 20ml correspondant à 4mm d'épaisseur ; sont versées dans des boites Pétri stériles.

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

7-2-Ensemencement

Cette opération passe par les étapes suivantes :

- Tromper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne déjà préparée et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube à essai afin de le décharger au maximum de l'eau ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose du haut vers le bas en stries serrées. Refaire l'opération deux fois en tournant la boîte de 60°. Terminer l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Application des disques

7-3-Test de l'antibiogramme

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman, 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.

Dans chaque boîte de pétri, quatre disques y sont déposés, en utilisant une pipette pasteur. Le premier disque est imprégné d'une goutte d'huile végétale de lentisque, le second d'une goutte de l'HE de lavande, le troisième d'une goutte de l'HE de Thym et le quatrième d'une goutte de l'HE d'Origan.

Afin d'évaluer l'effet synergique des différentes huiles sur leur activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches nous avons procédé à trois séries d'expériences mettant en jeu l'association des quatre huiles deux à deux ensuite trois à trois tout en respectant l'unité de masse :

Série deux à deux HV + HE :

- Le premier disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE de Lavande*
- Le second imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE de thym*
- Le troisième imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE d'Origan*

Série trois à trois :

- Le premier disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Thym+ HE Lavande*
- Le second disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Thym+ HE Origan*
- Le troisième imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Lavande+ HE Origan*
- Le quatrième imbibé d'un mélange des trois HEs *Lavande+ Thym + Origan*

En dernier, nous avons effectué une association des HEs deux à deux puis toutes les trois :

- Le premier disque imprégné d'un mélange HEs *lavande+origan*
- Le second imbibé d'un mélange HEs *lavande +thym*
- Le troisième imbibé d'un mélange HEs *origan +thym*
- Le quatrième imbibé du mélange des trois HEs *lavande +origan+thym*

7-4-Incubation et lecture

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

La lecture est faite pour chaque disque par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.



Chapitre II :

Matériels et méthodes



1- Matériel

Les huiles essentielles de *Thymus numidicus* (TN) ; *Lavandula stoechas* (LS) et *Origanum glandulosum* (OG) sont obtenues par hydrodistillation lors des travaux de Master effectués en 2019. Ces huiles ont été conservées à 4°C dans des flacons en verre ambré pour éviter toute altération de leur composition chimique et de leurs propriétés physicochimiques.

L'huile végétale de *Pistacia lentiscus* (PL) a été fournie par un herboriste de la Wilaya de Jijel. Elle a été extraite par pression à froid à partir des fruits mûrs de *Pistacia* récoltés en automne 2019.

Les parties aériennes (feuilles, tiges et sommités) des échantillons de *Lavandula stoechas* et de *Pistacia lentiscus* récoltés l'année 2019, ont été séchées à l'air libre et conservées dans des cartons en papier loin de l'humidité et de la lumière.

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles l'utilisation d'un antibiotique de référence a été nécessaire afin d'évaluer quantitativement l'effet antibactérien des quatre huiles. Pour cela un disque d'antibiotique Amikacin 10 µg servira de témoin positif.

L'Amikacin est un antibiotique de la classe des aminosides, utilisé pour le traitement des infections bactériennes telles les infections des voies urinaires, intra-abdominales, articulaires ou le traitement de la tuberculose multirésistante. La molécule est administrée uniquement par injection intraveineuse ou intramusculaire. L'Amikacin est le plus souvent utilisé pour traiter les infections graves gram négatives aérobies multirésistantes, en particulier *E. Coli*, *Klebsiella* et *Serratia*. Les seules bactéries Gram positives fortement sensibles à l'Amikacin sont les genres *Staphylococcus* et *Nocardia*

2- Méthodes

La composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* (LS), de *Thymus numidicus* (TN) et d'*Origanum glandulosum* (OG) a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) sur un équipement de type Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse DSQ II. La séparation est effectuée sur une colonne capillaire TR-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)

Un microlitre d'échantillon d'huile essentielle est injecté en mode splitless à 200°C. La température du four est fixée à 50°C pendant 5 minutes puis augmentée, à raison de 7°C/min, jusqu'à 330°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur réglé à un débit de 1mL/min.

Les chromatogrammes et les spectres de masses sont analysés avec le Logiciel Xcalibur (Thermo, France). L'identification des composés correspondants aux pics

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

chromatographiques se fait à la fois par comparaison des spectres de masse du chromatogramme avec ceux présents dans la base de données NIST.

Les principaux composés chimiques détectés et annotés par l'analyse GC/MS pour les trois huiles essentielles de *Lavandula Stoechas* (LS), *Thymus Numidicus* (TN) et *Origanum Glandulosum* (OG) sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1– Composition chimique en % des principaux composés détectés par analyse GC/MS des huiles essentielles LS, TN et OG

Composés	HE LS	HE TN	HE OG
	%	%	%
β -Myrcène	T	2,36	T
α -Pinène	T	5,56	T
Camphène	0,42	0,13	T
β -Pinène	T	5,31	T
β -Cymène	T	7,67	44,07
Eucalyptol	8,02	T	T
γ -Terpinène	T	9,4	16,13
Fenchone	21,54	T	T
Camphor	22,29	T	T
Linalol	T	33,62	0,1
Thymol	T	2,1	30,11
Carvacrol	T	27,83	6,88
β -Caryophyllène	T	1,48	0,96
β -Bisabolène	T	0,57	1,18

T : Traces

Les huiles essentielles de *Thymus numidicus* et d'*Origanum glandulosum* sont composées principalement de monoterpènes et de sesquiterpènes :

- Monoterpènes oxygénés avec la fonction alcool : thymol, carvacrol(cymophénol) et fenchone
- Monoterpènes aliphatiques, tels que β -cymène, et le γ -terpinène.
- Sesquiterpènes aliphatiques : β -bisabolène, et le β -caryophyllène.

Notons au préalable, que les trois huiles essentielles LS, TN et OG possèdent une densité de 0,863 ; 0,915 et 0,917 respectivement ainsi qu'une couleur et odeur caractéristiques des composés majoritaires détectés par CG/SM.

3- Evaluation des propriétés physicochimiques de l'huile végétale de Lentisque

Les propriétés physicochimiques étudiées ont été déterminées selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO).

3-1- Densité relative à 20°C

La densité relative d'une huile est le rapport entre la masse d'un volume de cette huile à celle du même volume d'eau distillée pris à 20°C. Elle a été déterminée selon la norme NF T 75-111, 1982/ISO 279-1993 en se servant d'un pycnomètre tarré et de l'équation (1) pour le calcul (M. Bourkhiss,2015)

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} + 0.0012 \quad (1)$$

Avec : m_0 : masse du pycnomètre à vide (g)

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (g)

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile (g)

3-2- Indice de réfraction à 20°C

L'indice de réfraction est une grandeur physique sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci. Il dépend de la longueur d'onde de mesure mais aussi des caractéristiques de l'environnement (notamment la pression et la température).

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction dans le milieu considéré (M. Bourkhiss,2015).

Les indices ont été déterminés selon la norme NF T 75-112, 1977/ISO 280-1976, grâce à un réfractomètre de marque Mod.RMT S/N 280067

3-3- Indice d'acide

L'indice d'acide (IA) d'une huile représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 gramme de cette huile (M. Bourkhiss,2015)

La neutralisation des acides libres se fait à l'aide d'une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium titrée. Il a été déterminé selon la norme NF T 75-103, 1982/ISO1242-1982 et calculé à l'aide de l'équation (2) (M. Bourkhiss,2015)

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

$$IA = \frac{56.1 * V * N}{Pr} \quad (2)$$

Avec : V : volume de la solution de KOH utilisée lors du dosage (en ml)

N : normalité de la solution de KOH

Pr : prise d'essai pour l'huile (1 g)

3-4- Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) d'un corps gras représente le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif contenu dans 1 kg de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode et titration de celui-ci par le thiosulfate de sodium. Ce paramètre nous renseigne sur le degré d'oxydation des huiles (M. Bourkhiss, 2015).

L'indice de peroxyde est exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif par kg d'huile

$$IP = \frac{(V - V_0) * T}{PE} * 100 \quad (3)$$

T : titre ou normalité de la solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$)

V_0 : volume de thiosulfate versé dans le blanc (en ml)

V : volume de thiosulfate versé dans la prise d'essai (en ml)

PE : prise d'essai en grammes.

3-5- Indice de saponification

L'indice de saponification est la quantité de potasse (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier 1g de corps gras (M. Bourkhiss, 2015)

Le principe consiste à introduire dans une fiole une prise d'essai de 1g d'huile et 25 ml de potasse alcoolique (0,5N). Cette dernière est portée à ébullition au bain-marie pendant une heure. On y ajoute 3 gouttes de phénolphaléine, puis on effectue un titrage à chaud de l'excès de potasse à l'aide de l'acide chlorhydrique 0,5N jusqu'à décoloration. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions (ISO 3657 : 1977).

L'indice de saponification est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$IS = \frac{(V_0 - V_1) * N}{P} * 56.1 \quad (4)$$

V_0 : Volume de la solution d'HCl versé lors du dosage à blanc.

V_1 : Volume de la solution d'HCl versé en présence de l'huile

N : Normalité de la solution de HCl.

P : Masse de l'échantillon d'huile (prise d'essai)

3-6- Indice d'ester

L'indice d'ester (IE) représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1 gramme d'échantillon d'huile.

Cet indice est déterminé selon la norme NF T75-128, 1984/ISO 7660-1983.

$$\mathbf{IE = IS - IA} \quad \mathbf{(5)}$$

4- Extraction des métabolites secondaires

L'extraction des métabolites secondaires contenus dans les feuilles, les tiges du lentisque, les sommités de lavande a été conduite selon trois méthodes : macération, décoction et extraction au soxhlet.

Pour les extractions par macération ou par décoction, nous avons adopté le protocole décrit par **Sqalli et al (2007)**. Le protocole consiste à mettre en contact 5g de matière végétale sèche avec 50 ml de solvant durant 24h à 40°C pour la décoction et 48h à température ambiante pour la macération. Parmi les solvants testés, nous avons opté pour : le méthanol, l'éthanol, l'hexane, le diéthyléther et l'eau.

Une autre série d'extraction a été effectuée, en décoction et macération, en utilisant les mélanges de solvant Méthanol/Eau et Ethanol/Eau à raison d'un rapport de 50%.

Le mélange est ensuite filtré sur du papier filtre. Le filtrat est transvasé dans un ballon préalablement taré puis évaporé sous vide pour éliminer tout le solvant et obtenir un résidu sec. La masse de résidu sec ($m_{\text{résidu}}$) est pesée et le rendement d'extraction est calculé à l'aide de l'équation (6).

$$\mathbf{Rendement (\%) = \frac{m_{\text{résidu}}}{m_i} \times 100\%} \quad \mathbf{(6)}$$

Avec $m_i = 5\text{g}$

Pour l'extraction au soxhlet, la matière végétale est broyée avant d'être placée dans la cartouche. Ceci dans le but d'assurer un bon contact entre le solvant et la matière végétale.

Le dispositif de soxhlet est représenté sur la figure 8

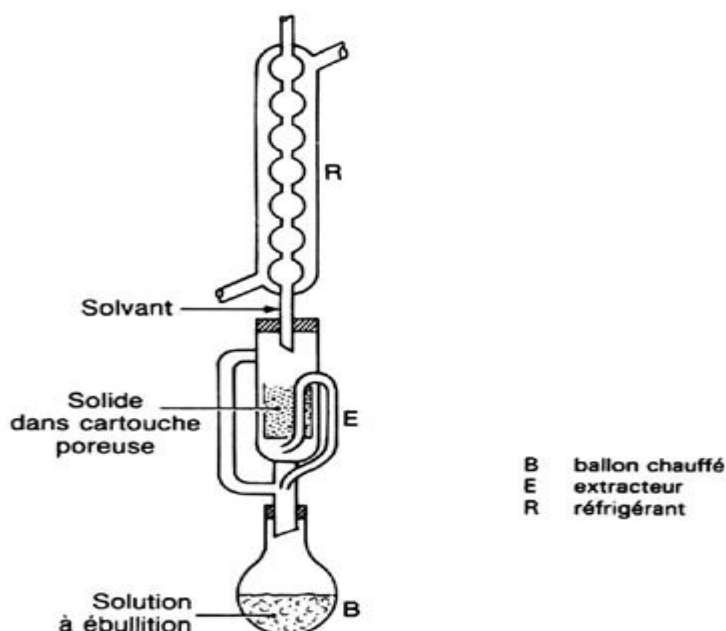


Figure 8- Dispositif Soxhlet utilisé lors de l'extraction des métabolites secondaires

Les extraits obtenus sont ensuite utilisés pour les tests d'identification phytochimique ou Screening phytochimique. Le screening phytochimique est une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques contenus dans les extraits : Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, composés réducteurs.... (**Bammou et al, 2015**)

Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation 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. Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites dans les travaux de **Bekro et al. (2007)** ; **Dohou et al., (2003)** ; **Longanga Otshudi et al., (2000)** ; **Tona et al., (1998)** et **Randerath et Nguyen, (1971)**.

4-1- Recherche d'alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés grâce au réactif de Mayer : Dans un tube à essai, verser 5 gouttes du réactif de Mayer sur 1 ml de l'extrait. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre témoigne de la présence des alcaloïdes (**Bammou et al,2015**).

4-2- Recherche des tanins catéchiques et des tanins galliques

L'identification de la présence des tanins catéchiques est effectuée à l'aide du réactif de Stiasny. 5ml d'extrait est évaporé à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de Stiasny au

résidu, le mélange fut maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'apparition d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques. (Bammou et al,2015)

Quant aux tanins galliques, la solution précédente a été filtrée et le filtrat recueilli est saturé par une solution d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes d'une solution de FeCl_3 provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, témoignant de la présence des tanins galliques (Bammou et al,2015).

4-3- Dosage des polyphénols

4-3-1 Mise en évidence et dosage des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) permet de caractériser les polyphénols.

4-3-2 Dosage des polyphénols totaux

Ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%, à 2ml de chaque extrait. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le témoin de la présence des polyphénols (BERRANI Assia et al, 2019).

4-4- Recherche de flavonoïdes

Quelques gouttes d'HCl concentré sont mises en contact avec 5ml de l'extrait méthanolique. Ensuite, 3 copeaux de magnésium sont ajoutés. La présence des flavonoïdes est confirmée par la formation d'une couleur rouge pour les flavonols, orange pour les flavonnes et violet pour les flavonones (MEGNOUNIF.I,2011)

4-5- Recherche de composés réducteurs et dosage de l'activité anti oxydante

Pour la mise en évidence de la présence des composés réducteurs, 5 ml de décocté aqueux à 10 % ont été introduits dans un bécher de 100 ml et évaporés à sec au bain marie. Au résidu, fut ajouté 1 ml du réactif de Fehling et l'obtention d'un précipité rouge-brique indique la présence de composés réducteurs (Bammou et al,2015).

4-6- Recherche de Stérols et de Triterpènes

La détection de la présence des Stérols et des Triterpènes a été réalisée sur l'extrait obtenu à partir de 1 g de poudre végétale et 20 ml d'Ether laissés en macération pendant 24 heures, puis filtrés et complétés à 20 ml avec de l'éther. 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 ensuite recueilli dans deux tubes à essai, dont l'un sert de référence. A l'aide d'une pipette, 1

à 2 ml de H₂SO₄ 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 surnageant devenant verte ou violette révèle la présence des stéroïdes et des triterpènes (Bammou et al,2015)

4-7- Recherche de coumarines et de saponines

Verser 3ml de NaOH à 10% dans l'extrait aqueux. La présence des coumarines est détectée par l'apparition d'une couleur jaune (N. E.H DAIRA et al,2016)

Pour la recherche des saponines, 10 ml de l'extrait total aqueux est versé dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence des saponines (Bammou et al,2015)

5- Dosage des phénols totaux

Le dosage des principes actifs fait partie du contrôle qualité des plantes médicinales. Ils attestent du degré d'activité thérapeutique de la drogue et déterminent donc sa qualité pharmaceutique (J. Chabrier,2010)

Le principe de dosage des phénols totaux repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques. Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium (Na₂CO₃). Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (M. DIF et al, 2016).

Mode opératoire :

Un volume de 1ml de chaque extrait méthanolique obtenu par macération (des feuilles et tiges du Lentisque ainsi que des sommités de lavande) à une concentration de 1mg/ml est introduit dans des tubes à essais contenant 5ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au dixième. Après un repos de 3 min, 4ml d'une solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (1M) est additionné. Les tubes sont agités et conservés pendant 15 min à une température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV de marque SHIMADZU UV-1900I par rapport à l'acide gallique qui est un composé polyphénolique de référence. (F. Pourmourad et al, 2006).

Au préalable, une courbe d'étalonnage a été établie dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant des solutions diluées d'acide gallique à différentes

concentrations (0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml) dans un mélange eau-méthanol (50/50 : v/v). Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en termes de masse en acide gallique équivalent,

6- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux

6-1- Méthode de piégeage du DPPH

Le test au DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Figure 9) **Ferradji, A. (2011)**.

La réduction du DPPH est facilement mesurée par UV-Visible à (515-518 nm) (λ_{max} du DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant.

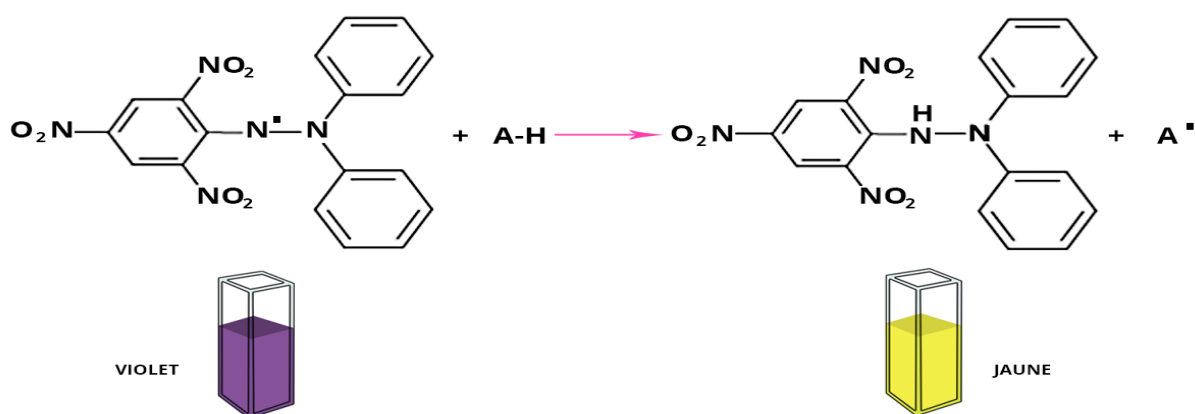


Figure 9 – Réaction du DDPH en présence d'un antioxydant AH

Mode opératoire :

Pour mesurer l'activité antioxydante, une prise d'essai d'1ml de chaque solution méthanolique des extraits polyphénoliques à différentes concentrations (0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml) est mélangée avec 40µl d'une solution de DPPH (40µg/ml). Après une agitation vigoureuse le mélange est laissé au repos pendant 60min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en se référant à un témoin (acide ascorbique) préparé dans les mêmes conditions.

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et son calcul est effectué comme suit :

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100\% \quad (7)$$

Inhibition (%) : pourcentage d'inhibition des radicaux libres.

Abs témoin : absorbance du témoin.

Abs échantillon : absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est définie comme étant la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire de 50% l'activité du DPPH (S. Khoudali et al,2014). La valeur de l'IC50 est déterminée graphiquement par la régression linéaire où l'abscisse X est représentée par la concentration de l'échantillon testé (mg/ml) et l'ordonnée Y par le pourcentage d'inhibition (I%).

6-2- Méthode de réduction du fer

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (A. Khadhri et al,2012).

Le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduits en Fe^{2+} par les antioxydants présents dans l'extrait végétal (A. Khadhri et al,2012).

Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage préparée en utilisant l'acide ascorbique dans les mêmes conditions que celle des extraits.

Mode opératoire :

Un volume de 2,5ml de chaque dilution est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% est ajoutés pour inhiber la réaction et les tubes sont centrifugés à 5000 tr/min pendant 10min. Une aliquote (5ml) du surnageant est combinée avec 5ml d'eau distillée et 1ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%.

La détermination de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par du méthanol qui permet de calibrer l'appareil UV-Visible (R. E. K. DIBACTO et al,2021).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (N. Bougandoura and N. Bendimerad,2012).

7- Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre huiles

L'activité antibactérienne de l'huile végétale du Lentisque et des huiles essentielles de *Lavandula stoechas*, *Thymus numidicus* et *Origanum glandulosum* extraites a été évaluée par la méthode de l'aromatogramme. Les tests ont été effectués au niveau du laboratoire microbiologique de l'hôpital Neddir Mohamed de Tizi-Ouzou ville.

Les souches bactériennes utilisées sont énumérées dans le tableau 2.

Tableau 2- Souches bactériennes utilisées

Bactérie	Gram	Provenance
Escherichia coli	Négatif	ECBU
Staphylococcus Aureus	Positif	PUS

La technique utilisée est celle de diffusion sur disque dite antibiogramme pour étudier l'interaction entre les différentes huiles et les espèces microbiennes en inhibant la croissance de celles-ci.

7-1- Milieu de culture

Le milieu de culture choisi pour les souches bactériennes est la gélose Muller Hinton. Un volume de 20ml correspondant à 4mm d'épaisseur ; sont versées dans des boites Pétri stériles.

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

7-2-Ensemencement

Cette opération passe par les étapes suivantes :

- Tromper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne déjà préparée et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube à essai afin de le décharger au maximum de l'eau ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose du haut vers le bas en stries serrées. Refaire l'opération deux fois en tournant la boîte de 60°. Terminer l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Application des disques

7-3-Test de l'antibiogramme

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman, 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.

Dans chaque boîte de pétri, quatre disques y sont déposés, en utilisant une pipette pasteur. Le premier disque est imprégné d'une goutte d'huile végétale de lentisque, le second d'une goutte de l'HE de lavande, le troisième d'une goutte de l'HE de Thym et le quatrième d'une goutte de l'HE d'Origan.

Afin d'évaluer l'effet synergique des différentes huiles sur leur activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches nous avons procédé à trois séries d'expériences mettant en jeu l'association des quatre huiles deux à deux ensuite trois à trois tout en respectant l'unité de masse :

Série deux à deux HV + HE :

- Le premier disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE de Lavande*
- Le second imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE de thym*
- Le troisième imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE d'Origan*

Série trois à trois :

- Le premier disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Thym+ HE Lavande*
- Le second disque imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Thym+ HE Origan*
- Le troisième imbibé d'un mélange HV de lentisque + *HE Lavande+ HE Origan*
- Le quatrième imbibé d'un mélange des trois HEs *Lavande+ Thym + Origan*

En dernier, nous avons effectué une association des HEs deux à deux puis toutes les trois :

- Le premier disque imprégné d'un mélange HEs *lavande+origan*
- Le second imbibé d'un mélange HEs *lavande +thym*
- Le troisième imbibé d'un mélange HEs *origan +thym*
- Le quatrième imbibé du mélange des trois HEs *lavande +origan+thym*

7-4-Incubation et lecture

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

La lecture est faite pour chaque disque par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.



Chapitre III : **Résultats et discussions**

1- Propriétés physicochimiques de l'huile végétale de lentisque

Les données sur les principaux paramètres physico-chimiques de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* sont regroupées dans le Tableau 3.

Tableau 3-Paramètres physico-chimiques de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus*

Paramètre	Résultat
Couleur	Verte
Densité	0,917
Indice de réfraction	1,485
Indice d'acide (mgKOH/g d'huile)	34,37
Indice de peroxyde (meq O ₂ /kg d'huile)	8,5
Indice de saponification (mg KOH/g d'huile)	212,91
Indice d'ester (mg KOH/g d'huile)	171,68

La détermination de divers indices, largement exigée par les pharmacopées, est intéressante en termes d'évaluation de la qualité des huiles végétales.

La densité ou masse volumique qui dépend de la température et de la composition chimique de l'huile, nous renseigne sur la nature de la composition en acide gras, notamment de la longueur de la chaîne, de la présence d'insaturation et de fonctionnalité sur la chaîne carbonée (**Boukeloua, 2009**).

L'indice de réfraction dépend, comme la densité, de la composition chimique de l'huile et de la température. Il croît avec l'insaturation et la présence sur les chaînes grasses de fonctions secondaires.

La densité de l'huile végétale du lentisque mesurée à la température ambiante (25°C) est de 0,917. Nos résultats concordent de près à ceux rapportés par Boukeloua (2009). En revanche, elle présente un indice de réfraction compris entre 1,465 et 1,485

L'indice de saponification évalué est de 212,91mg KOH/g. Cette valeur est comparable à celle rapportée par Bouteldj et Kadjoudj (2013).

Concernant l'acidité de l'huile végétale nous avons enregistré une valeur de 34,37mgKOH/g. En effet, une faible valeur d'acidité caractérise la pureté et la stabilité d'une huile à température ambiante (**Tchiégang-Meguéni, 2003**).

L'indice de peroxyde de l'huile végétale est de 8,5 meqO₂/kg. Cet indice très utile nous renseigne sur les conditions de conservation, et nous aide à apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative de l'huile (**Tchiegang et al., 2004 ; Marmesat et al., 2009**).

3-Extraction des métabolites secondaires et screening phytochimique

3-1- Extraction des métabolites

Les rendements d'extraction, par macération et décoction, des métabolites secondaires sont mentionnés dans les tableaux 4 et 5 respectivement pour les sommités de *Lavandula stoechas* et les feuilles de *Pistacia lentiscus*

Tableau 4- Rendement d'extraction avec différents solvants, par décoction et macération, des métabolites secondaires contenus dans les sommités de *Lavandula stoechas*

Solvant	Décoction		Macération	
	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Méthanol	Poudre noir	13,97	Poudre vert-noirâtre	06,73
Hexane	Vert très pâteux	06,39	Vert très pâteux	02,01
Ethanol	Poudre noir	08,83	Poudre vert-foncé	05,44
Eau	Pâteux marron	07,02	Pâteux marron	06,03
Diéthyléther	---	---	Vert très pâteux	00,76

En décoction, le méthanol semble être un meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires contenus dans les sommités de lavande (13,97%) comparativement aux autres solvants (Hexane, Ethanol, Eau). Le diéthyléther a été complètement évaporé durant l'opération de décoction.

En macération, de faibles rendements ont été obtenus avec les différents solvants utilisés. Des valeurs comprises entre 00,76% et 06,73% sont enregistrées.

Tableau 5- Rendement d'extraction avec différents solvants, par décoction et macération, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*

Solvant	Décoction		Macération	
	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Méthanol	Poudre vert foncé	24,46	Poudre vert très foncé	25,02
Hexane	Vert pâteux	25,69	Poudre Vert	02,62
Ethanol	Poudre vert foncé	14,55	Poudre vert très foncé	18,98
Eau	Pâteux marron	18,53	Poudre marron orangé	18,97
Diéthyléther	---	---	Pâteux vert foncé	02,71

Chapitre 3 – Résultats et Discussion

Avec les différents solvants utilisés, pour l'extraction par décoction des métabolites secondaires contenus dans les feuilles de lentisque ; le méthanol et l'hexane donnent de meilleurs rendements avec des valeurs de 24,46% et 25,69%.

Pour l'extraction par macération, le méthanol donne de bon rendement (25,02%) suivi par l'éthanol (18,98%) puis l'eau (18,97%). Tandis que les autres solvants (hexane et diéthyl éther) donnent de faibles rendements (02,62% et 02,71%).

Les rendements d'extraction des métabolites secondaires, par les techniques de décoction au bain marie et au bain de sable ainsi que par macération, en utilisant un mélange de deux solvants sont regroupés dans les tableaux 6 et 7 respectivement pour les feuilles de *Pistacia Lentiscus* et les sommités de *Lavandula stoechas*.

Tableau 6- Rendement d'extraction avec un mélange de solvants, par décoction au bain marie et bain de sable et par macération, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*

Mélange Solvant (50%)	Décoction au bain marie		Décoction au bain de sable		Macération pendant 48heures	
	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Méthanol /Eau	Pâteux marron	12,81	Pâteux marron	27,07	Pâteux marron	36,17
Ethanol /Eau	Pâteux marron	17,92	Pâteux marron	25,23	Pâteux marron	34,10

L'extraction des métabolites secondaires du lentisque, par décoction au bain marie et bain de sable et par macération, en utilisant un mélange de solvants présente des rendements significatifs.

L'extraction par macération durant 48h montrent de meilleurs rendements. En effet, nous avons enregistré 36,17% et 34,10% respectivement pour les mélanges méthanol-eau et éthanol-eau. Par la suite vient la décoction au bain de sable avec des rendements de 27,07% et 25,23% respectivement pour les mélanges méthanol-eau et éthanol-eau. Enfin vient la décoction au bain marie avec des rendements de 12,81% et 17,92%.

Chapitre 3 – Résultats et Discussion

L'extraction des métabolites secondaires des sommités de *Lavandula stoechas* selon les trois méthodes (décoction au bain marie, au bain de sable et la macération pendant 48h) ne présente pas de bons rendements, vu que les valeurs enregistrées sont de 04,15% et 08,94%.

L'extrait obtenu selon les différentes méthodes d'extraction (décoction au bain de sable, au bain marie ainsi que la macération pendant 48h), pour les deux espèces *L.stoechas* et *P. lentiscus* était du même aspect et couleur ; pâteux marron.

Tableau 7- Rendement d'extraction avec un mélange de solvants, par décoction au bain marie et bain de sable, des métabolites secondaires contenus dans les sommités de *Lavandula stoechas*

Mélange Solvant (50%)	Décoction au bain marie		Décoction au bain de sable		Macération pendant 48heures	
	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)	Aspect et Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Méthanol /Eau	Pâteux marron	04,15	Pâteux marron	06,02	Pâteux marron	06,96
Ethanol /Eau	Pâteux marron	08,94	Pâteux marron	06,07	Pâteux marron	07,65

Les rendements d'extraction des métabolites secondaires, par la technique au soxhlet en utilisant le méthanol et l'hexane comme solvants sont regroupés dans le tableau 8 pour les feuilles et tiges de *Pistacia lentiscus* et dans le tableau 9 pour les sommités de *Lavandula stoechas*

Tableau 8- Rendement d'extraction (en %) par soxhlet et avec deux solvants, des métabolites secondaires contenus dans les feuilles et tiges de *Pistacia lentiscus*

Solvant	Feuilles de lentisque	Tiges de lentisque
Méthanol	22,35%	24,00%
Hexane	01,50%	01,20%

L'extraction des métabolites secondaires contenus dans les feuilles et tiges du lentisque en utilisant le méthanol comme solvant montre de meilleurs rendements (22,35% et 24,00%), comparativement à l'hexane pour lequel nous avons enregistré des valeurs plus faibles (01,50% et 01,20%).

Tableau 9- Rendement d'extraction (en %) par soxhlet des métabolites secondaires contenus dans les sommités de *Lavandula stoechas*

Solvant	Rendement (%)
Méthanol	05,50
Hexane	01,00

L'extraction par Soxhlet des métabolites secondaires contenus dans les sommités de lavande présente de faibles rendements, que ce soit pour le méthanol ou l'hexane. Le rendement enregistré en utilisant l'hexane est de 01% ; rendement très faible. Une valeur de 05,50% est enregistrée avec le méthanol

Les résultats regroupés dans les tableaux 4 à 9 montrent que :

- Les feuilles de *Pistacia Lentiscus* renferment plus de métabolites secondaires comparativement aux sommités de *Lavandula stoechas* quel qu'en soit la technique d'extraction utilisée (Macération, décoction et soxhlet). Ceci peut être lié au fait que les feuilles de *Pistacia lentiscus* renferment plus de corps gras.
- Nous avons utilisé différents solvants d'extraction (hexane, méthanol, Ethanol, eau et le diéthyléther). Le meilleur rendement d'extraction a été enregistré avec le méthanol (27,068%) et le mélange hydro alcoolique méthanol-eau (36,17%). L'usage simultané de l'eau et d'un solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans les solvants organiques.
- Le solvant diéthyléther s'est complètement évaporé lors des opérations de décoction des sommités de *L. stoechas* (pas d'extrait pas de rendement). Par contre en macération, nous avons enregistré un rendement de (2,71%)
- Parmi les trois méthodes d'extraction des métabolites secondaires, la macération qui était d'une durée de 48 heures a enregistré de meilleurs rendements.

3-2- Screening phytochimique

Le screening phytochimique effectué sur les extraits de macération obtenus avec les feuilles et les tiges du *Pistacia lentiscus* a mis en évidence la présence de plusieurs composés chimiques réputés pour leurs activités thérapeutiques. Il s'agit de substances polyphénoliques dont les tanins catéchiques et galliques, les flavonoïdes, les stérols et triterpènes, les saponines, les alcaloïdes et les composés réducteurs. Les principaux résultats sont regroupés dans le tableau 10.

Les tests phytochimiques effectués sur les extraits obtenus avec les sommités de Lavande ont mis en évidence la présence de peu de composés chimiques (tanins, flavonoïdes et coumarines) et l'absence des stérols, des triterpènes, des saponosides, des alcaloïdes et des composés réducteurs.

Tableau 10 - Résultats du Screening phytochimique sur les extraits de feuilles de Lentisque et sommités de Lavande

Métabolites secondaires	Feuilles de lentisque	Sommités de lavande
Polyphénols	+++	+++
Tanins Catéchiques	++	++
Tanins Galliques	+	
Flavonoïdes	+	+
Les composés réducteurs	+	–
Coumarines	–	+
Saponines	++	–
Alcaloïdes	+	–
Stérols et Triterpènes	+	–

(–) : absence ; (+) : présence en faible quantité ; (++) : Présence en quantité moyenne.
 (+++) : Présence en quantité importante

4-Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des trois extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

La courbe d'étalonnage est présentée sur la figure 10

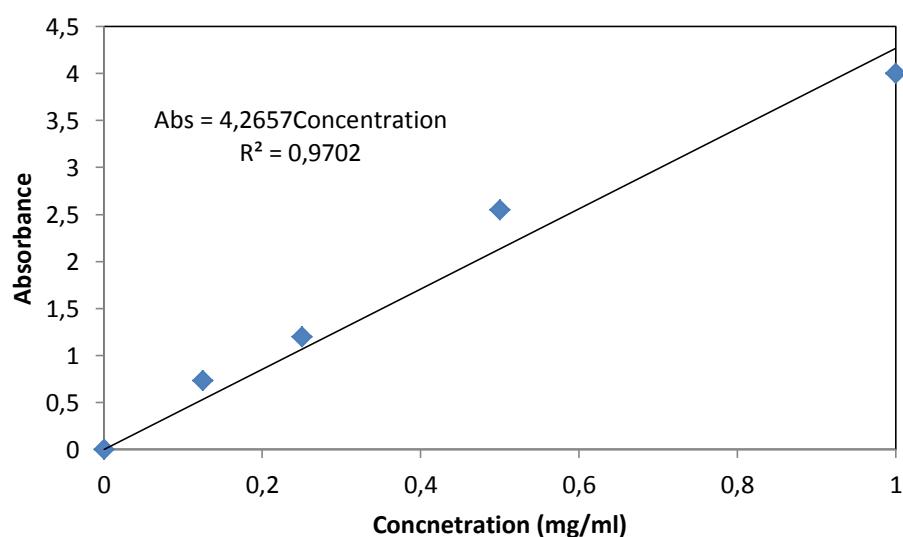


Figure 10- Courbe d'étalonnage de l'absorbance des solutions d'acide gallique mesurée à 760nm

Les teneurs en polyphénols des extraits des feuilles (lentisque F) et tiges (lentisque T) de lentisque ainsi que des sommités de lavande (lavande S) sont représentées sur la figure 11.

La quantité de polyphénols est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg AGE/ g E).

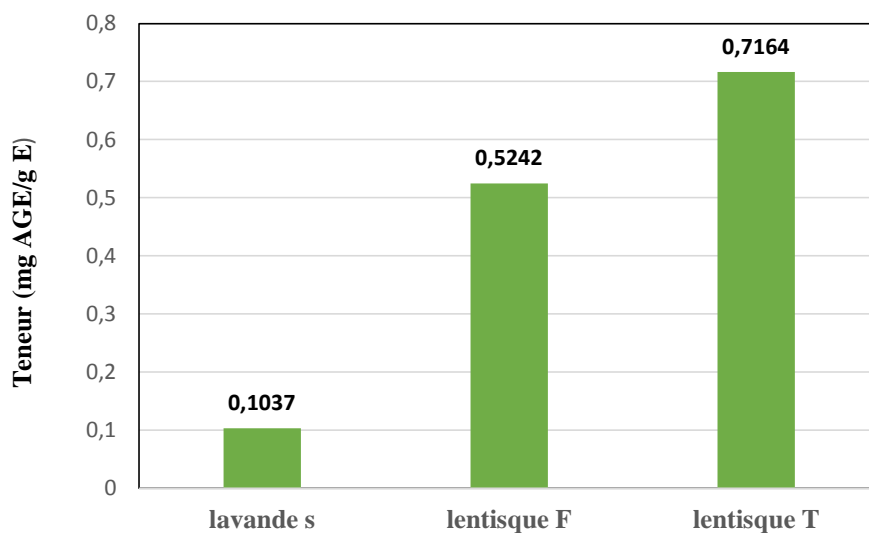


Figure11 - Teneur en polyphénols des extraits des feuilles (lentisque F) et tiges (lentisque T) de lentisque ainsi que des sommités de lavande (lavande S)

La figure11 montre que les feuilles et tiges de *Pistacia Lentiscus* contiennent plus de polyphénols que les sommités de *Lavandula Stoechas*. La teneur la plus élevée en composés phénoliques revient aux tiges de lentisque avec une valeur de 0,7164mg AGE/g E, suivi des feuilles de lentisque avec une teneur de 0,5242mg AGE/g E. La teneur la plus faible est notée pour les sommités de lavande avec une valeur de 0,1037mg AGE/ g E. Des résultats similaires ont été signalés dans plusieurs travaux antérieurs (Ferradji, 2011 ; Dif et al. 2016).

5-Mesure de l'activité antioxydante

5-1- Test au DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanolique polyphénoliques de lentisque (feuilles et tiges) de lavande (sommités) et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée avec un spectrophotomètre UV-Visible en suivant le changement de couleur du DPPH (violette) vers DPPH-H (jaune).

Chapitre 3 – Résultats et Discussion

Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires. Les résultats sont regroupés dans le tableau 11 et représentés sur les figures 12, 13, 14 et 15. Les concentrations C1, C2, C3 et C4 mentionnées dans le tableau 11 sont respectivement égales à 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml.

Tableau 11- Pourcentage d'inhibition des différents extraits polyphénoliques

	Acide ascorbique	Extraits des feuilles de Lentisque	Extraits des tiges de Lentisque	Extraits des sommités de Lavande
C1	90 %	22 %	84 %	18 %
C2	92 %	36 %	84.7 %	31 %
C3	94.6 %	58 %	85 %	48 %
C4	99.7 %	90.9 %	86 %	85 %

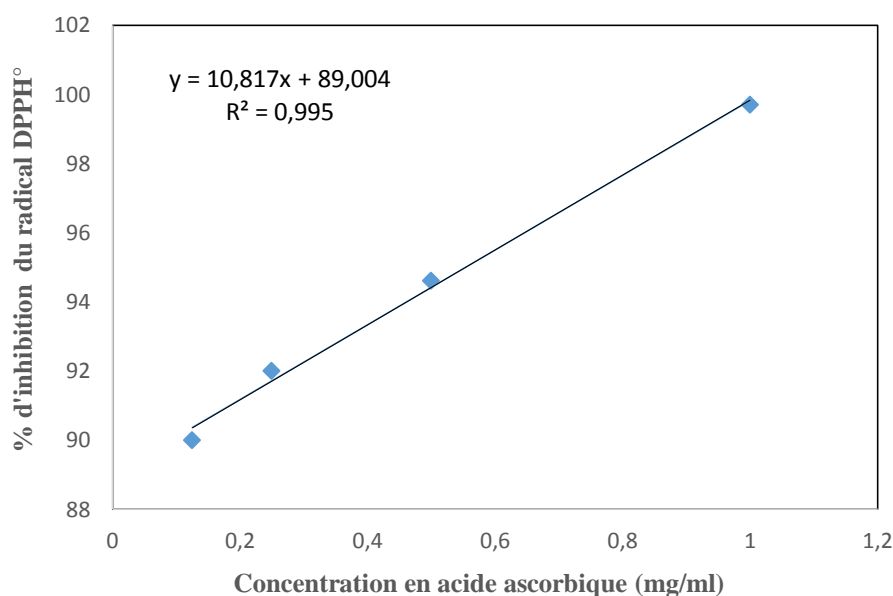


Figure 12 - Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction de la concentration en acide ascorbique

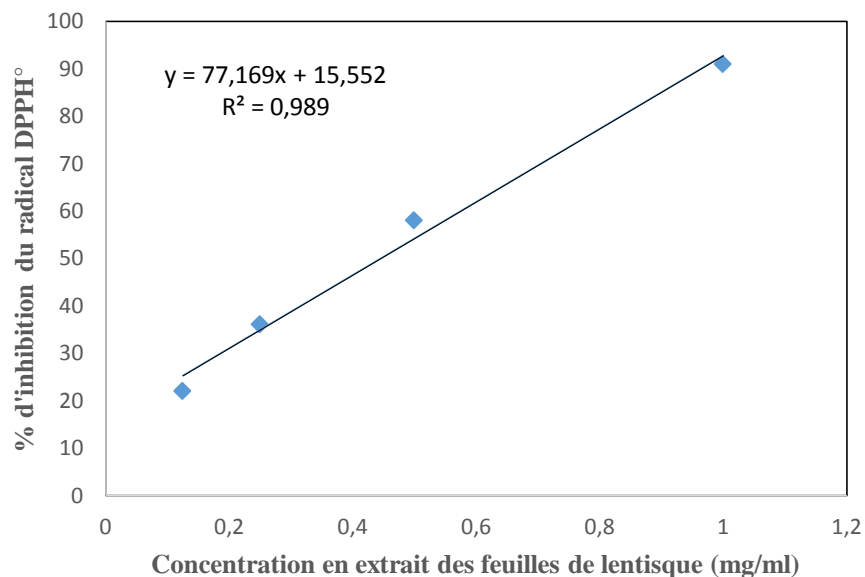


Figure 13 - Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction de la concentration en extrait des feuilles de lentisque

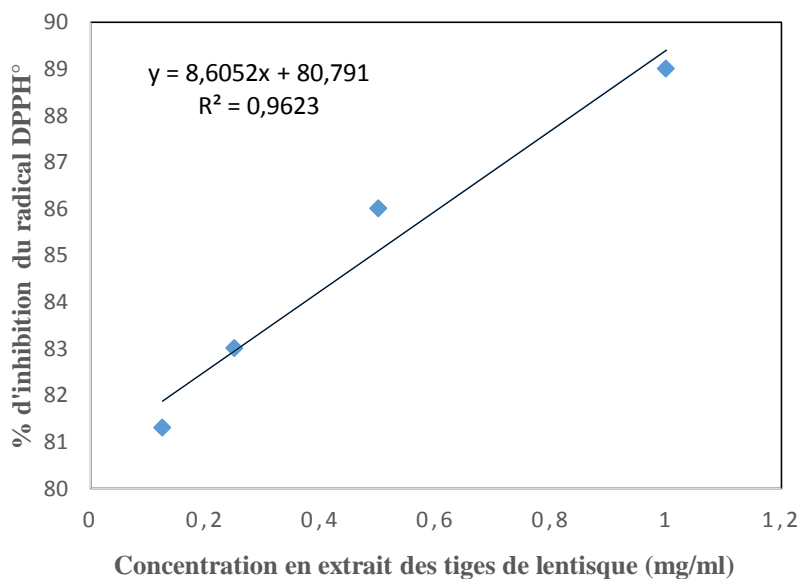


Figure 14 - Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction de la concentration des extraits des tiges de lentisque

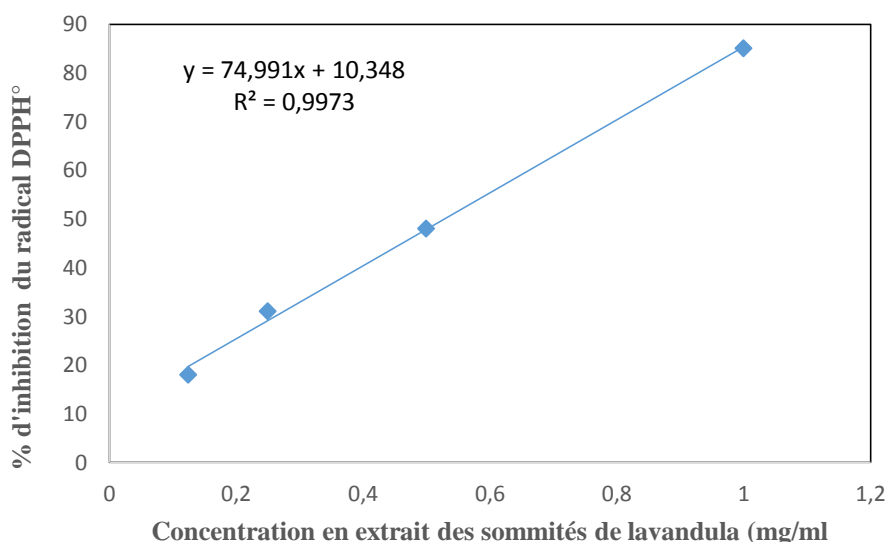


Figure15 - Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction de la concentration de l'extrait des sommités de lavande

L'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé car elle exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer de 50% la concentration du radical libre. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydante du composé est élevée **Djeddi et al. 2015**. Les valeurs d'IC₅₀ des extraits polyphénoliques des feuilles et tiges de lentisque ; des sommités de lavande ainsi que de l'acide ascorbique sont représentées sur la figure 16.

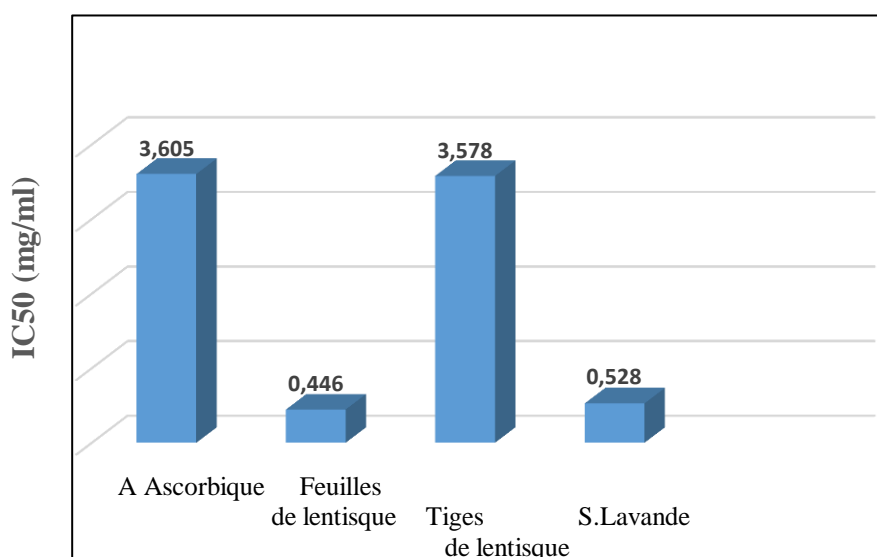


Figure16 - Valeur de l'IC 50 de l'acide ascorbique et des extraits polyphénoliques des feuilles et tiges de lentisque ainsi que des sommités de lavande

L'extrait polyphénolique issu des feuilles de lentisque présente un effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH avec une IC50 de 0,446mg/ml comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence. Vient ensuite l'extrait des sommités de lavande avec une IC50 de 0,528mg/ml puis celui des tiges de lentisque. Nous remarquons que la valeur de l'IC50 de l'extrait des tiges de lentisque (IC50=3,578mg/ml) est proche de celle du composé de référence, acide ascorbique (IC50=3,605mg/ml). Des résultats similaires ont été mentionnés dans plusieurs travaux antérieurs (Ferradji et al. 2011 ; Khadhri et al. 2012 ; Djeddi et al. 2015).

5-2- Test de la réduction du fer (FRAP)

Les résultats sont représentés sur la figure 17.

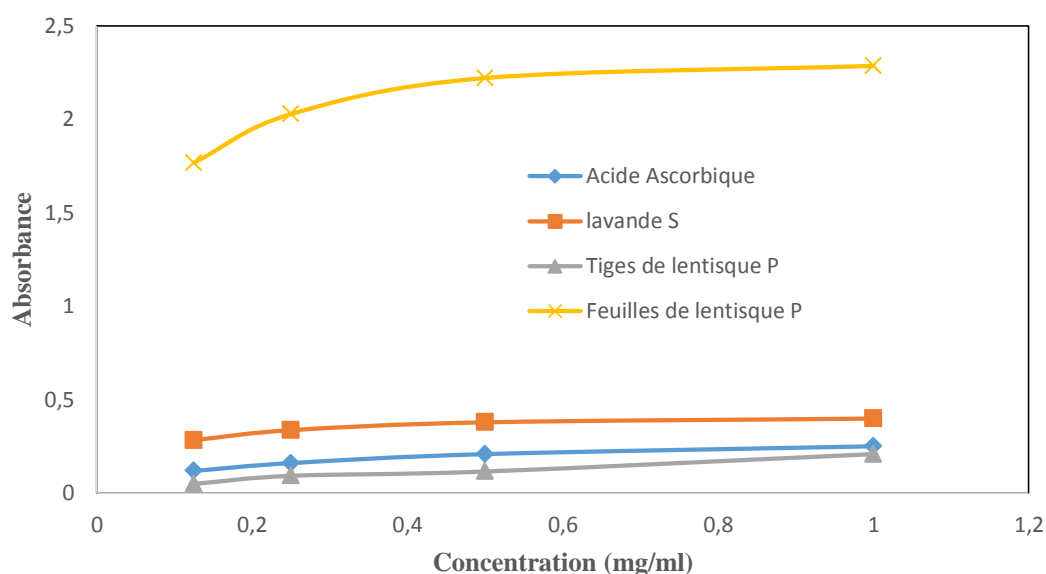


Figure17 – Evolution de l'absorbance de l'acide ascorbique et des extraits des feuilles et tiges de lentisque et des sommités en fonction de la concentration

Les données de la figure17 montrent que les absorbances des extraits polyphénoliques augmentent avec la concentration de ceux-ci. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur, cela peut s'expliquer par une concentration importante en composés polyphénoliques présents dans les extraits analysés. C'est le cas de l'extrait des feuilles de lentisque qui présente une capacité réductrice du fer plus importante que celle de la substance de référence, en occurrence l'acide ascorbique.

Les valeurs de l'absorbance des extraits des sommités de lavande sont assez proches de celles de l'acide ascorbique ce qui se traduit par une capacité réductrice équivalente. Par contre les valeurs d'absorbance des extraits des tiges de lentisque sont moins importantes comparativement à celle de l'acide ascorbique. Toutefois, des résultats similaires sont rapportés dans plusieurs travaux antérieurs (Basli et al. 2012 ; Khadhri et al. 2012 ; Djeddi et al. 2015).

6-Activité antibactérienne des différentes huiles

6-1- Activité antibactérienne des quatre huiles prises séparément

Les résultats de mesure des diamètres des zones d'inhibitions enregistrées avec les trois huiles essentielles et (Thym, lavande et Origan) et l'huile végétale de lentisque vis-à-vis des deux souches bactériennes sont présentés sur la figure 18 et regroupés dans le tableau 12.

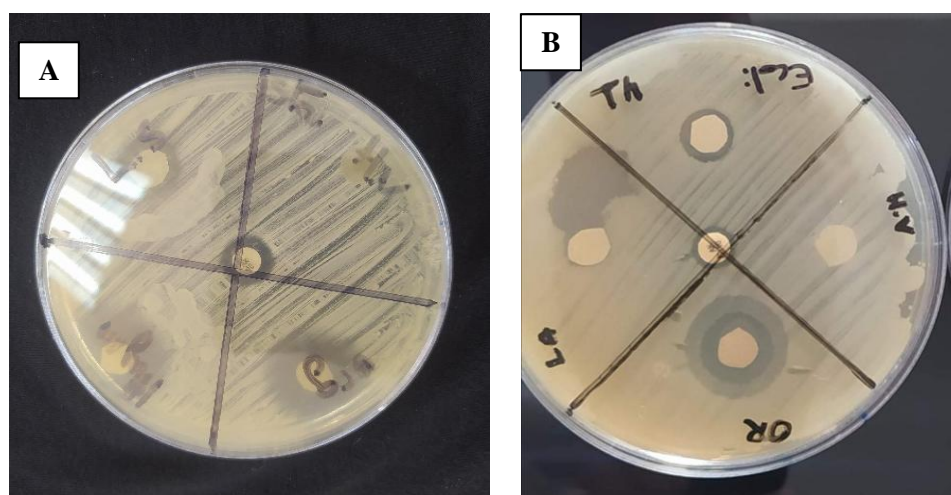


Figure 18 - Activité antibactérienne des trois huiles essentielles et l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes **A** : *S. aureus* ; **B** : *E. coli*

Tableau 12- Diamètre d'inhibition (en mm) des quatre huiles et du témoin (antibiotique) vis-à-vis de la croissance des bactéries *E. coli* et *S. aureus*

Souche bactérienne	Diamètres d'inhibition (mm)				
	<i>L.stoechas</i>	<i>T.numidicus</i>	<i>O.glandulosum</i>	<i>L.pistachier</i>	Témoin
E. coli	7	11,5	17	–	5
S. aureus	9	16	18,5	–	9

Les résultats sont exprimés en termes de diamètre de la zone d'inhibition qui peut être symbolisé par des signes selon la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles (Touhami 2017) :

- Non sensible (–) ou résistante (R) : diamètre < 5mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 7 et 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm

D'après les résultats présentés sur la figure 18 et le tableau 12, l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* ne présente aucune inhibition vis-à-vis des souches testées. En revanche, les huiles essentielles (*L. Stoechas*, *T. Numidicus* et *O. Glandulosum*) présentent un certain pouvoir inhibiteur vis à vis des deux souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*.

L'huile essentielle d'*Origanum Glandulosum* présente une meilleure inhibition vis-à-vis des souches testées. En effet, les diamètres observés pour *E. coli* et *S. aureus* sont respectivement de 17 et 18.5 mm

Quant à l'huile essentielle du *Thymus Numidicus*, une action inhibitrice remarquable est enregistrée vis-à-vis de la croissance des bactéries à Gram+ vu que le diamètre de la zone d'inhibition est de 16mm. Cependant, elle présente une sensibilité vis-à-vis de la bactérie à Gram– avec un diamètre d'inhibition de 11,5mm.

L'huile essentielle de *Lavandula stoechas* montre une action inhibitrice modérée vis-à-vis de la croissance des bactéries à Gram– et à Gram+ vu que les diamètres enregistrés étaient respectivement de 7 et 9mm.

L'antibiotique Amikacin 10µg utilisé comme témoin positif a enregistré une zone d'inhibition de 9 mm et 5 mm vis-à-vis respectivement de *S. aureus* et *E. coli*. Comparativement à ceux enregistrées pour les deux HEs *Thymus* et *Origanum*, nous pouvons conclure que ces deux dernières possèdent un pouvoir anti bactérien très puissant vis-à-vis de la croissance des deux souches *S. aureus* et *E. coli*.

6-2- Activité antibactérienne des mélanges HE/huile végétale

Les résultats de mesure du diamètre des zones d'inhibitions enregistrées avec les mélanges huile végétale de *lentiscus Pistacia* avec chacune des trois huiles essentielles (*Thymus numidicus*, *lavandula Stoechas* et *Origanum glandulosum*) vis-à-vis des deux souches bactériennes sont présentés sur la figure 19 et regroupés dans le tableau 13.

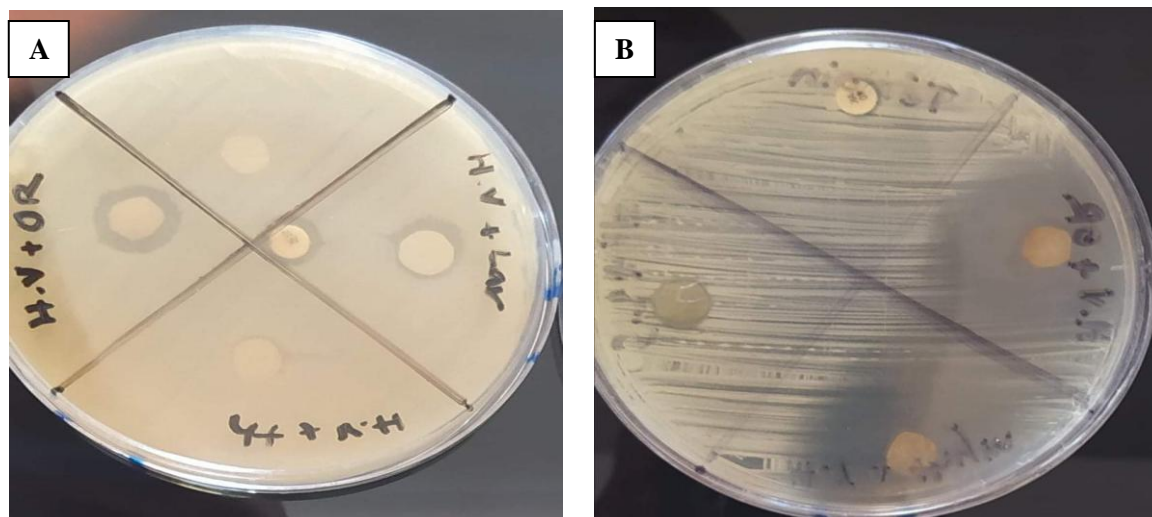


Figure 19 - Activité antibactérienne de l'association de chaque huile essentielle avec l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes **A** : *E. coli* ; **B** : *S. aureus*

Tableau 13 - Diamètres des zones d'inhibition enregistrés avec les mélanges huile végétale de lentisque et chacune des trois les HEs vis à vis des deux souches bactériennes

Souche bactérienne	Diamètres d'inhibition (mm)			
	Hv+HEL.Stoechas	Hv+HET.Numidicus	Hv+HEOriganum	Témoin
E. coli	9	6	10	6
S. aureus	5	15	13	6

D'après les résultats présentés dans le tableau 13, nous constatons que le mélange huile végétale de *Pistacia lentiscus* + HE du *Thymus numidicus* présente une sensibilité remarquable vis-à-vis de la bactérie Gram+ *S. aureus* avec un zone d'inhibition de 15mm. Cependant le pouvoir inhibiteur exercé vis-à-vis de la bactérie *E. coli* est équivalent à celui de l'antibiotique Amikacin 10µg vu que le diamètre d'inhibition enregistré est le même (6mm).

En revanche, une sensibilité à la bactérie *S. aureus* est enregistrée lors de l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* avec un diamètre d'inhibition de 13mm. Cependant vis-à-vis de la bactérie *E. coli*, nous avons enregistré une action inhibitrice modérée (diamètre d'inhibition de 10mm).

Une résistance de la bactérie à Gram+ est enregistrée avec un diamètre inférieur à 6mm dans le cas de l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*. Cependant ce mélange enregistre une faible activité inhibitrice vis-à-vis de la bactérie à Gram – vu que le diamètre est de 9mm.

D'après les résultats présentés par la figure 19 et enregistrés dans le tableau 13, l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec chacune des trois huiles essentielles abaisse l'activité anti bactérienne de ces dernières.

6-3- Activité antibactérienne des mélanges entre huiles essentielles

Les résultats de l'activité antibactérienne enregistrés avec le mélange à la fois des trois huiles essentielles (*Thymus numidicus*, *Lavandula stoechas* et *Origanum glandulosum*) et de celui de leur association deux à deux vis-à-vis des deux souches bactériennes sont présentés sur la figure 20 et regroupés dans le tableau 14.

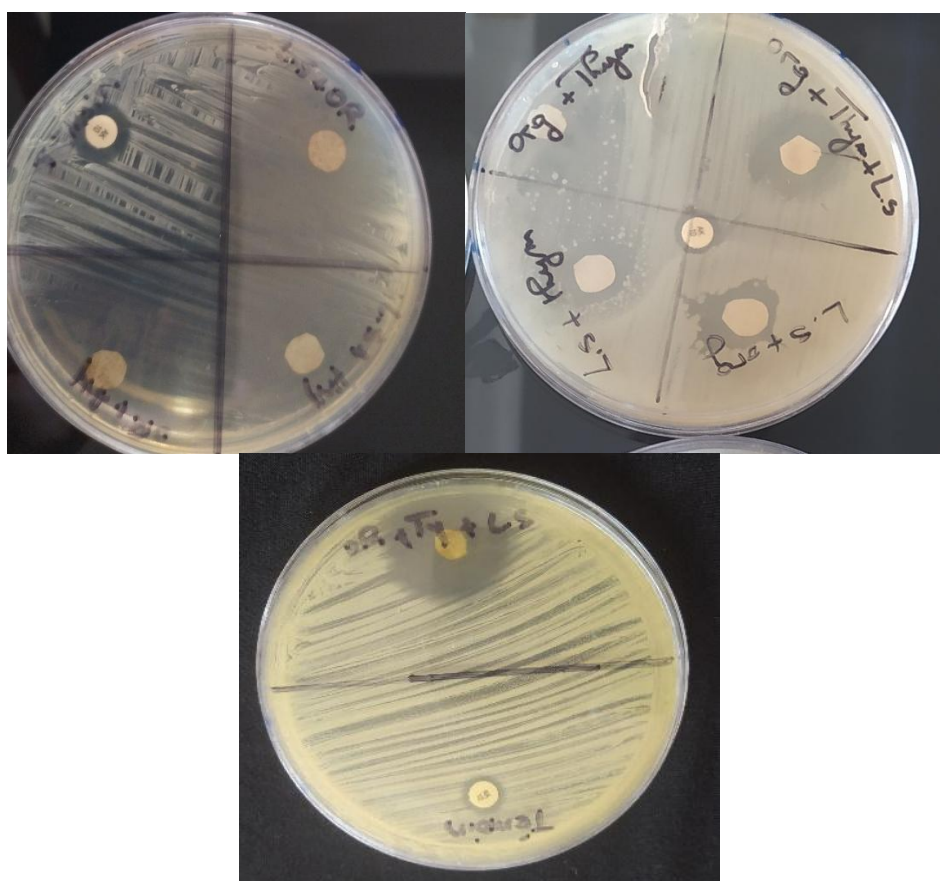


Figure 20 - Activité antibactérienne du mélange des trois huiles essentielles et de leur association deux à deux vis-à-vis des deux souches bactériennes

Les huiles essentielles *L. stoechas*, *T. numidicus* et *O. glandulosum*, associées, exercent une excellente inhibition vis-à-vis de la bactérie à Gram+ vu que le diamètre d'inhibition enregistré est de 25mm. Cependant une action inhibitrice très sensible vis-à-vis de la bactérie *E. coli* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 17mm.

Tableau 14 - Diamètres des zones d'inhibition enregistrés avec le mélange des différentes HEs vis à vis des deux souches bactériennes

Souche bactérienne	Diamètres d'inhibition (mm)				Témoin
	HEs Lavande + Origan	HEs Lavande + Thym	HEs Origan + Thym	HEs Lavande + Thym+ Origan	
E. coli	15	10	16	17	6
S. aureus	20	16,5	19,5	25	7

L'association des deux huiles essentielles *Origanum glandulosum* et *Thymus numidicus* a montré une action inhibitrice importante vis-à-vis des deux souches bactériennes. En effet les diamètres mesurés pour *E. coli* et *S. aureus* sont respectivement de 16 et 19,5mm

Une faible inhibition vis-à-vis la croissance de la bactérie à Gram– est enregistrée dans le cas de l'association huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Thymus numidicus*. Cependant ce mélange présente une bonne sensibilité vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* vu que le diamètre de la zone d'inhibition est de 16,5mm.

L'association des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Origanum glandulosum* montre une action inhibitrice remarquable vis-à-vis des souches testées dont le diamètre d'inhibition est de 15 et 20 mm respectivement pour *E. coli* et *S. aureus*

Comparativement à l'antibiotique Amikacin 10µg, pour lequel nous avons enregistré un diamètre d'inhibition de 6 et 7mm respectivement avec *E. coli* et *S. aureus*, nous pouvons confirmer la bonne synergie entre les trois HEs lors de leur association dans le mélange ainsi que leur très puissante activité anti bactérienne.

6-4- Activité antibactérienne du mélange de deux huiles essentielles avec l'huile végétale

Les résultats de l'activité antibactérienne enregistrés avec le mélange à la fois de deux huiles essentielles et de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* sont présentés sur la figure 21 et regroupés dans le tableau 15.

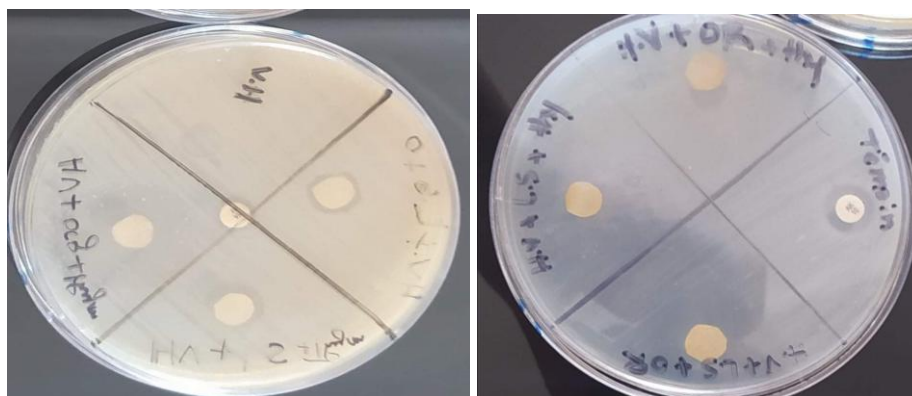


Figure 21 - Activité antibactérienne du mélange des deux huiles essentielles avec l'huile végétale vis-à-vis des deux souches bactériennes

Tableau 15 - Diamètres des zones d'inhibition enregistrés avec le mélange de deux HEs avec l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* vis à vis des deux souches bactériennes

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition (mm)			
	Hv+O.G+T.N	HV+L.S+T.N	HV+L.S+O.G	Témoin
E. coli	29	11	10	6
S. aureus	24	13,5	19,5	8

Les résultats obtenus lors de l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec les huiles essentielles deux à deux nous ont permis de dresser les constats suivants :

- Le mélange HEs Origan + Thymus avec l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* exerce une action inhibitrice intense vis-à-vis des souches testées. En effet les diamètres d'inhibition mesurés avec *E. coli* et *S. aureus* sont respectivement de 29 et 24mm.
- En revanche, une sensibilité remarquable des deux bactéries est enregistrée dont dans le cas de l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec les deux huiles essentielles *L. stoechas* et *T. numidicus*.
- L'association des huiles essentielles de lavande et origan avec l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* a engendré une inhibition remarquable et intense vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* mais très faible devant la bactérie *E. coli*.

Les huiles essentielles (*T. numidicus*, *L. stoechas* et *O. glandulosum*), exercent une action inhibitrice modérée vis à vis de la croissance des bactéries à gram (-). Cependant, elles montrent une sensibilité remarquable vis-à-vis des bactéries à gram (+).

Chapitre 3 – Résultats et Discussion

En effet, les bactéries à Gram + sont plus sensibles à l'action des huiles essentielles que celle à Gram-. Par ailleurs, la paroi des bactéries à Gram+ est riche en protéines tandis que celle des souches Gram-est assemblée en polysaccharides (LPS). Ainsi la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace (**Basli et al. 2012**).



Conclusion générale

Conclusion

L'objectif de ce présent travail a porté en premier lieu sur la caractérisation phytochimique des métabolites extraits des parties aériennes séchées de *Pistacia lentiscus* et *Lavandula Stoechas* obtenus par macération ou décoction.

En second lieu, sur l'évaluation du taux en polyphénols des différents macéras obtenus ainsi que leur activité antioxydante évaluée par les méthodes au DPPH et réduction du fer (FRAP). En dernier lieu, l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile végétale de Lentisque et des huiles essentielles de *Thymus numidicus*, *Lavandula Stoechas* et *Origanum Glandulosum*, vis-à-vis de deux souches bactériennes.

L'extraction des métabolites secondaires a enregistré de meilleurs rendements avec la macération comparativement à la décoction ou à l'extraction par soxhlet. Les feuilles de *Pistacia lentiscus* renferment plus de métabolites secondaires comparativement aux sommités de *Lavandula stoechas* quel qu'en soit la technique d'extraction utilisée. Par ailleurs, le meilleur rendement d'extraction a été enregistré avec le méthanol (27,068%) et le mélange hydro alcoolique méthanol-eau (36,17%). L'usage simultané de l'eau et d'un solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans les solvants organiques.

Les résultats des tests phytochimiques ont révélé que les extraits des feuilles et des tiges de *Pistacia lentiscus* sont les plus riches en composés actifs (tanins catéchiques et galliques, les flavonoïdes, les stérols et triterpènes, les saponines, les alcaloïdes et les composés réducteurs). Alors que les extraits des sommités de *Lavandula Stoechas* en sont moins riches (tanins, flavonoïdes et coumarines).

L'extrait polyphénolique issu des feuilles de lentisque présente un effet inhibiteur remarquable sur le radical DPPH avec une IC50 de 0,446mg/ml comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence. Suivi de l'extrait des sommités de lavande avec une IC50 de 0,528mg/ml puis celui des tiges de lentisque (IC50 de 3,578mg/ml).

L'activité antibactérienne de l'huile végétale de lentisque et des trois huiles essentielles de Lavandula, Origanum et Thymus a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis des bactéries *E. coli* et *S. aureus*.

Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles de *Thymus numidicus*, *Lavandula stoechas* et *Origanum glandulosum* ont présenté une activité antibactérienne significative comparativement à l'antibiotique pris comme témoin. En revanche l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* n'a présenté aucune activité antibactérienne vis-à-vis des deux bactéries *S. aureus*, *E. coli*.

Par ailleurs, l'association de l'huile végétale du *Pistacia lentiscus* avec chacune des trois huiles essentielles abaisse significativement l'activité anti bactérienne de ces dernières.

L'association entre les trois huiles essentielles (*L. stoechas*, *T. numidicus* et *O. glandulosum*) exerce un effet synergique et augmente leur activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches testées *S. aureus* et *E. coli*

Le travail présenté dans ce modeste mémoire ne constitue qu'une simple contribution à l'évaluation du pouvoir thérapeutique des extraits des quatre plantes médicinales : *Lavandula stoechas* ; *Thymus numidicus* ; *Origanum glandulosum* et *Pistacia lentiscus*. Il serait judicieux de poursuivre le travail en exploitant d'autres activités thérapeutiques telles que l'activité anti-inflammatoire, cicatrisante ; anti tumorale, antifongique...etc. Puis effectuer une étude toxicologique afin d'évaluer le seuil de toxicité pour chacune des huiles et extraits étudiés dans le contexte de ce mémoire.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ahamet S (2003) Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 117 p.

B

Baba Aissa F (1999) Encyclopédie' des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie moderne-Rouiba, pp. 194-231

Bammou. M, Amine Daoudi, Ikram Sliman, Mariam Najem, El Houssine Bouiamrine, Jamal Ibjibijen et Laila Nassari, (2015). Appl. Biosci. Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. » : Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien Journal of Applied Biosciences 86 :7966– 7975 ISSN 1997–5902

Basli. A, Chibane. M, Madani. K, Oukil. N (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie (10) pp 2–9.

Bekro YA., Mamyrbekova JA., Boua BB., Ehile EE, (2007). Étude Ethnobotanique Et Screening Phytochimique de *Caesalpinia Benthamiana* (Baill.) Herend.et Zarucchi (Caesalpinaceae). Sciences & Nature : Vol. 4, No. 2, 217-225

Benayache Samir (2013). Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus poiret*. Mémoire de Magister en Chimie Organique – Université de Constantine 1

Berrani. A, L. Aicha LRHORFI, F. Z. DAHMANI, H. FKHIR, R. Bengueddour, (2019) “Criblage Phytochimique De Deux Plantes Médicinales : *Vitex Agnus Castus* Et *Anabasis Aretioïdes*”, vol.7, ISSN 2111-4706.

Bossokpi.I.P. L (.2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 133 p.

Bougandoura.n and N. Bendimerad, (2012) “Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq.” *Nature et technologie*, pp. 14–19.

Boukeloua, A. (2009) Caractérisation botanique et chimique et évaluation pharmacotoxicologique d'une préparation topique à base de l'huile de *Pistacia lentiscus* L. thèse de magister mémoire en Biologie. Spécialité : Biotechnologie végétal. Université Mentouri Constantine.

Bourkhiss .M (2015) Etude Physicochimique De L'huile Essentielle De cyprés de l'Atlas *Tetraclinis Articulata*, (Vahl) Masters Du Plateau Central Marocain Les Technologies De Laboratoire, Volume 9, N°37

Références bibliographiques

Bouteldj F. et Kadjoudj Z (2013) Etude des paramètres physico-chimiques de l'huile de fruits de pistachier lentisque : *Pistacia lentiscus L.* (Drou) de Mila et de Jijel. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en Nutrition et en Technologies Agro-Alimentaires, I.N.A.T.A.A. Université Constantine1, 68 p.

Boyle W. (1955) *Am. Perfumer Essent. Oil Rev.* 66 : 25-28.

Burt S. (2004) Review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 : 223-253.

C

Cavin A (1999) Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires : *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse Université d'Indonésie

Chabrier J, (2010) "Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie," thèse de doctorat. Université de Henri Poincaré- Nancy.

Chiej R (1984) Macdonald encyclopedia of medicinal plants. Ed Macdonald, London, pp. 212-7 toxicologique d'une préparation topique à base de l'huile de *Pistacia lentiscus L.* thèse de magister mémoire en Biologie. Spécialité : Biotechnologie végétal. Université Mentouri Constantine.

D

Daira.N.E.H, M. C. Maazi, and A. CHefreur, (2016) "Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien," *Bull. la Société R. des Sci. Liège*, vol. 85, pp. 276–290.

De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63

Dibacto R. E. K. et al (2021) "Total Polyphénol and Flavonoid Content and Antioxidant Capacity of Some Varieties of *Persea americana* Peels Consumed in Cameroon," *Scientific World Journal*

Dif, M. Benyahia, F. Toumi Benali, M.Rahmani, S. Bouazza (2016). Phenolic content and antioxidant activity of three Algerian species of lavenders. *Lavoisier SAS*, pp 1-6.

Dif.M, (2015) et al, "Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas L.*," *Phytotherapie*, vol. 13, no. 5, pp. 314–319, 2015.

Dimitrios et al (2015). Secondary metabolites from *Thymus numidicus* Poiret. *Biochemical Systematics and Ecology* 59 pp 104-106.

Djeddi Samah, Elina Yannakopoulou, Kyriakos Papadopoulos, Helen Skaltsa. (2015). Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus*

Références bibliographiques

Numidicus Poiret, Algérie. Afrique SCIENCE 11(2) pp 58-65.

Dohou R., Yamni K., Tahrouch S., Hassani IL., Badoc A., Gmira N, 2003. Screening Phytochimique d'une Endémique Iberomarocaine, *Thymelaea Lythroides*. Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux : Vol. 142, No. 1/4, 61-78.

E

Ekoumou C, (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.

F

Ferradji, A. (2011). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Biochimie Appliquée, université Ferhat Abbas –Sétif.

G

Gaborieau Benoit (2015). Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de la Vienne. Thèse de doctorat. Université de POITIERS, France.

Gainard Audrey (2016) Lavandes et Lavandin, utilisation en aromathérapie. Enquête auprès des pharmaciens d'officine. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux. France.

Guignard J.L (1996). Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.

H

Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66, PP. 2047–2055

I

Ietswaart JH (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae) In chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Leiden Botanical series 4. Leiden University Press, la Haye.

ISO 3657 : 1977.- Corps gras d'origines animale et végétale. Détermination de l'indice de Saponification.

Iwueke A.V, Nwodo O. F.C (2008). Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri* 20: 63 – 70

Références bibliographiques

K

Kabouche Ahmed (2005). Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine. Faculté des sciences exactes

Kalla Ali (2012). Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse de Doctorat en Sciences. Option : photochimie. Université Mentouri –Constantine

Kalemba D, Kunicka A. (2003). *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829

Karleskind A., (1992). -Manuel des Corps Gras, Tech. & Doc. Lavoisier, tome (I-II), p768, p1571.

Khadheri. A, R. EL MOKNI, and S. SMITI (2012) “Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de Chardon A Glu : *Atractylis gummifera*,” *Rev. Soc. Sci. Nat. Tunisie*, no. May, pp. 39–44.

Khoudali. S, et al (2014), “Étude De L’Activité Antioxydante Et De L’Action Anti Corrosion De L’Extrait Méthanolique Des Feuilles Du Palmier Nain (*Chamaerops Humilis L.*) Du Maroc,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 887–898.

Kurt R. and Nguyen DT, (1971). Chromatographie Sur Couches Minces. Gauthier-villars.

L

Lamiae Bachiri, Ghizlane Echchegadda, Jamal Ibijbjen, Laila Nassiri (2016) "Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones au Maroc: *Lavandula stoechas L.* et *Lavandula dentata L.*" *European Scientific Journal*. Edition vol.12, No.30 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857-7431.

Lehmann Hélène (2013) Le médicament à base de plantes en Europe, statut, enregistrement, contrôles. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg

Lim, T.K (2014). *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1, pp.656687): Springer

Lis-balchin M. (2002): *Lavender, the genus Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis, 268p.

Longanga Otshudi A., Foriers A., Vercruysse A., Van Zeebroeck A., Lauwers S, (2000). In Vitro Antimicrobial Activity of Six Médicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Dysentery and Diarrhoea in Democratic Republic of Congo (Drc). *Phytomedicine* : Vol. 7

M

Macheix Jean-Jacques, Annie Fleuriet, Christian Jay-Allemand (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. Edition : Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes

Références bibliographiques

Medi –Saric, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A. (2004). Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. Original Scientific Paper, 77, (1–2), PP.361-366.

Menaceur Fouad (2015). Contribution à l'étude phytochimique et biologique de l'érigéron, du fenouil commun, de la lavande et du genévrier. Thèse de Doctorat

Megnounif. I, (2011) “ Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydante d'Urtica Dioica (l'Ortie),” thèse de Magister. Université Aboubekr Blekaid de Tlemcen.

Muanda Nsemi F (2010) Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine – Metz.

P

Piccaglia R, Marotti M, Giovanelli E, et al. (1993) Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. Industrial crops and Products 2 : 47-50

Pourmourad.f, S. J. HOSSEINIMEHR, and N. SHAHABIMAJD (2006) “Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants,” *African J. Biotechnol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1142–1145.

Q

Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II, CNRS, Paris, p. 819

S

Sijelmassi A (1991) Les plantes médicinales du Maroc. 2e éd., Le Fennec, p. 199

Sqalli H., El Ouarti A., Ennabili A., Ibsouda S., Farah A., Haggoud A., Houari A., Iraqui M, 2007. Évaluation de l'effet Antimycobactérien de Plantes du Centre-Nord du Maroc. Bull Soc Pharm : Vol. 146, 271-288

T

Taleb-Toudert Karima (2015). Extraction et caractérisation des HE de 10 plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leur effet sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de Doctorat. UMMTO

Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K., Vlietinck AJ, 1998. Antiamoebic and Phytochemical Screening of Some Congolese Medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacology : Vol. 61, No. 1, 57-652, 167-172

Touhami A (2017). Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar ANNABA.

Références bibliographiques

Y

Yazag K et Baik F (2011). Extraction et caractérisation physico-chimiques des flavonoïdes des feuilles de Citrus Lemon. Mémoire de fin de cycle. Option : Géniechimique. Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa.

Z

Zeghib Assia (2013). Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémique du genre Thymus. Thèse de Doctorat en Sciences. Université de Constantine 1. Faculté des Sciences exactes.



Annexes

Réactifs de caractérisation

Réactif de Mayer

Chlorure de mercure ...1.36g

Iodure de potassium...5g

Eau distillée ...qsp 100ml

Dissoudre 1.36g de $HgCl_2$ dans 60ml d'eau distillée.

Dissoudre 5g de KI dans l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume jusqu'à 100ml d'eau. Annexe

Solutions à préparer pour le test du pouvoir réducteur FRAP

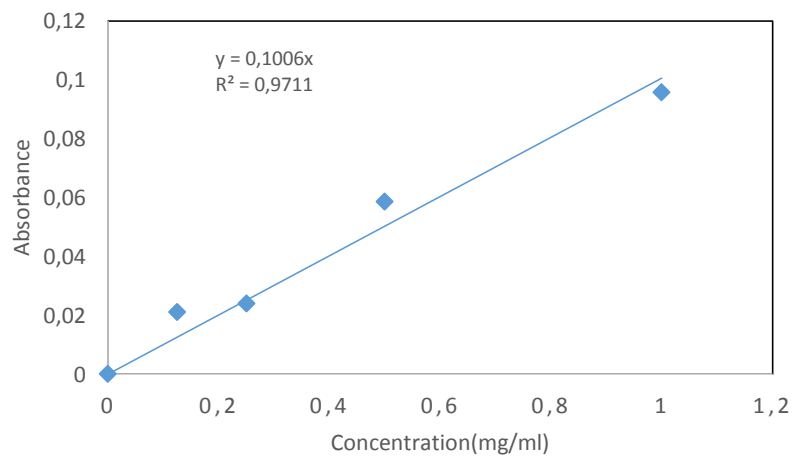
- **FeCl₃ à 0.1%** : peser 0.1 g de FeCl₃ et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- **Ferricyanure de potassium à 1%** : peser 1g de Ferricyanure de potassium et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- **TCA à 10%** : peser 10 g de TCA et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- **Tampon phosphate** : pour préparer une solution tampon phosphate pH=6.6, on introduit 250ml de solution de phosphate monopotassique 0.2M dans une fiole jaugée de 1000ml, ajouter un volume de 222.5ml de NaOH puis compléter jusqu'à 1000ml avec de l'eau distillée.



Mesure de l'activité antioxydante des extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et sommité.



Test au DPPH



Courbe d'étalonnage de l'absorbance des solutions d'acide Ascorbique mesurée à 515nm