

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة- الحراش-الجزائر-

*Ecole Nationale Supérieure Agronomique- El-Harrach-Alger*



Département de Technologie Alimentaire

## *Thèse*

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

## *Thème*

*Etude phytochimique des extraits de Pistacia lentiscus (L.). Activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide.*

*Présentée par :*

M<sup>elle</sup>. Djamila Belhachat

*Soutenue le :02/05/2019*

*Jury :*

M<sup>me</sup>.Ferhat Z, Professeur (ENSA., Alger)

Présidente

M<sup>me</sup>.Aid F, Professeur (USTHB., Alger)

Directrice de thèse

M<sup>r</sup>. Mekimene L, Professeur (ENSA., Alger)

Co-directeur de thèse

M<sup>me</sup>.Doumandji Mitiche B, Professeur (ENSA., Alger)

Examinatrice

M<sup>me</sup>.Belkebir A, Professeur (USTHB., Alger)

Examinatrice

M<sup>r</sup>. Kameli A, Professeur (ENS., Alger)

Examineur

**Année Universitaire 2018/2019.**

# Sommaire

# Sommaire

	<b>Pages</b>
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des annexes</b>	
<b>Introduction</b> .....	1
 <b><u>Partie 1: Etude bibliographique</u></b> 	
<b>I.Monographie de la plante</b> .....	4
I.1.Etude botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> (L.).....	4
I.1.1.Taxonomie et systématique de la plante.....	4
I.1.2. Description morphologique de la plante.....	4
I.1.3. Répartition géographique de <i>Pistacia lentiscus</i> (L.) .....	5
I.2. Etude chimique de <i>Pistacia lentiscus</i> (L.).....	6
I.2.1. Fruits .....	6
I.2.2. Feuilles.....	7
I.2.3. La résine.....	7
I.3.Utilisations raditionnelles.....	7
I.4. Effets thérapeutiques et activité biologique de <i>Pistacia lentiscus</i> (L.).....	8
<b>II. Les huiles essentielles et les composés phénoliques</b> .....	8
II.1. Les huiles essentielles.....	8
II.1.1. Aperçus historique .....	8
II.1.2. Définition.....	9
II.1.3. Localisation et lieu de synthèse.....	9
II.1.4.Composition chimique des huiles essentielles.....	10
II.1.4.1. Terpènes.....	10
II.1.4.2. Les composés aromatiques.....	10
II.1.4.3.Composés d'origines variée.....	10
II.1.5. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles.....	11

---

II.1.5.1. Biosynthèse des terpènes.....	11
II.1.6. Composition quantitative et qualitative des Huiles Essentielles.....	13
II.1.6.1. Facteurs intrinsèques.....	13
II.1.6.2. Facteurs extrinsèques.....	13
II.1.7. Rôle des huiles essentielles dans la plante.....	13
II.1.8. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques.....	14
II.1.9. Conditions de récolte et d'extraction.....	15
II.1.10. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	16
II.1.10.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des huiles essentielles.....	16
II.1.10.1.1. Hydrodistillation.....	16
II.1.10.1.2. Entraînement à la vapeur.....	16
II.1.10.1.3. Hydrodiffusion.....	17
II.1.10.1.4. Expression à froid.....	17
II.1.10.1.5. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet.....	17
II.1.10.2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles.....	17
II.1.10.2.1. Extraction assistée par micro-ondes.....	18
II.1.10.2.2. Extraction au fluide supercritique.....	18
II.1.10.2.3. Turbo hydro-distillation "THD".....	18
II.1.10.2.4. Extraction par détente instantanée contrôlée "DIC".....	18
II.1.10.2.5. Hydrodistillation assistée par ultrasons.....	19
II.1.11. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	19
II.1.11.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	19
II.1.11.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) .....	20
II.1.11.3. La chromatographie liquide à haute performance.....	20
II.1.11.4. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN.....	21
II.1.12. Toxicité des huiles essentielles.....	21
II.1.13. Domaines d'application des huiles essentielles.....	22

---

II.1.14. La conservation des huiles essentielles.....	23
II.1.15. Principaux marchés des huiles essentielles.....	23
II.2. Les composés phénoliques.....	23
II.2.1. Définition .....	24
II.2.2. La classification et structure des composés phénoliques.....	24
II.2.3. Localisation des composés phénoliques dans la plante.....	26
II.2.4. Biosynthèse des composés phénoliques.....	27
II.2.4.1. Voie de l'acide shikimique.....	26
II.2.4.2. Voie de l'Acétate.....	27
II.2.5. Rôle et intérêts des composés phénoliques.....	27
II.2.5.1. Chez les végétaux.....	27
II.2.5.2. Utilisation des substances phénoliques par les humains.....	28
II.2.6. Extraction des composés phénoliques .....	28
II.2.6.1. Méthode d'extraction conventionnelle.....	29
II.2.6.2 Méthodes d'éco-extraction .....	30
II.2.6.2. 1.Extraction assistée par ultrasons.....	30
II.2.6.2.2. Extraction assistée par micro-ondes.....	30
II.2.6.2.3. Extraction par fluide pressurisé.....	31
II.2.6.2.4. Extraction par eau subcritique.....	31
II.2.6.2.5. Extraction par fluide supercritique.....	31
II.2.6.2.6. Extraction assistée par des enzymes pectolytiques .....	32
II.2.7. Propriétés chimiques et mécanismes d'action contre les radicaux libres.....	32
II.2.8. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques.....	33
II.2.9. Applications industrielles des polyphénols.....	34
<b>III. Activité antioxydante .....</b>	<b>34</b>
III.1. Le stress oxydant.....	34
III.2. Les radicaux libres.....	34
III.2.1. Production des radicaux libres.....	35

---

III.2.2. Conséquences moléculaires du stress oxydatif.....	36
III.2.3. Alimentation et stress oxydant.....	37
III.3. Les antioxydants.....	37
III.3.1. Les différents types d'antioxydants.....	37
III.3.2. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant.....	38
III.3.3. Mécanismes d'action des antioxydants.....	39
III.3.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	39
<b>VI. Activité antimicrobienne.....</b>	<b>42</b>
IV.1. Diversité du monde microbien.....	42
IV.1.1. Les bactéries .....	42
IV.1.2. Les champignons .....	44
IV.2. Types d'agents antimicrobiens .....	44
IV.3. Huiles essentielles comme agents antimicrobiens.....	45
IV. 4. La nature de l'activité antibactérienne.....	46
IV.5. Mode d'action contre les bactéries .....	47
IV.6. Effets antimicrobiens des composants d'huiles essentielles.....	48
IV.7. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	48
IV.7.1. Activité liée à la composition chimique.....	49
IV.7.2. Activité liée au microorganisme.....	49
IV.8. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	50
IV.8.1. Techniques de screening des huiles essentielles.....	50
IV.8.1.1. Aromatogramme.....	50
IV.8.1.2. Technique de diffusion en puits.....	51
IV.8.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles.....	51
IV.8.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide.....	51
IV.8.2.2. Techniques de diffusion en milieu liquide.....	51
IV.8.2. 3. Techniques de diffusion en phase vapeur.....	52
<b>V. Activité insecticide.....</b>	<b>52</b>

---

V.1. Etude bioécologique du <i>Tribolium castaneum</i> .....	52
V.1.1. Les caractères généraux des Ténébrionidés .....	53
V.1.2. Etude du genre <i>Tribolium</i> .....	53
V.1.3. Position systématique .....	53
V.1.4. Origine et distribution géographique .....	54
V.1.5. Description morphologique des différents stades du <i>Tribolium castaneum</i> ....	54
V.1.5.1. L'adulte.....	54
V.1.5.2. L'œuf .....	54
V.1.5.3. La larve.....	54
V.1.5.4. La nymphe.....	55
V.1.6. Biologie et cycle de développement .....	55
V.2. Ethologie.....	56
V.2.1. Mobilité .....	56
V.2.2. Régime alimentaire .....	56
V.3. Les ennemis naturels .....	56
V.4. Pertes et dégâts.....	57
V.5. Stratégies et moyens de lutte .....	57
V.5.1. Méthodes traditionnelles .....	58
V.5.2. La lutte chimique.....	58
V.5.3. Lutte biologique.....	59
V.5.4. Lutte physique.....	60
V.5.5. Lutte par l'utilisation des plantes.....	60
V.6. Effet des huiles essentielles sur les insectes .....	61

## **Partie2 : Etude expérimentale**

<b>Chapitre I : Matériel et méthodes</b> .....	63
I.1. Le matériel biologique.....	63
I.1.1. Matériel végétal.....	63

---

I.1.2. Matériel microbiologique .....	63
I.1.3. Matériel entomologique .....	64
I.2. Détermination du taux d'humidité.....	64
I.3. Screening phytochimique.....	64
I.3.1. Etude qualitative des substances extraites à l'eau à chaude.....	64
I.3.2. Etude qualitative des substances extraites à l'éthanol.....	65
I.3.3. Etude qualitative des substances extraites à l'acide sulfurique.....	67
I.4. Elaboration des coupes histologiques.....	67
I.5. Extraction des composés du métabolisme secondaire.....	67
I.5.1. Extraction de l'huile essentielle des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.) par la méthode d'hydrodistillation assistée par ultrasons .....	67
I.5.1.1. Prétraitement dans un bain à ultra son.....	68
I.5.1.2. Extraction par hydrodistillation standard.....	68
I.5.1.3. Rendement d'extraction .....	68
I.5.1.4. Optimisation du rendement d'extraction par hydrodistillation assistée par ultrasons.....	68
I.5.1.5. Evaluation des conditions optimales d'extraction.....	69
I.5.1.6. Modélisation des surfaces de réponse.....	70
I.5.1.7. Analyse de la variance.....	70
I.5.2. Préparation des extraits non volatils des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	70
I.5.2.1. Extraction par solvants.....	70
I.5.2.2. Extraction par l'eau .....	71
I.5.2.3. Calcul du rendement d'extraction .....	71
I.6. Détermination de la teneur en polyphénols totaux .....	71
I.7. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux .....	72
I.8. Caractérisation des huiles des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	72
I.8.1. Caractérisation des huiles essentielles de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	72
I.8.1.1. Caractéristiques organoleptiques.....	72
I.8.1.2. Caractéristiques physicochimiques.....	73

---

I.8.1.3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles de <i>P. lentiscus</i> (L.) par CPG et CPG/SM.....	76
I.8.1.3.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse seule (CPG).....	76
I.8.1.3.2. Analyse semi-quantitative de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> (L.) par (CG/SM).....	76
I.8.2. Caractérisation des l'huile fixe de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	77
I.8.2.1. Caractéristiques organoleptiques.....	77
I.8.2.2. Caractéristiques physicochimiques .....	77
I.8.2.3. Détermination de la composition chimique.....	78
I.8.2.3.1. Composition en acides gras.....	78
I.8.2.3.2. Extraction de l'insaponifiable (Norme française T60 205).....	79
I.8.2.3.3. Extraction des phosphatides.....	79
I.8.2.3.4. Détermination de la teneur en pigments.....	80
I.9.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	81
I.9.1. Piégeage du radical libre DPPH* (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).....	81
I.9.1.1. Détermination de la concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC <sub>50</sub> )...82	
I.9.2. Mesure du pouvoir réducteur .....	82
I.9.3. Le test ABTS ou 2, 2-Azino-bis (3-rthylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity .....	82
I.10.Evaluation de l'activité antimicrobienne de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	83
I.10.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits étudiés par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.....	83
I.10.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits étudiés par la méthode de dilution en milieu solide .....	85
I.10.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide.....	85
I.10.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	86
I.11.Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle et des extraits de <i>P. lentiscus</i> (L.) sur <i>Tribolium castaneum</i> .....	87
I.11.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles et des extraits par contact.....	87

---

I.11.1.1. Principe.....	87
I.11.1.2. Protocole expérimental.....	87
I.11.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles et des huiles fixes par inhalation.	88
I.11.2.1 Principe .....	88
I.11.2.2 Protocole expérimental .....	88
I.11.3. Calcul des doses et des temps létaux.....	89
I.11.3.1. Calcul des doses létales DL <sub>30</sub> , DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> .....	89
I.11.3.2. Calcul des temps létaux TL <sub>30</sub> , TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> .....	90
I.12. Analyse statistique .....	90
<b>Chapitre II: Résultats et discussion.....</b>	<b>91</b>
II.1. Le taux d'humidité et de matière sèche .....	91
II.2. Le screening phytochimique de l'espèce <i>P. lentiscus</i> (L.).....	92
II.3. Structure histologique des différentes organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	93
II.4. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.....	94
II.4.1. Optimisation du rendement d'extraction de l'huile essentielle par la méthodologie des surfaces de réponses.....	95
II.4.1.1. Plan d'expérience Box-Behnken et modèle statistique.....	95
II.4.1.2. Analyse statistique et Evaluation de la qualité du modèle.....	97
II.4.1.3. Analyse graphique du modèle .....	101
II.4.1.4. Effets des différents paramètres sur le rendement d'extraction en huile essentielle par "EAU".....	102
II.4.1.4.1. L'effet du temps d'extraction.....	103
II.4.1.4.2. L'effet de la puissance ultrasonique.....	103
II.4.1.4.3. Le ratio matériel végétal /eau.....	105
II.4.1.5. Analyse des surfaces de réponses et tracés de contours.....	106
II.5. Etude des caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle extraite des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	111
II.6. Caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle extraite des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	111

---

II.7. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CG) et (CG/SM).....	114
II.8. Caractéristiques et Rendements des extraits phénoliques des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	117
II.8.1. Extraction et rendement.....	117
II.8.2. Etude de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	120
II.8.2.1. Teneur en huile fixe des fruits rouges et des fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	120
II.8.2.2. Caractérisation de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	120
II.8.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques .....	120
II.8.2.2.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques.....	121
II.8.2.2.3. Analyse de la composition chimique de l'huile fixe des fruits rouges et noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	124
II.8.2.2.3.1. Composition en acides gras de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) par Chromatographie en phase Gazeuse (CG) .....	124
II.8.1.2.3.2. Teneur en phosphatides.....	126
II.8.1.2.3.3. Teneur en insaponifiables.....	126
II.8.1.2.3.4. Teneurs en pigments de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	127
II.9. Détermination de la teneur en composés phénoliques des extraits des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.) par spectrophotométrie.....	129
II.9.1. Teneur en polyphénols totaux.....	129
II.9.2. Teneur en flavonoïdes totaux.....	131
II.10. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	132
II.10.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	133
II.10.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH• de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	133

---

II.10.1.2. Activité de piégeage du radical DPPH• des extraits non volatils de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	135
II.10.1.3. Activité de piégeage du radical DPPH• de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	139
II.10.2. Activité de piégeage du radical ABTS.....	140
II.10.2.1. Activité de piégeage du radical ABTS de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	140
II.10.2.2. Activité de piégeage du radical ABTS des extraits non volatils de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	141
II.10.2.3. Activité de piégeage du radical ABTS de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	146
II.10.3. Mesure du pouvoir réducteur.....	146
II.10.3.1. Pouvoir réducteur de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	147
II.10.3.2. Pouvoir réducteur des extraits non volatils de <i>P.lentiscus</i> . (L.).....	148
II.10.3.3. Pouvoir réducteur de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P.lentiscus</i> (L.).....	152
II.11. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de <i>P.lentiscus</i> (L.).....	153
II.11.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits analysés .....	154
II.11.1.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées.....	154
II.11.1.2. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des extraits testés.....	156
II.11.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits analysés .....	160
II.11.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	160
II.11.2.1.1. Les huiles essentielles.....	160

---

II.11.2.1.2. Les extraits.....	161
II.11.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	164
II.11.2.2.1. Cas des huiles essentielles.....	164
II.11.2.2.2. Cas des extraits.....	165
II.12. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de <i>P.lentiscus</i> (L.).....	168
II.12.1.Evaluation de l'activité insecticide par « Effet contact » sur <i>Tribolium castaneum</i> .....	168
II.12.1.1. Evaluation de la toxicité par contact de l'huile essentielle du pistachier lentisque.....	168
II.12.1.2. Evaluation de la toxicité par contact des extraits des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	171
II.12.1.3. Activité insecticide de l'huile fixe des fruits de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	179
II.12.2. Evaluation de l'activité insecticide par inhalation sur <i>Tribolium castaneum</i> .....	181
II.12.2.1. Evaluation de la toxicité par inhalation de l'huile essentielle des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	181
II.12.2.2. Evaluation de la toxicité par inhalation de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.)... ..	184
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>186</b>

## **Références bibliographiques**

**Annexe**

**Publications**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association française de **n**ormalisation.

**ATCC**: American **T**ype **C**ulture **C**ollection.

**BHA**: **B**utyl-**h**ydroxy-**a**nisol.

**BHT**: **B**utyl-**h**ydroxy-**t**oluene.

**CG/SM** : Chromatographie en **p**hase gazeuse couplée à la spectrométrie de **m**asse.

**CMB** : Concentration **M**inimale **B**actéricide.

**CMI** : Concentration **M**inimale **I**nhibitrice.

**CPG** : Chromatographie en **p**hase **g**azeuse.

**d**: dilution

**DO** : **D**ensité **o**ptique.

**DPPH** : 2,2-**d**iphenyl-1-**p**icryl**h**ydrazyl

**EORs**: Les espèces oxygénées réaction.

**g** : gramme

**Gr.** : **G**rossissement

**h** : **h**eur.

**HE** : **H**uile **e**ssentielle

**IC<sub>50</sub>** : Concentration **i**nhibitrice de **50%** des radicaux

**IK**: Indice de **K**ovats

**MH** : Muller **H**inton

**min** : minute.

**ppm** : partie **p**ar **m**illion

**Rdt HE** : **R**endement en **h**uile **e**ssentielle

**SAB** : Sabouraud

**SM** : Spectrometrie de **m**asse

**sp** : spiece.

**T** : température.

**TBA** : Acide thiobarbiturique.

**TBHP**: Tri-**h**ydroxy-**b**utyro-**p**hénone.

**TBHQ** : Ter-**B**utyl-**h**ydroxy-**q**uinone.

**TSA** : Trytic Soy **A**gar

**V** : volume.

## Liste des figures

<b>Figure n°1:</b> L'Arbuste de <i>P.lentiscus</i> (L.) ( <b>Belfadel, 2009</b> ).....	5
<b>Figure n°2 :</b> Fleurs [A], Fruits rouges [B], noirs [C] et mastic [D] de <i>P. lentiscus</i> (L.) ( <b>Ben Douissa, 2004</b> ).....	5
<b>Figure n° 3 :</b> Aire de répartition du genre <i>Pistacia</i> ( <b>Belfadel,2009</b> ) .....	6
<b>Figure n°4:</b> Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie de l'acide mévalonique.....	12
<b>Figure n°5:</b> Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie du méthylérythritol phosphate.....	13
<b>Figure n°6:</b> Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.....	27
<b>Figure n °7 :</b> Représentation des bulles de cavitation sous l'effet des ultrasons ( <b>Mason et Paniwnyk, 2000</b> ).....	30
<b>Figure n°8:</b> Destruction de la membrane cellulaire par l'implosion de bulles de cavitation ( <b>Walker, 1978</b> ).....	30
<b>Figure n°9 :</b> Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO ( <b>Halliwell, 2006</b> ).....	38
<b>Figure n°10:</b> Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne ( <b>Burt, 2004</b> ).....	47
<b>Figure n°11:</b> Schéma du principe de la mise en œuvre de l'antibiogramme.....	50
<b>Figure n°12 :</b> (A) : Adulte ;( B) : Vue dorsale de la larve et (C) : Nymphe de <i>Tribolium castaneum</i> .....	55
<b>Figure n° 13:</b> La carte géographique de la région de Bouira (Maala).....	63
<b>Figure n° 14 :</b> Forme libre et réduite du DPPH ( <b>Brand-Williams et al ., 1995</b> ).....	81
<b>Figure n°15 :</b> Formation et piégeage du radical ABTS <sup>·+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>+</sup> .....	83
<b>Figure n °16:</b> Taux d'humidité (H%) et de matière sèche (MS%) des branches (B), feuilles (F), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de <i>P. lentiscus</i> (L.) fraîchement prélevés (A) et séchés (B).....	91
<b>Figure n° 17 :</b> Coupe transversale des branches (A), feuilles (B), fruits rouges (C) et fruits noirs (D) de <i>P. lentiscus</i> (L) montrant la présence de canaux sécréteurs (CS) des huiles essentielles en microscope optique (Gr.10x 40). (1) : Cuticule ;(2) : Epiderme ;(3) : Parenchyme (4): Sclérenchyme. ....	94
<b>Figure n °18 :</b> Variation des valeurs prédites en fonction des valeurs actuelles du rendement de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches (A), fruits rouges (B), fruits noirs (C) de <i>P. lentiscus</i> (L.) par l'hydrodistillation assistée par ultrasons.....	101

<b>Figure n °19:</b> Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons. ....	107
<b>Figure n °20 :</b> Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits rouges de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.....	108
<b>Figure n°21 :</b> Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.....	109
<b>Figure n°22:</b> Principales familles chimiques rencontrées dans l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) de la région de Bouira .....	116
<b>Figure n°23:</b> Rendements d'extraction des différentes parties de <i>P.lentiscus</i> (L.).....	119
<b>Figure n°24:</b> Activité de piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle des feuilles/branches (FB) , fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de <i>P. lentiscus</i> (L.) et le BHT et Valeurs de l'IC <sub>50</sub> du test de DPPH de l'huile essentielle des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT (B).....	133
<b>Figure n°25:</b> Activité de piégeage du radical DPPH par les extraits méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) des branches, feuilles , fruits rouges , fruits noirs et hexanique (E) des branches et des feuilles de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT .....	136
<b>Figure n°26:</b> Activité de piégeage du radical DPPH par l'huile fixe des fruits rouges, fruits de <i>P.lentiscus</i> (L.) et du BHT.....	139
<b>Figure n°27 :</b> Activité de piégeage du radical ABTS par l'huile essentielle des feuilles/branches , fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) et le BHT (A) et valeurs d'IC <sub>50</sub> du test d'ABTS de l'huile essentielle de différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT(B).....	141
<b>Figure n°28:</b> Activité de piégeage du radical ABTS par les extraits méthanoïque (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D), des branches , feuilles , fruits rouges , fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT et par l'extrait hexanique (E) des branches, des feuilles de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT.....	143
<b>Figure n°29 :</b> Activité de piégeage du radical ABTS par l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT.....	146
<b>Figure n°30 :</b> Pouvoir réducteur de l'huile essentielle des feuilles /branches, fruits rouges , fruits noirs de <i>P.lentiscus</i> (L.) et du BHT (A) et valeurs d'IC <sub>50</sub> du test de pouvoir réducteur de l'huile essentielle des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.) (B).....	147

<b>Figure n°31 :</b> Pouvoir réducteur des extraits méthanoïque (A), éthanolique(B), aqueux (C), acétonique (D) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT et de l'extrait hexanique des branches, feuilles de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT (E).....	150
<b>Figure n°32:</b> Pouvoir réducteur de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) et du BHT .....	152
<b>Figure n°33:</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> en fonction des doses pour l'huile essentielle des feuilles/branches (A), fruits rouges (B) et fruits noirs (C) de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	169
<b>Figure n°34:</b> Les doses létales (DL30, DL50 et DL90) de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P.lentiscus</i> (L.). .....	170
<b>Figure n°35 :</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> dans le temps en fonction des doses d'extrait méthanolique des branches (A), feuilles (B), fruits rouges (C) et fruits noirs (D) de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	171
<b>Figure n°36 :</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> dans le temps en fonction des doses pour l'extrait éthanolique des branches A, feuilles B, fruits rouges C, fruits noirs (D) de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	172
<b>Figure n°37 :</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> dans le temps en fonction des doses pour l'extrait aqueux des branches (A), feuilles (B), fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.). .....	173
<b>Figure n°38:</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> en fonction des doses pour l'extrait acétonique des branches (A), feuilles (B), fruits rouges (C) et fruits noirs (D) de <i>P. lentiscus</i> (L.). .....	174
<b>Figure n°39:</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> en fonction des doses pour l'extrait hexanique des branches (A) et des feuilles (B) de <i>P.lentiscus</i> (L.). .....	175
<b>Figure n°40:</b> Doses létales (DL <sub>30</sub> , DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> ) de l'extrait méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) et hexanique E des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	177
<b>Figure n°41:</b> Evolution de la mortalité de <i>T. castaneum</i> en fonction des doses d'huile fixe des fruits rouges (A) et de fruits noirs (B) de <i>P. lentiscus</i> (L.). .....	180
<b>Figure n°42:</b> Doses létales (DL <sub>30</sub> , DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> ) de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	180

**Figure n°43 :** Evolution des mortalités de *Tribolium castaneum* en fonction de la durée de traitement (A) et TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> (B) de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) lors du test d'inhalation.....182

**Figure n°44 :** Evolution des mortalités par inhalation en fonction de la durée de traitement (A) et TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> (B) de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) lors du test d'inhalation.....184

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°1:</b> Souches utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne .....	64
<b>Tableau n°2:</b> Niveaux des différentes variables indépendantes du processus d'hydrodistillation assistée par ultrasons des feuilles/ les branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) sous la forme codée et non codée. ....	69
<b>Tableau n°3 :</b> Résultats des tests phytochimique réalisés sur les différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	93
<b>Tableau n°4 :</b> Conditions expérimentales et valeurs du rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) prédits et expérimentales obtenue par le Plan Box Benken. ....	96
<b>Tableau n°5 :</b> Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR)et fruits noirs (FN) de <i>P. lentiscus</i> (L.) à 30, 60 et 90min.....	103
<b>Tableau n°6 :</b> Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR)et fruits noirs (FN) de <i>P. lentiscus</i> (L.) à 20,40 et 60 W.....	104
<b>Tableau n°7 :</b> Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de <i>P. lentiscus</i> (L.) avec un ratio MV/Eau de 1/4, 1/8 et 1/12.....	105
<b>Tableau n°8 :</b> Rendement d'extraction en huiles essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) obtenu par " hydrodistillation " standard et par " EAU ".....	110
<b>Tableau n°9:</b> Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielles de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	111
<b>Tableau n°10:</b> Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	112
<b>Tableau n°11 :</b> Composition chimique en (%) de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) de la région de Bouira.....	115
<b>Tableau n°12 :</b> Caractéristiques des extraits des différents organes de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	118
<b>Tableau n°13 :</b> Caractéristiques organoleptiques de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	120
<b>Tableau n° 14 :</b> Indices physico-chimiques de l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) .....	122
<b>Tableau n°15 :</b> Composition en acides gras (%) de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) par CPG.....	124

<b>Tableau n°16</b> : Teneur en phosphatides et en insaponifiables de l'huile fixe extraite des fruits rouges et noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) après extraction par l'hexane.....	127
<b>Tableau n°17</b> : Teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes de l'huile fixe extraite des fruits rouges et des fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	128
<b>Tableau n° 18</b> : Teneur en polyphénols totaux (TPT) des extraits des différentes parties de <i>P. lentiscus</i> (L.), exprimé en mg EAG/g d'extrait.....	129
<b>Tableau n°19</b> . Teneur en flavonoïdes des différents extraits de <i>P. lentiscus</i> (L.), exprimé mg EQ/g d'extrait.....	131
<b>Tableau n°20</b> : Valeurs de l'IC <sub>50</sub> des différents extraits et du BHT dans le test du DPPH.....	137
<b>Tableau n°21</b> : Valeurs d'IC <sub>50</sub> dans le test d'ABTS des extraits étudiés et du BHT.....	144
<b>Tableau n°22</b> : Valeurs d'IC <sub>50</sub> du test du pouvoir réducteur des différents extraits testés et du BHT.....	151
<b>Tableau n °23</b> : Sensibilité des souches étudiées vis-à-vis de l'huile essentielles des feuilles /branches, des fruits rouges et des fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	154
<b>Tableau n °24</b> : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des extraits de <i>P. lentiscus</i> (L.)..	157
<b>Tableau n°25</b> : Evaluation des CMI des huiles essentielles des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	160
<b>Tableau n°26</b> : Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) des HE des feuilles/branches, fruits noirs et fruits rouges de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	161
<b>Tableau n° 27</b> : Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits étudiés.....	163
<b>Tableau n°28</b> : Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles de <i>P. lentiscus</i> (L.).....	164
<b>Tableau n° 29</b> : Rapports CMB/CMI des huiles essentielles étudiés.....	164
<b>Tableau n°30</b> : Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des extraits étudiés.....	167
<b>Tableau n °31</b> : Rapports CMB/CMI des extraits étudiés.....	168
<b>Tableaux n° 32</b> : Valeurs des DL <sub>30</sub> , DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> ) des extraits des branches, feuilles ,fruits rouges et fruits noirs de <i>P. lentiscus</i> (L.) dans le test de l'activité insecticide par contact.....	178

## Liste des annexes

### *Les tableaux*

**Tableau n °1:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.).

**Tableau n °2:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des fruits rouges de *P.lentiscus* (L.).

**Tableau n ° 3:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.).

### *Les figures*

**Figure n°1 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique

**Figure n°2 :** Droite d'étalonnage de la quercétine.

**Figure n° 3 :** Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des feuilles/branches de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

**Figure n°4 :** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des feuilles/branches de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

**Figure n°5 :** Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des fruits rouges de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

**Figure n°6:** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) de Bouira.

**Figure n°7:** Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) de Bouira.

**Figure n°8:** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)de Bouira.

**Figure n °9 :** Chromatogramme CPG de l'huile fixe des fruits rouges de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

**Figure n °10 :** Chromatogramme CPG de l'huile fixe des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

**Figure n °11:** Zones d'inhibition de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouge et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*.

**Figure n°12:** Zones d'inhibition des extraits méthanolique, des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*.

**Figure°13:** Zones d'inhibition des extraits ethanologique des branches, feuilles ,fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.

**Figure°14 :** Zones d'inhibition des extraits aqueux des branches, feuilles ,fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureu* ,*C. albicans*.

**Figure °15:** Zones d'inhibition des extraits acetonique des branches, feuilles ,fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.

**Figure°16 :** Zones d'inhibition des extraits avec l'hexane des branches, feuilles ,fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.

**Figure n °17:** Illustration de la CMI de l'huile essentielle des feuilles /branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°18:** Illustration de la CMI de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans* .

**Figure n°19:** Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches bactérienne.

**Figure n°20:** Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique des branches, feuilles , fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°21:** Illustration de la CMI de l'extrait éthanologique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches bactérienne.

**Figure n°22:** Illustration de la CMI de l'extrait éthanologique des branches,de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°23:** Illustration de la CMI de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°24:** Illustration de la CMI de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis *Candida albicans*.

**Figure n°25:** Illustration de la CMI de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°26:** Illustration de la CMI de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°27:** Illustration de la CMI de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°28:** Illustration de la CMI de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°29:** Illustration de la CMB de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°30:** Illustration de la CMB de l'huile essentielle des fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°31:** Illustration de la CMB de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°32:** Illustration de la CMB de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°33:** Illustration de la CMB de l'extrait éthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°34:** Illustration de la CMB de l'extrait éthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n° 35:** Illustration de la CMB de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des *Candida albicans* souches bacteriennes testées.

**Figure n°36:** Illustration de la CMB de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°37:** Illustration de la CMB de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches microbiennes testées.

**Figure n°38:** Illustration de la CMB de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

**Figure n°39:** Illustration de la CMB de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.

**Figure n°40:** Illustration de la CMB de l'extrait hexanique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*

# **Introduction générale**

## Introduction générale

L'utilisation des plantes aromatiques par l'homme est une pratique antique (**Majinda et al., 2001**). Leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de composés naturels bioactifs accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Boudjouref, 2011**). De nos jours, de très nombreuses plantes sont utilisées comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles.

Actuellement, plusieurs questions concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire sont soulevées. En effet, la peroxydation des lipides au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à la perte de la qualité des aliments. Aussi, les industries alimentaires utilisent des antioxydants de synthèse pour retarder l'oxydation des lipides. Ces antioxydants de synthèse sont responsables de nombreux effets indésirables. De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes (**Mau et al., 2004**). Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les scientifiques à chercher dans le monde végétal des molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (**Boudjouref, 2011**).

Les métabolites secondaires doués d'activités biologiques tels que les polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes etc ont fait l'objet de nombreuses études (**Bousselessela et al., 2014 ; Bitis et al., 2017 ; YCF Teles et al., 2018**).

Les céréales et les légumineuses constituent la principale source de protéines dans de nombreux pays en voie de développement et les pertes causées lors de leur stockage sont estimées à 100 millions de tonnes dont 13 millions sont provoquées par les insectes ravageurs.

Les insectes des denrées stockées dont *Tribolium castaneum* de la famille des Bostrichidae introduit accidentellement en Afrique (**Ngamo et Hance, 2007**) représentent une partie très importante des ravageurs de denrées stockées (**Syed Shayfur et al., 2007**).

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation d'insecticides chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles. Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces insecticides a provoqué une contamination de la chaîne alimentaire et une éradication des espèces non cible

telles que la faune auxiliaire (Soejarto et al., 1989). De plus l'usage très répandu de ces pesticides a entraîné l'apparition de formes de résistances chez les insectes traités (Leonard et Ngamo, 2004). Ces dangers ont conduit l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) à interdire l'usage de certains insecticides chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche. Toutes ces raisons militent en faveur de la recherche de méthodes alternatives de lutte en particulier l'utilisation d'extraits de plantes ayant des propriétés insecticides et/ou insectifuges, qui soient efficaces, faciles à adopter pour les producteurs du tiers monde. Il est donc nécessaire de poursuivre la recherche des molécules naturelles actives, non polluantes et qui s'inscrit dans une lutte moins nocive et plus raisonnée. En effet, des plantes telles que *Hyptis spicigera*, *Cassia nigricans*; *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper nigrum* ont été longtemps utilisées par les paysans pour protéger les produits récoltés (Jacobson, 1989, Keita et al., 2000 ; Isman, 2000).

L'Algérie par sa situation géographique abrite une importante richesse en plantes aromatiques et médicinales. De nombreuses plantes sont utilisées dans les remèdes traditionnels. Parmi elles, se trouve *Pistacia lentiscus* L. connu en Algérie sous le nom de **Drou ou Darw**, communément appelé arbre de mastic ou lentisque. C'est une plante originaire du bassin méditerranéen appartenant à la famille des "Anacardiaceae". Cette plante possède des propriétés dans le traitement de l'athérosclérose, de l'arthrite, de l'asthme et de la goutte. Sa résine et son huile essentielle sont utiles pour soigner l'ulcère gastroduodéal et les atteintes fongiques et bactériennes. Elle est décongestionnante, anti-inflammatoire, antiseptique, et antispasmodique (Chaib, 2015). La partie aérienne est traditionnellement utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques. Les feuilles sont pourvues d'activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato protective, expectorante et stimulante. Elles sont également utilisées dans le traitement de l'eczéma, des infections buccales, des diarrhées, des lithiases rénales, de la jaunisse, des maux de tête, de l'asthme et des problèmes respiratoires (Mansour, 2014). Ses huiles essentielles sont aussi utilisées en pharmacie, en aromathérapie et dans la création des parfums.

L'utilisation de nouvelles techniques faisant appel aux critères de chimie verte et du développement durable pour l'extraction de substances bioactives, est devenue fort intéressante car elle répond aux enjeux scientifiques et aux problèmes économiques et environnementaux actuels (Li et al., 2013). La spécificité des problèmes d'isolement des composés bioactifs comme les huiles essentielles est liée à la nécessité de conserver leurs fonctions au cours de leur extraction. Des conditions d'extraction douces sont souvent

recommandées. Actuellement, il y a une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et une réduction de la pollution. L'extraction assistée par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Elle consomme nettement moins d'énergie que les méthodes classiques d'extraction. Elle est considérée comme une technique très bien adaptée pour l'extraction des antioxydants et est largement utilisée à l'échelle laboratoire pour extraire de tels composés à partir de sources naturelles variées (**Galvan D'Alessandro,2013**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont le l'objectif principal est d'extraire les molécules bioactives de différentes parties de *Pistacia lentiscus* (L.) de la région de Bouira, de déterminer la composition des huiles essentielles et la concentration des polyphénols totaux et des flavonoïdes, d'étudier leurs caractéristiques physicochimiques, leur composition chimique, et leurs activités antioxydante, antimicrobienne et insecticides.

Le présent travail comporte deux parties distinctes :

Une partie bibliographique dans laquelle nous réaliserons une synthèse des connaissances concernant *P. lentiscus* L., les substances bioactives (les huiles essentielles et les composés phénoliques) et leurs activités.

Une partie expérimentale qui est subdivisée en deux chapitres :

L'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail, l'autre est consacré à la présentation des résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Enfin, la conclusion générale met en évidence les principaux résultats obtenus et leur rôle pour la valorisation du patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales. Des perspectives de recherches ont aussi été dégagées.

# **Partie 1 : Etude bibliographique**

## I. Monographie de la plante

### I.1. Etude botanique de *Pistacia lentiscus* (L.)

Le genre *Pistacia* appartient à la famille des Anacardiacees ou Pistaciacees (**Delazar et al., 2004 ; Gausson et al., 1982**). Il comprend 11 espèces d'arbres et d'arbustes dioïques, dont la majorité sont connues pour leurs capacités à produire les oléorésines (**Onay et Jeffree, 2000 ; Brickell, 2004**). En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (**Quezel et Santa, 1962**).

*Pistacia lentiscus* L., pistachier lentisque, ou lentisque est appelé aussi arbre au mastic car sa sève est utilisée pour la réalisation d'une gomme à odeur prononcée. Le pistachier lentisque peut s'adapter à des conditions pédoclimatiques difficiles, comme la sécheresse ou un sol calcaire (**Correia et Catarino, 1994**) ; il a la capacité de régénérer après un incendie de forêt ou une déforestation (**Ladd et al., 2005**).

#### I.1.1. Taxonomie et systématique de la plante

La classification admise actuellement est celle de **Quezel et Santa (1963) et Dupont et Guignard (2007)**.

Position systématique

- ✓ Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes
- ✓ Sous embranchement : Angiospermes
- ✓ Classe : Eudicots
- ✓ Sous classe : Eurosidiées II
- ✓ Ordre : Sapindales (Rutales)
- ✓ Famille : Anacardiacees- Térébinthacées
- ✓ Genre : *Pistacia*
- ✓ Espèce : *Pistacia lentiscus* L
- ✓ Noms vernaculaires : Derou, darw.

#### I.1.2. Description morphologique

*Pistacia lentiscus* (L.) est un arbrisseau de 1 à 3 mètres (**Fig. 1**), à forte odeur résineuse (**Coste, 1937 ; Rodríguez-Pérez et al., 2013**). Il se distingue des autres pistachiers par des feuilles composées paripennées, qui se terminent par une paire de folioles, tandis que celles des autres pistachiers se terminent par une seule foliole. Les feuilles sont caduques, vertes en hiver.

L'**Ecorce** est rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand l'écorce est incisée, la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.



**Figure n°1** : Arbuste de *P. lentiscus* (L.) (Belfadel, 2009).

**Les branches** sont tortueuses et pressées et forment une masse serrée (**Fig.1**).

**Les feuilles** sont persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (**Fig.2A**).

**Les fleurs** unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe. Elles sont très aromatiques et forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Les fleurs femelles sont vertes jaunâtre et les fleurs mâles sont rouge foncé (**Fig. 2A**).

**Le fruit** est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme. Le fruit est d'abord rouge devient brunâtre à sa maturité en automne (**Fig. 2B et C**).

**Le mastic** : L'incision du tronc de cet arbuste fait écouler un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (**Fig. 2D**).

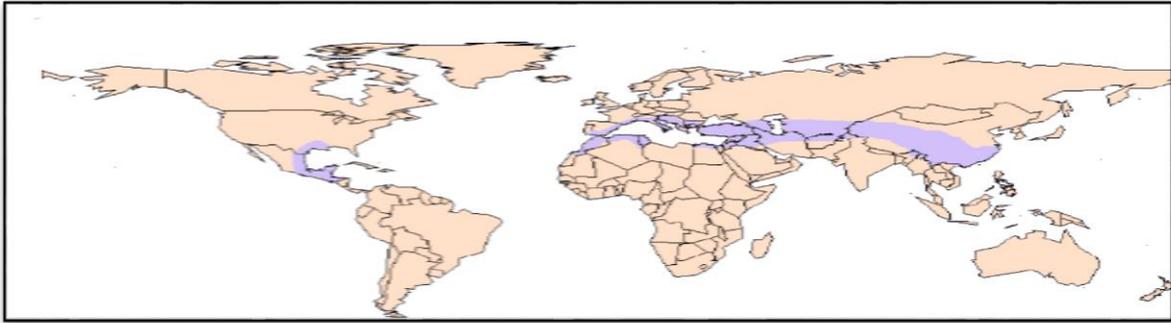


**Figure n°2** : Fleurs [A], Fruits rouges [B], noirs [C] et mastic [D] de *P. lentiscus* (L.) (Ben Douissa, 2004).

### I.1.3. Répartition géographique de *Pistacia lentiscus* (L.)

*Pistacia lentiscus* (L.) est un arbrisseau dioïque thermophile qui pousse, à l'état sauvage dans les maquis et les garrigues, en particulier les maquis des régions arides d'Asie et les forêts

du bassin méditerranéen (**Quezel et Santa, 1963**) jusqu'aux Canaries (**Bellakhdar, 2003**) et dans tout type de sols en préférant les terrains siliceux pauvres en nutriments (potassium et phosphore) (**Arab et al., 2014; Baratto et al., 2003**). Il est retrouvé dans l'Algérie subhumide et semi-aride, plus précisément dans le bassin de la Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (**Belhadj, 2000**) (**Fig. 3**).



**Figure n°3** : Aire de répartition du genre *Pistacia* (**Belfadel, 2009**).

## **I.2. Etude chimique de *Pistacia lentiscus* (L.)**

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différents organes de *P. lentiscus* (L.) ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques afin d'identifier les principes actifs. Ces études ont été consacrées essentiellement au mastic et ont mises en évidence la présence de flavonoïdes, d'huiles essentielles, et de triterpenoïdes (**Marner et al., 1991; Papageorgiou et al., 1997**).

### **I.2.1. Fruits**

**Les composés phénoliques** identifiés dans le fruit de *P. lentiscus* (L.) sont constitués essentiellement d'acides phénoliques libres (les acides p-hydroxybenzoïque, gallique, cinnamylidène acétique) et estérifiés (acides quinique, 4-O-glucoside p-coumarique, 5-galloylquinique, l'isomère de acide caffeoylquinique et 3,4,5 O-acide trigalloylquinique), de flavonoïdes (quercétine, taxifoline, quercétine-3-O-glucuronide et lutéoline 6,8-di-C-hexoside), un secoiridoïde (oléoside) et d'un diterpène phénolique (épirosmanol) (**Trabelsi et al., 2015**).

**L'huile végétale (fixe)** représente 38,8 % du poids des fruits et contient 53 % d'acide gras monoinsaturé. Le principal acide gras est l'acide oléique (50 -72%), suivi des acides palmitique (23,2%) et linoléique (21,7%). Les autres acides gras retrouvés en faible quantités sont les acide palmitoléique (1.3%), stéarique (1.1%), linoléinique (0.8%), gadoléique (0.2%) et arachidique (trace). Quatre stérols ont été trouvés dans l'huile fixe, le  $\beta$ -sitostérol (90%), le camestérol, le cholestérol et le stigmastérol (**Trabelsi et al., 2011**).

**L'huile essentielle** représente 0,2% du poids des fruits. Les composés caractéristiques sont des monoterpènes ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\beta$ -myrcène, limonène, et  $\alpha$ -phéllandrène), quelques

sesquiterpènes, des esters aliphatiques, des cétones, et des composés phénoliques (thymol et carvacrol) (**Grant et al., 1990; Congiu et al., 2002**).

Les protéines représentent 5% du poids des fruits (**Hamad et al., 2011**). La composition minérale de ces fruits montre que la teneur en potassium est élevée (2,67%), alors que celles du sodium, calcium et phosphore sont plus faibles.

### **I.2.2. Feuilles**

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sont caractérisées par la présence de glycosides de flavonols comme les quercétine, myricétine, lutéoline ainsi que l'isoflavone génistéine (**Romani et al., 2002 ; Stocker et al., 2004; Vaya et Mahmood, 2006**). Elles contiennent aussi 6 à 7% de gallotannins de faible poids moléculaire, et des dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3,4,5-O-trigalloyl (**Romani et al., 2002**).

L'huile essentielle représente 0,14- 0,17% du poids des feuilles de *Pistacia lentiscus* (L.). Elle est composée essentiellement de monoterpènes  $\beta$ - Myrcène  $\alpha$ - pinène, terpinène-4, longifolène, limonène, et  $\beta$ -caryophellène (**Mecherara-Idjeri et al., 2008 ; Dob et al., 2006 ; Benyoussef et al., 2005 ; Castola et al., 2000**).

### **I.2.3. La résine**

La résine, également connue sous le nom de mastic (ou mastix), est une substance aromatique et résineuse qui suinte du tronc et des branches principales du lentisque. Elle est récoltée comme une épice dans le Sud de l'île grecque de Chios en mer Egée, où elle est également connue sous le nom "Tears Chios". Les analyses chimiques ont révélé la présence d'un polymère de  $\beta$  myrcène, le cis- 4-poly- $\beta$ - myrcène, une petite fraction d'huile essentielle (environ 2%), des triterpénoïdes sous forme de deux types de squelettes tétracyclique (euphane et dammarane) et pentacycliques (oleanane et lupane). Des triterpénoïdes bicycliques et tricycliques ont été également identifiés (**Belfadel, 2009**).

## **I.3.Utilisations traditionnelles**

*Pistacia lentiscus* L. qui est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité ; il occupe une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique de plusieurs régions méditerranéennes avec différentes utilisations (**Zitoini, 2016**).

Les feuilles, fruits, tiges et racines du pistachier lentisque ont été traditionnellement utilisées pour un large éventail d'objectifs. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et de l'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (**Palevitch et Yaniv, 2000**). Les feuilles sont utilisées dans le traitement de l'eczéma, des infections buccales, des diarrhées, de la jaunisse, des maux de tête, de l'asthme et des problèmes respiratoires (**Villar**

*et al.*, 1987 ; Ali Shtayeh *et al.*, 1998 ; Ali-Shtayeh *et al.*, 2000 ; Lev et Amar, 2002).

En Algérie, l'huile fixe extraite des fruits mûrs est employée en application locale externe sous forme d'onguent pour soigner les brûlures, les petites blessures, les érythèmes et les douleurs dorsales (Iserin, 2001 ; Baudoux, 2003 ; Grosjean, 2007). L'huile fixe est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac. Ces usages sont surtout répandus à l'Est du pays (région d'El-Milia, Skikda, Guelma).

#### **I.4.Effets thérapeutiques et activité biologique de *Pistacia lentiscus* (L.)**

Les extraits des feuilles de *P. lentiscus* ont une puissante activité antiradicalaire (Arab *et al.* 2014 ; Krimat *et al.*,2014) et antibactérienne (Benrokia et Aouar ., 2015 ; Bammou *et al.*,2015).

L'activité antibactérienne de l'huile extraite du mastic de *P. lentiscus* est très élevée contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Koutsoudaki *et al.*, 2005). Cette huile a aussi une activité antibactérienne sélective contre *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella melaninogenica* et une activité anti plaque sur les dents en inhibant la croissance bactérienne dans la salive (Sakagami *et al.*, 2009).

Les extraits des feuilles du pistachier lentisque *in vivo et in vitro*, révèlent une activité anti-inflammatoire (Giner-Larza *et al.*, 2001 ; Maxia *et al.*, 2001 ; Gardeli *et al.*, 2008 ; Remila *et al.*, 2015 ; Ait Idir et Bouyoucef, 2017), notamment de l'inflammation intestinale et de la goutte (Al-Said *et al.*, 1986).

L'huile essentielle et les différents extraits des feuilles de *P. lentiscus* ont indiqué un effet inhibiteur significatif sur la mutagénicité *in vitro* (Douissa *et al.*, 2005 ; Haydar *et al.*, 2005).

#### **I.5.Données toxicologiques de *Pistacia lentiscus* (L.)**

La gomme mastic provoque une toxicité aiguë, une irritation de la peau et une phototoxicité chez les animaux et les humains (Spott *et coll*, 1970 ; Keynan *et coll*, 1987 ; Keynan *et coll*, 1997 ; Ford *et coll*, 1992). Par contre, l'huile essentielles des feuilles de *P. lentiscus*, administrée par voie orale est dépourvue de toxicité aiguë chez les souris (Medjekane, 2017).

## **II. Les huiles essentielles et les composés phénoliques**

### **II.1. Les huiles essentielles**

#### **II.1.1. Aperçus historiques**

L'histoire des plantes aromatiques est souvent liée à celle de l'humanité. Depuis l'Egypte antique (environ quatre mille cinq cents ans avant Jésus Christ), l'homme utilise largement les

huiles balsamiques, les onguents parfumés, les résines aromatiques, les épices et les végétaux odoriférants lors des rites religieux, en magie, en thérapeutique, en alimentation ainsi que dans les pratiques de la vie courante. La distillation des huiles essentielles commence en Orient depuis des millénaires ; les premières bases de préparation des huiles essentielles ont été développées en Inde, en Perse et en Egypte (**Ntezurubanza, 2000**).

### **II.1.2. Définition**

Les huiles essentielles sont des substances de compositions complexes, huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes. Les huiles essentielles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Bruneton, 1999**).

La norme française **AFNOR NF T75006** définit l'huile essentielle comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation à sec ». Cette définition n'intègre cependant pas toutes les autres substances dont les propriétés et l'apparence semblent similaires, mais qui sont obtenues par des procédés différents.

### **II.1.3. Localisation et lieu de synthèse**

Seules 1% des espèces végétales élaborent des essences. Les Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apeaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae sont des familles qui se caractérisent par un grand nombre d'espèces accumulatrices d'huiles essentielles (**Mohammedi, 2006**).

Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles. On les trouve aussi bien dans les écorces (Cannelier), les racines (Vétiver), les rhizomes (Gingembre), les fruits (Anis, Fenouil, Badiane), le bois (Camphrier), les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus), les graines (Muscade) et les boutons floraux (clou de Girofle) et les sommités fleuries (Lavande et Menthe) (**Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem et al., 2001**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées telles que les poils glandulaires épidermiques (Labiaceae, Geraniaceae, et Rutaceae), les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices généralement disséminées au sein du tissu végétal (Myrtaceae, Auranthiaceae), les canaux sécréteurs (Ombelliferaeae Apiaceae ou Asteraceae). Ces structures sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (**Bruneton, 1999**).

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes.

#### II.1.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant à deux familles chimiques (terpènes et composés phénoliques) mais on y trouve également des constituants aliphatiques issus de la synthèse des acides gras et plus rarement d'autres composants d'origines diverses (dérivés soufrés, nitriles, thiocyanates...) (Nyegue, 2005).

##### II.1.4.1. Les Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène, de formule brute  $(C_5H_8)_n$ . Selon le nombre d'unités associées, on distingue les monoterpènes en  $(C_{10})$ , les sesquiterpènes en  $(C_{15})$ , les diterpènes en  $(C_{20})$ , les triterpènes en  $(C_{30})$ , les tétraterpènes en  $(C_{40})$  et les polyterpènes. Ces unités peuvent aussi se lier entre elles par des liaisons dites irrégulières de type artémésyl, santolinyl, lavandulyl et chrysanthémyle (Dale Poulter et al., 1997).

Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu de diterpènes (Finar, 1994). Les monoterpènes et sesquiterpènes sont sous forme acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques ; Ils sont issus de réarrangements complexes du squelette hydrocarboné, des réactions d'oxydation et de réduction, conduisant à la formation de molécules généralement intéressantes sur le plan olfactif et même biologique tels que des alcools, aldéhydes, cétones esters, éthers, peroxydes.

##### II.1.4.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ). Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole. Ils sont fréquemment rencontrés dans les H.Es d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic, du clou de girofle,.... Ces substances phénoliques se distinguent entre elles par :

- ✓ Le nombre et la position des groupements hydroxyle et méthoxy,
- ✓ La position de la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique,
- ✓ Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique (alcool, aldéhyde, cétone ou acide...).

##### II.1.4.3. Composés d'origines variées

En général, les composés d'origine variée de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions. A titre indicatif, l'heptane et la paraffine sont retrouvés dans l'essence

de camomille, des acides en C<sub>3</sub> et C<sub>10</sub>, des esters acycliques sont présents surtout dans les fruits (acétate de butyle dans la pomme et l'acétate d'isoamyle de la banane), des aldéhydes comme l'octanal et le décanal sont décelés dans le genre Citrus, des alcools comme le 1-octèn-3-ol a été mise en évidence dans l'essence de lavande.

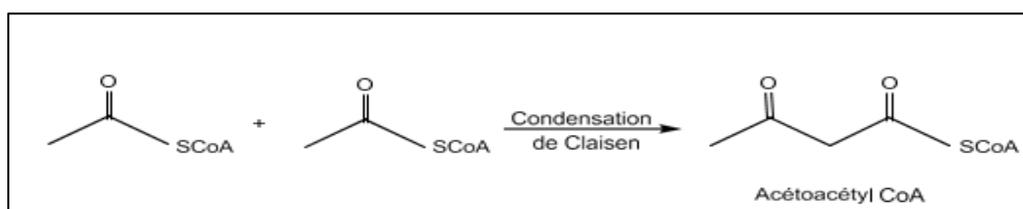
## II.1.5. Biosynthèse des constituants des huiles essentielles

### II.1.5.1. Biosynthèse des terpènes

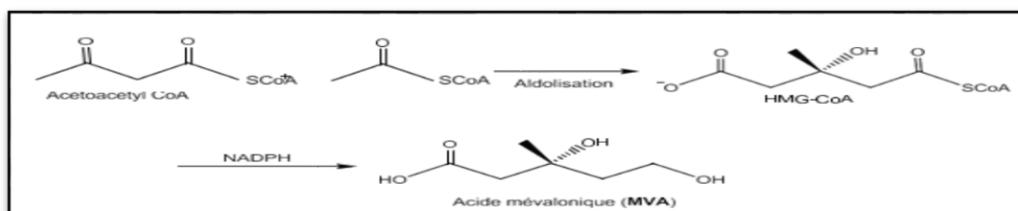
L'unité de base de la biosynthèse des terpènes est l'*isopentényl-diphosphate* **IPP** et son isomère *le diméthylallyl-diphosphate* **DMAPP**. Deux voies de biosynthèse conduisent à ces unités de base à 5 atomes de carbone (**Singh et al.,1990**).

La première est la voie **du mévalonate**. Son précurseur est l'acétyl coenzyme A (CH<sub>3</sub>COSCoA), produit de la glycolyse (catabolisme des sucres). Cette voie a lieu dans le cytosol au niveau de RE et débute par la condensation de trois unités d'acétylCoA, passe par un composé en C<sub>6</sub> (le mévalonate) et conduit à **IPP**.

Pour cette voie principale, la première étape est une condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétylCoA pour conduire à l'acétoacétylCoA.

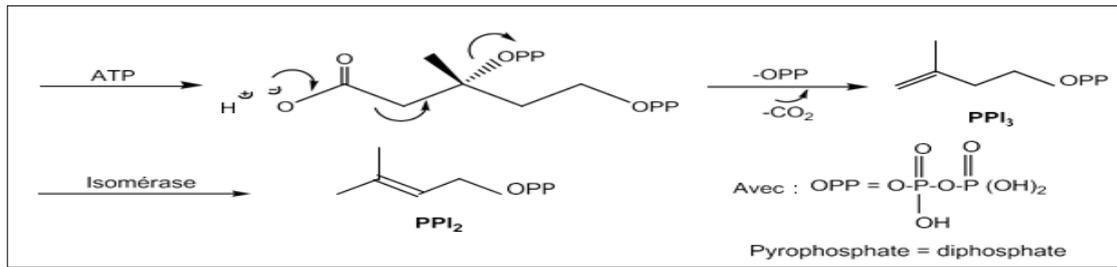


La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une 3<sup>ème</sup> molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA conduisant à la formation du HMGCoA ; cette étape est catalysée par une HMGCoA synthase. Après hydrolyse et réduction par le NADPH (Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate) du HMGCoA par une HMGCoA réductase, l'acide mévalonique se forme.



La déshydratation et la décarboxylation de l'acide mévalonique (**MVA**) par une élimination concertée après sa pyrophosphorylation par l'ATP (Adénosine triphosphate), permettent d'aboutir aux deux intermédiaires en C<sub>5</sub>, bio-précurseurs des terpènes : *le pyrophosphate d'isopentén-3-yle* (**IPP**) en équilibre, par simple transfert de proton, avec *le pyrophosphate de diméthylallyle* (**DMAPP**). Les deux intermédiaires **IPP** et **DMAPP** se condensent pour générer le géranyl pyrophosphate (**GPP**) point de départ de tous les monoterpénoïdes.

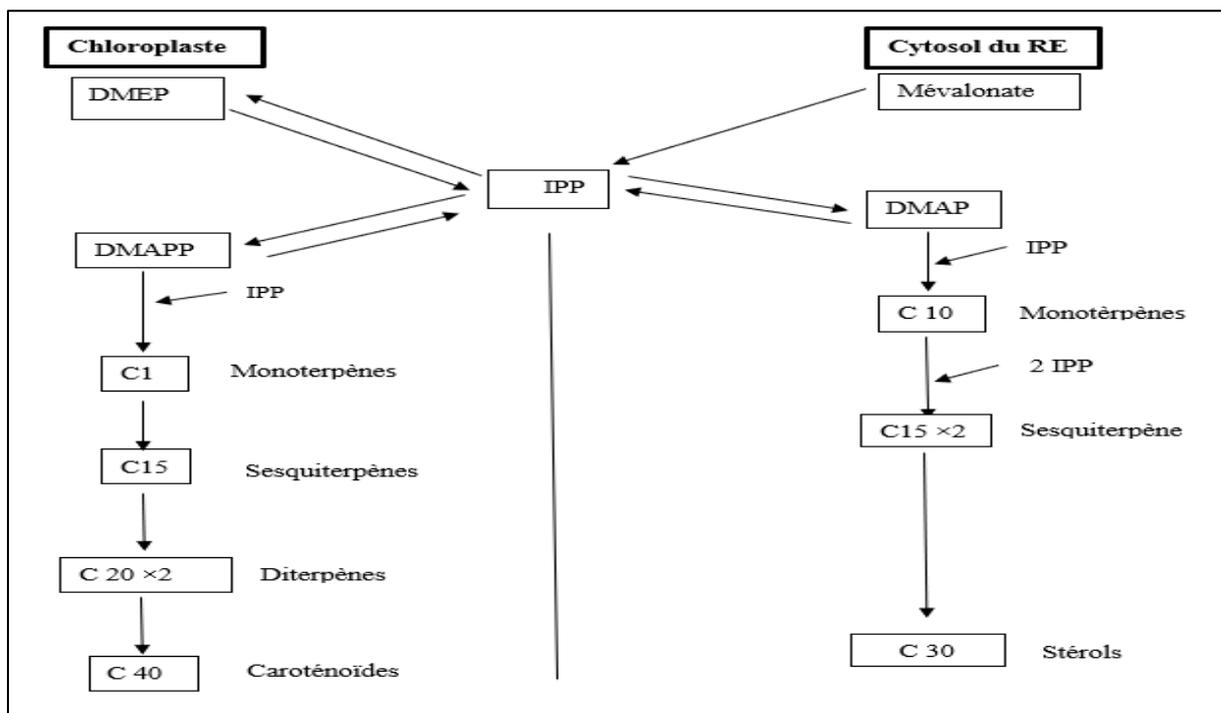
Cette étape de condensation tête à queue est catalysée par une GPP synthase.



La condensation tête à queue d'une autre unité de **IPP** sur le géranyl pyrophosphate par la FPP synthase forme le pyrophosphate de farnésyle, précurseur de tous les sesquiterpènes.

Le squalène résulte de la condensation tête à tête de deux FPP. Cette réaction est catalysée par une squalène synthase.

Cette **voie du mévalonate** a lieu au niveau de RE pour la synthèse des sesquiterpènes, triterpènes dont les stéroïdes.



**Figure n °4** : Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie de l'acide mévalonique

La seconde voie, voie du méthylérythritol phosphate (**MEP**) ou encore nommée **voie non mévalonique**, est spécifique aux végétaux et a lieu au niveau des plastes. Elle commence par la condensation d'une unité pyruvate (C<sub>3</sub>) avec une unité de glycéraldéhyde 3- phosphate (C<sub>3</sub>) et conduit au méthylérythritol phosphate, un composé intermédiaire en C<sub>5</sub>.

Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de **IPP**. Cette voie n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 90. La voie chloroplastique sert à la synthèse des terpènes chloroplastiques, mono, di et tétraterpènes dont les caroténoïdes.

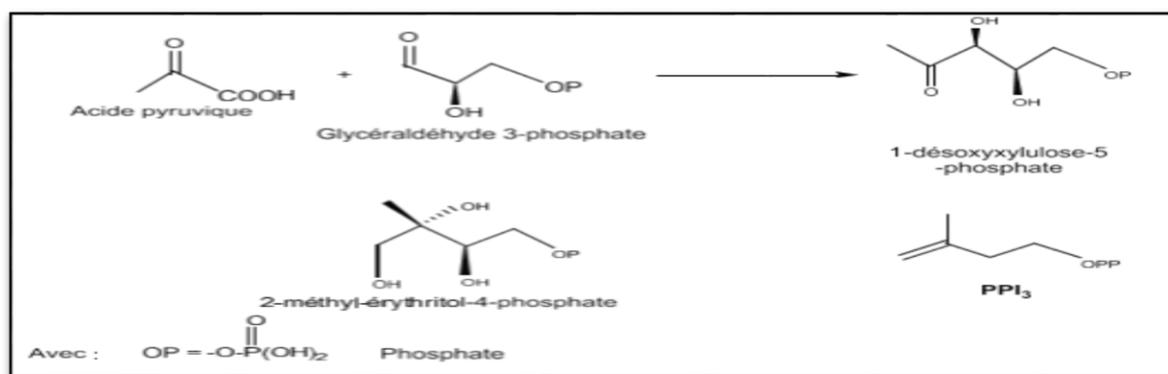


Figure n° 5 : Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie du méthylérythritol phosphate.

### II.1.6. Composition quantitative et qualitative des Huiles Essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques au génome de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de l'environnement. La composition chimique et le rendement dépendent aussi des conditions de récoltes, de séchage et d'extraction.

#### II.1.6.1. Facteurs intrinsèques

L'influence du stade végétatif (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Stefanini *et al.*, 2006), de l'organe de la plante (Maffei et Sacco, 1987; Barry, 2001; Chowdhury *et al.*, 2009), des hybridations, des facteurs de mutation, de la polyploïdie (Aprotosoie *et al.*, 2010) et du polymorphisme chimique «chimiotypes ou formes physiologiques» (Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

#### II.1.6.2. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante (Bruneton, 1999; Mohammad *et al.*, 2009; Olle et Bender, 2010). Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles lorsqu'il s'agit de plantes cultivées (Lahlou, 2004; Benini, 2007).

### II.1.7. Rôle des huiles essentielles dans la plante

Les plantes possèdent des métabolites dits secondaires par opposition aux métabolites primaires (les protéines, les glucides et les lipides) qui sont retrouvés dans tous les organismes vivants.

Ces composés interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent et l'environnement. Ils sont des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs et de l'adaptation des plantes à de nouvelles conditions de vie.

### II.1.8. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques

Les essences et les huiles essentielles ont des propriétés physiques communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique (**Franhomme et Péroël, 2001**). À température ambiante, les huiles essentielles sont **liquides**. Il existe cependant des exceptions. Par exemple, l'huile essentielle est visqueuse chez la myrrhe (*Commiphoramyrrrha* (T. Nees) Engl.), pâteuse pour le bois de gaïac (*Bulnesia sarmienti* Lorentz ex. Griseb.), solide pour le cèdre de Virginie (*Juniperus virginiana* L.) ou parfois la rose (*Rosa x damascena* Mill.) ou encore être composée d'un mélange solide-liquide lorsqu'elle est extraite de la badiane (*Illicium verum* Hook. F.) (**Fernandez et Chemat, 2012**).

Les huiles essentielles sont **volatiles**. C'est ce qui les rend entraînables à la vapeur et particulièrement odorantes. Ce caractère les différencie aussi des huiles végétales grasses ou dites « fixes ». Si ces dernières laissent des taches indélébiles, la trace laissée par une huile essentielle tendra à disparaître plus ou moins rapidement. La volatilité est liée à la composition chimique et à la taille de la molécule. Les monoterpènes sont par exemple beaucoup plus volatiles que les sesquiterpènes (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012**).

Les essences sont **lipophiles** et donc très peu solubles dans l'eau. Certains composants de par leur richesse en groupements hydrophile (cétone, alcool...) le sont cependant, comme par exemple la verbénone du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) ou le lavandulol que l'on retrouve dans l'huile essentielle de la lavande vraie (*Lavandula angustifolia* Mill.). Certains composants sont même très hydrosolubles et vont favoriser l'apparition d'émulsion dans le produit de distillation lors de l'extraction. C'est, entre autres, le cas de l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* J. Presl).

Leur solubilité est totale dans les huiles grasses qui représentent leurs meilleurs solvants, elle est très grande dans les alcools à titres élevés et dans les solvants organiques (**Franhomme et Péroël, 2001**).

**La couleur** des huiles essentielles est très variable. Cela comprend l'ultra-violet (UV) du zeste de mandarine (*Citrus reticulata* Blanco), le bleu (lié à la présence de chamazulène) des sommités de tanaïsie annuelle (*Tanacetum annuum* L.), le vert émeraude (azulène) de l'inule odorante ou de l'immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), le vert franc du nard de l'Himalaya (*Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.), le vert pâle du zeste de bergamote

(*Citrus bergamia* Risso & Poitet), le rouge de certaines sarriettes (*Satureja sp.*) ou le jaune pâle de la sauge sclarée (*Salvia sclarea* L.).

La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent au court de leur vieillissement (oxydation).

**La densité** ou densité relative d'une huile essentielle est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique de l'eau distillée, à 20°C. Cette grandeur sans dimension est mesurée selon la norme NF T 75-111 à l'aide d'un pycnomètre. La densité des huiles essentielles est très souvent inférieure à 1 (densité de l'eau) et varie en fonction de leur composition chimique. La valeur de 0,92 peut être considérée comme une moyenne. Elle en est parfois très proche comme celle du zeste de mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco: 0,9929), de santal blanc (*Santalum album* L.: 0,9741), ou d'écorce de cannellier (*Cinnamomum verum* J.Presl. :1,0027). Quelques huiles essentielles ont même une densité supérieure à l'eau comme par exemple l'huile essentielle de gaulthérie couchée (*Gaultheria procumbens* L.:1,1807) ou d'oignon (*Alliumcepa* L.:1,54 à 1,58) (**Franchomme et Péroël, 2001 ; Fernandez et Chemat, 2012**).

**L'indice de réfraction** reflète le changement de direction subi par un rayon lumineux passant d'un milieu optique à un autre (par exemple de l'air à l'huile essentielle), à 20°C. Il s'agit d'une grandeur sans unité, qui se mesure avec un réfractomètre d'après la norme NF T 75-112. Dans le cas des huiles essentielles, l'indice de réfraction est généralement élevé. On peut donner comme exemple l'huile essentielle d'écorce de cannellier (*Cinnamomum verum* J.Presl.) dont l'indice de réfraction est compris entre 1,573 et 1,591(**Franchomme et Péroël, 2001; Fernandez et Chemat, 2012**).

**Le pouvoir rotatoire**, caractéristique des molécules chirales, exprime la capacité qu'elles ont à dévier la lumière polarisée. La mesure, réalisée avec un polarimètre, se fait selon la norme NF T 75-113. Pour les valeurs positives, la substance étudiée sera dite dextrogyre et lévogyre pour les valeurs négatives. Les huiles essentielles sont actives sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent. On mesure ainsi des valeurs de +105°chez l'oranger (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) et de -17,75° chez la menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) (**Fernandez et Chemat, 2012 ; Faucon, 2012**).

### II.1.9. Conditions de récolte et d'extraction

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (**Khajeh et al., 2004 ; Sefidkon et al., 2007**). L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans

les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Silou, 2004 ; Lucchesi, 2005).

La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition chimique (Yayi et al., 2004). Les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001) influent aussi sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que les conditions de stockage des matières premières avant distillation peuvent également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (Besombes, 2008).

### **II.1.10. Techniques d'extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles et les substances aromatiques sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1% pour les HE). Ainsi, les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou d'extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisantes.

#### **II.1.10.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des huiles essentielles**

Ces techniques d'extraction sont toutes basées sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

##### **II.1.10.1.1. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est généralement conduite à pression atmosphérique. La plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. L'appareil utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger.

##### **II.1.10.1.2. Entraînement à la vapeur**

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des plantes aromatiques. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière traverse la matière végétale de bas en haut, provoque l'éclatement des cellules et entraîne les molécules volatiles.

En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'HE et d'hydrolat (**Bruneton, 1999**). La phase aqueuse qui est composée par une faible proportion de composés aromatiques porte alors le nom d'eau florale. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

#### **II.1.10.1.3. Hydrodiffusion**

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (**Chenni, 2016**).

#### **II.1.10.1.4. Pression à froid**

C'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce des fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau (**Bruneton, 1999**).

#### **II.1.10.1.5. Extraction des substances aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet**

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés (**Marrouf et Tremblin, 2009**). Un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur.

#### **II.1.10.2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles**

Les techniques traditionnelles d'extraction ont certes démontré leur efficacité mais aussi leurs limites en termes de productivité, de rentabilité et de qualité des extraits. En effet, la perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction.

Pour pallier à ces inconvénients, de nouvelles techniques respectant le concept et les principes d'extraction verte se sont développées. Elles offrent ainsi de nombreux avantages

(Réduction du temps d'extraction sans altérer la composition des extraits, diminution de la consommation d'énergie, utilisation de petite quantité de solvant ou absence de solvant...) (Chenni, 2016).

#### **II.1.10.2.1. Extraction assistée par micro-ondes des HEs**

C'est une technique développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. La plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (Marrouf et Tremblin, 2009). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Cette technique permet de réduire le temps d'extraction, la dégradation thermique et d'économiser de l'énergie (Huie, 2002).

#### **II.1.10.2.2. Extraction au fluide supercritique**

Ce procédé permet d'augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, dont le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>. C'est un produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (Bruneton, 1999 ; Wichtl et Anton, 1999).

L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et le charge en composé à extraire ; il est ensuite détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait. L'extraction des huiles essentielles par le CO<sub>2</sub> supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Wichtl et Anton, 1999).

#### **II.1.10.2.3. Turbo hydro-distillation "THD"**

La turbo hydro-distillation ou THD est un procédé d'hydro-distillation accéléré en discontinu. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un alambic ; l'ensemble est porté continuellement à ébullition sous pression atmosphérique et agité avec un agitateur en acier inoxydable (Chenni, 2016). Cette technique représente une alternative aux hydro-distillations de longue durée ou en surpression.

#### **II.1.10.2.4. Extraction par détente instantanée contrôlée "DIC"**

Le procédé détente instantanée contrôlée (DIC) est une technique d'extraction- séparation directe basée sur la thermodynamique de l'instantanéité et des processus d'auto- vaporisation

couplée à l'évolution hydro-thermo-mécanique de nombreux polymères à usages alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Meullemiestre et al.,2015). Cette méthode permet d'extraire les composés volatils par évaporation pendant une courte durée sous haute température (180°C) et haute pression (10 bars) suivi d'une auto-vaporisation de structures végétales résultant de multi-cycles de chute de pression instantanée. Ce procédé sans solvant présente une amélioration significative dans l'efficacité ou la consommation d'énergie et un temps de chauffage très court dans chaque cycle DIC limitant la dégradation thermique. En outre, la DIC permet d'obtenir des huiles essentielles avec des rendements plus élevés et une qualité supérieure à celle des procédés classiques (Li et al., 2014).

#### **II.1.10.2.5. Hydrodistillation assistée par ultrasons**

Son principe consiste à immerger la matière végétale dans l'eau ou dans le solvant, et à la soumettre à l'action des ultrasons (Chemat, 2011).

Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées de 20 kHz à 10 MHz induisent des vibrations mécaniques agissant comme un piston dans la surface du milieu, et conduisent au phénomène de cavitation à travers une succession de phases d'expansion et de compression. L'implosion des bulles de cavitation générées donne lieu à des micro-jets qui détruisent les glandes sécrétrices des huiles essentielles et facilite le transfert de masse et la libération de l'huile essentielle. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement. De plus, l'extraction assistée par ultrasons fournit des huiles essentielles de très haute qualité avec moins de dégradation thermique. L'extraction par ultrasons peut être couplée ou associée avec d'autres techniques d'extraction telles que l'énergie des micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique, ou par des méthodes classiques telle que l'extraction au Soxhlet (Li et al.,2014 ; Meullemiestre et al.,2015).

#### **II.1.11. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles**

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993).

##### **II.1.11.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CG est une technique bien adaptée à l'analyse des HEs, compte tenu de la volatilité des constituants.

Elle permet de séparer les composés volatils d'un mélange complexe ainsi que l'analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (**Laverdière, 1999**).

C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide (CGS) ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide (CGL) ou chromatographie d'adsorption (**Audigie et al, 1995**).

Cette méthode ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CG et une technique d'identification spectroscopique, en général la spectrométrie de masse (CG-SM).

#### **II.1.11.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (**De Maack et Sablier, 1994**). Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (**Desjobert et al., 1997; Bruneton, 1999**). La GC et la GC/MS permettent, en plus de connaître très exactement la composition chimique, la recherche d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (**Baser and Buchbauer, 2010**).

#### **II.1.11.3. La chromatographie liquide à haute performance**

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans

l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (**Audigie et al., 1995**). Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse (**Bruneton, 1999**).

#### **II.1.11.4. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (**Platzer, 2002**).

#### **II.1.12. Toxicité des huiles essentielles**

Les huiles essentielles, à cause de leur richesse en composés actifs, doivent être utilisées avec une extrême prudence, car elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome. Certaines sont rapidement dangereuses (absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin) (**Bernadet, 2000**). D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (**Bremness, 19983**). Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Elles peuvent être allergisantes ou hypersensibilisantes, photosensibilisantes par la présence de furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives. L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 mL d'eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine (**Eisenhut, 2007**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aigüe par voie orale ; la majorité des

huiles couramment utilisées ont une dose létale (DL<sub>50</sub>) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.) ; d'autres, ont une DL<sub>50</sub> comprise entre 1 et 2 g /kg, (Basilic, de l'Estragon, et de l'Hysope avec 1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg) qui provoquent des convulsions dès 0,07 g/kg, de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), et de moutarde (0,34 g/kg) (**Bruneton, 1999**).

En ce qui concerne leur cancérogénicité, certaines huiles contenant des constituants "allyl et propénylphénols" dans leurs molécules sont susceptibles d'induire l'apparition de cancers chez les rongeurs (**Bruneton,1999**).

### **II.1.13. Domaines d'application des huiles essentielles**

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les plantes aromatiques et leurs essences sont utilisées dans de multiples domaines telles que l'alimentation, la pharmacie, la parfumerie, l'aromathérapie (**Richard, 1992**). Ces HEs ne sont pas toujours des produits finaux mais elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits

#### **1. Secteur parfumerie/ cosmétique**

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés.

#### **2. Secteur parfumerie technique**

La parfumerie technique (qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels) a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé.

#### **3. Secteur alimentaire**

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût des aliments, les parfumer et les colorer. Le secteur des boissons gazeuses s'avère être un gros consommateur. Les fabricants d'aliments préparés les utilisent de plus en plus parce que le consommateur recherche d'avantage les produits avec des ingrédients naturels. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange.

## 4.Secteur Santé

Dans le domaine de la santé, il faut distinguer le secteur pharmaceutique de celui des médecines douces. Dans ce deuxième secteur, les vertus thérapeutiques des huiles sont reconnues et utilisées depuis des siècles dans beaucoup de pays. En effet, ce marché a donné naissance à une industrie des produits naturels comme les produits homéopathiques. Cette industrie, très développée en Europe, bénéficie d'un attrait croissant de la part des consommateurs non seulement en Europe mais aussi en Amérique du Nord.

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues pures en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... Ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge (**Grysole, 2004**).

### II.1.14. La conservation des huiles essentielles

A cause de leur évaporation rapide, de leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (**Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991**).

### II.1.15. Principaux marchés des huiles essentielles

Les principaux marchés des HEs sont les Etats-Unis, l'Europe de l'Ouest, le Japon et le Canada (**Marrouf et Tremblin, 2009**). Le marché des huiles essentielles est en croissance. La majeure partie n'est pas produite localement à cause des contraintes de coût, de climat et des conditions géographiques. Le marché est très varié et on y trouve un grand nombre de manufacturiers ainsi que beaucoup de courtiers. En Europe Occidentale, la France est traditionnellement le centre de commerce du parfum. Marseille, Bordeaux et Paris sont restés longtemps le centre du marché des huiles essentielles. Londres, Hambourg et Rotterdam sont des centres de collection et de distribution ainsi que Brème, Amsterdam et Anvers.

## II.2. Les composés phénoliques

La plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement (prédateurs, microorganismes pathogènes); elle a donc développé un métabolisme particulier, le métabolisme secondaire lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre (**Kansole, 2009**). Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes. Ils sont divisés en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002; Abderrazak et Joël., 2007**). Les polyphénols constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le règne végétal avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al., 2003**).

### II.2.1. Définition

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...etc) (**Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003 ; Collin et Crouzet, 2011**).

La désignation « polyphénols » ou « composés phénoliques » sont fréquemment utilisée pour nommer l'ensemble des composés phénoliques qui désigne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules comportent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques. Ces molécules peuvent posséder ou non d'autres fonctions (alcoolique : OH, carboxylique : COOH...). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

### II.2.2. La classification et structure des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, pouvant aller du simple phénol en C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées et pouvant comporter différents degrés de modification (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...). Ces molécules peuvent être également diversement substituées (glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques). En s'appuyant sur la structure carbonée de base, plusieurs classes de composés phénoliques peuvent être distinguées.

**1. Les acides phénoliques :** Ils sont composés de 2 classes : Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique.

Les acides hydroxybenzoïques sont des structures en C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> et sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues et les fruits rouges (fraises, mûres...) (**Manach et al., 2004**).

Les acides hydroxycinnamiques ou phenylpropanes (structure en C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) sont plus abondants. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (**El Gharras, 2009**).

**2. Les lignanes:** Ils sont constitués de la condensation de deux unités de phénylpropane. Ils entrent dans la composition de certaines graines de céréales, de fruits et autres légumes ; ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lin (**El Gharras, 2009**).

**3. Les lignines :** Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités

phénoliques monolignols (**Mohamad Ibrahim *et al.*, 2011 ; Buranov et Mazza, 2008**). Elles sont présentes au niveau des vaisseaux conduisant la sève brute et sont responsables de la rigidité des fibres végétales. Elles constituent 15 à 35% du bois tendre des Gymnospermes et 15 à 35% du bois dur des Angiospermes.

**4. Les stilbènes :** Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Ils sont de type C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (**El Gharras, 2009**).

**5. Les flavonoïdes :** Le squelette de base des flavonoïdes en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) est constitué de deux cycles benzéniques A et B. Les trois carbones servant de jonction entre ces deux noyaux forment généralement un hétérocycle oxygéné central. Chez les flavonoïdes au sens strict le noyau aromatique B se trouvent sur le carbone C<sub>2</sub>

Ils représentent le principal groupe de composés phénoliques. Plus de 4000 flavonoïdes ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ces composés sont largement répandus dans les fruits, les légumes, les jus de fruits, le cacao, le thé et le vin (**Heim *et al.*, 2002**).

Les principales classes de flavonoïdes sont les flavonols, les flavones, les flavanones, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols ; elles diffèrent par la structure de l'hétérocycle. A l'état naturel, les flavonoïdes existent très souvent sous forme d'hétérosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions phénols peuvent être glycosylées. La nature des sucres liés aux molécules de flavonoïdes et leur position sur le cycle varient. La quercétine glycosylée est l'hétéroside le plus rencontré chez les végétaux (**Hollman *et al.*, 1996**).

✓ **Les flavonols :** Ils sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Cette dernière est connue pour posséder un très fort pouvoir antioxydant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. Elles sont rencontrées dans l'oignon, les brocolis, les poireaux, les myrtilles.... La glycosylation par un glucose ou un rhamnose est très fréquente (**Manach *et al.*, 2004**).

✓ **Les flavones :** Cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes. Elles sont essentiellement constituées de lutéoline et apigénine glycosylés. Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri (**Manach *et al.*, 2004**).

✓ **Les flavanones :** Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, la menthe, et sont présents en quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones

sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation (**El Gharras, 2009**).

✓ **Les anthocyanes** sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante (**Castaneda-Ovando et al., 2009**).

✓ **Les flavanols** : Les flavanols existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymère appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, mais le chocolat et le thé sont les principales sources de ce composé (**El Gharras, 2009**).

✓ **Les proanthocyanidines** sont connus sous le nom de tanins condensés. Ils peuvent être sous forme de dimères, oligomères et polymères de catéchine. Ils sont liés entre eux en position C4, C8 ou encore C6 (**Tarascou et al., 2011**). Ils entrent en grande partie dans la composition des raisins où ils sont localisés dans les graines et la peau. Le degré de polymérisation de ces composés varie en fonction de l'organe végétal (entre 1 et 20 pour la graine et en moyenne 30 pour la peau). L'aptitude de ces composés à s'associer avec les protéines salivaires leur confère la propriété d'astringence que l'on retrouve chez certains fruits (raisin, pomme, poire) et certaines boissons (thé) (**El Gharras, 2009**).

**6. Les isoflavonoïdes** : Ce sont des isomères des flavonoïdes, portant le noyau aromatique B sur le carbone C<sub>3</sub>. **Les isoflavones** sont des produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones glycosylées ou non dans l'alimentation. On les rencontre aussi dans les légumineuses.

### II.2.3. Localisation des composés phénoliques dans la plante

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, augmentant ainsi leur solubilité et limitant leur toxicité. Dans la paroi cellulaire, ils sont présents sous forme de lignines et de monomères en faibles quantités. Au niveau tissulaire, les composés phénoliques sont inégalement répartis ; les anthocyanes et les flavonols, sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes de la plante, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles.

## II.2.4. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés à partir de la voie de l'acide shikimique (Macheix et al., 2005). La biosynthèse des polyphénols se fait selon deux voies principales :

### II.2.4.1. Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont les produits de la voie des pentoses phosphate et de la glycolyse respectivement. Cette voie est à l'origine des précurseurs (Phénylalanine et Tyrosine) des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables, des C6C3 des flavonoïdes et des tannins condensés (Haslam et Cai., 1994; Dewick, 1995).

### II.2.4.2. Voie de l'Acétate

La voie de l'acétate conduit à des poly  $\beta$ -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones (Bruneton, 1999). De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies (du shikimate et de l'acétate) dans l'élaboration de composés d'origine mixte, comme les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

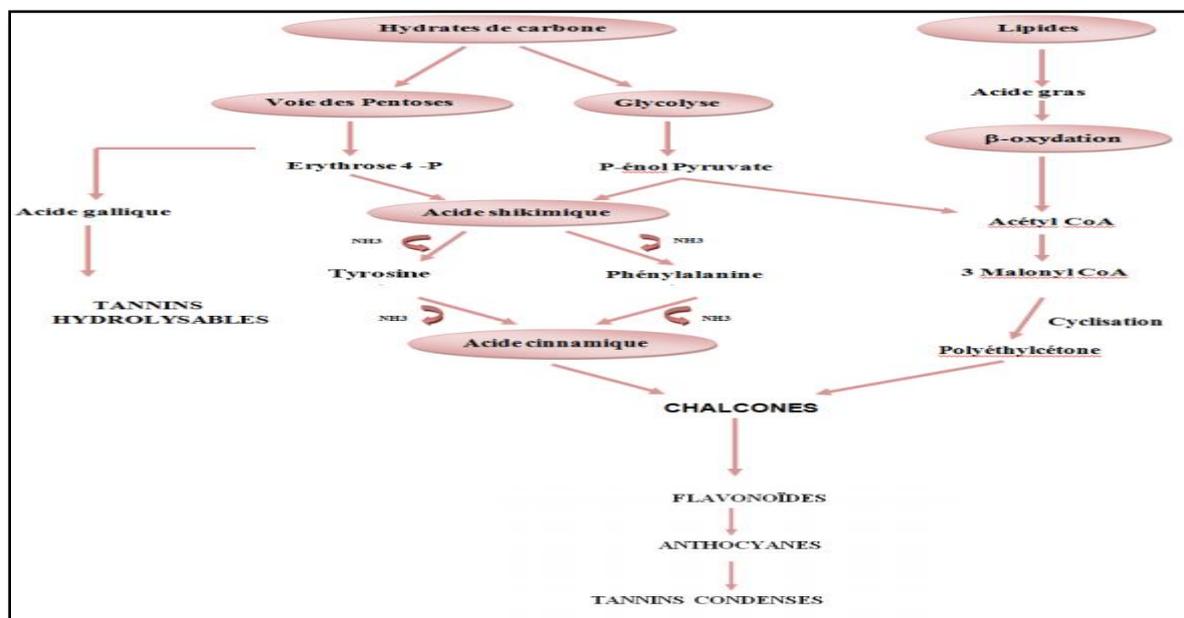


Figure n°6 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum, 2011).

## II.2.5. Rôle et intérêts des composés phénoliques

### II.2.5.1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques sont impliqués essentiellement dans les relations entre la

plante et son environnement. Les lignines interviennent dans la rigidification des parois cellulaires des vaisseaux du bois. Les acides phénoliques, en particulier l'acide férulique, participe à la régulation de la croissance pariétale en modifiant le niveau de réticulation des polymères protéiques ou osidiques des parois. Les composés phénoliques sont également impliqués dans l'organogenèse et la croissance de la plante. Les flavonoïdes régulent la croissance de la plante en agissant sur l'activité de l'auxine-oxydase. De plus, les antioxydants phénoliques sont impliqués dans l'équilibre rédox des cellules (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006; Havsteen, 2002**).

Certains composés phénoliques participent à la coloration des organes végétaux. Les organes colorés attirent insectes et oiseaux, qui assurent la dissémination des fruits et pollinisation des fleurs. Les molécules phénoliques sont également impliquées dans la protection des plantes contre :

1. Les prédateurs (leur métabolisme et leur digestion sont perturbés).
2. Les micro-organismes pathogènes (en synthétisant des formes toxiques de l'oxygène et en inhibant les enzymes et protéines du pathogène).
3. Les radiations solaires (en absorbant les rayonnements UV) (**Petti et Scully, 2009**).
4. Le dialogue plante – micro-organismes. Les isoflavonoïdes interviennent dans la symbiose existant rhizobium/légumineuses (**Havsteen, 2002**).

#### **II.2.5.2. Utilisation des substances phénoliques par les humains**

Les substances phénoliques ont un rôle dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume et qualité nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules) et des produits qui en dérivent par transformation (**Macheix et al., 2005 ; Dicko et al., 2006**).

Le rôle des molécules phénoliques est largement démontré dans la protection contre les maladies dégénératives comme les cancers et les maladies cardio-vasculaires (**Manach, et al., 2005**). Cependant, le bénéfice antioxydant que pourraient apporter les polyphénols à la santé humaine est sans cesse remis en question et leur biodisponibilité est encore mal connue ; des études, tant pharmacologiques que cliniques, sont donc encore nécessaires.

#### **II.2.6. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des substances phénoliques est généralement de type solide-liquide. Une méthode dite conventionnelle comme la macération était jusqu'ici utilisée. Cependant, ce procédé est long à mettre en œuvre et nécessite de grande quantité de solvant organique. Ces dernières années ont été marquées par l'utilisation de procédés d'extraction alternatifs, efficaces et durables, faisant intervenir des techniques comme l'extraction assistée par ultrasons,

l'extraction assistée par micro-ondes, l'électrotechnologie (champs électriques pulsés), des traitements enzymatiques ou des traitements qui impliquent des fluides compressés comme solvant d'extraction tels que l'extraction par fluide pressurisé, l'extraction par eau subcritique ou l'extraction par fluide supercritique. Ces techniques offrent de nombreux avantages d'un point de vue du rendement d'extraction, du temps d'extraction, de la consommation en énergie et en solvant. De plus ces procédés de chimie verte rendent possible le recours à des solvants qui sont respectueux de l'environnement et de la santé humaine. Le solvant vert le plus utilisé actuellement est l'éthanol en raison de sa disponibilité, sa pureté, son faible coût et son caractère non toxique et biodégradable (**Peroumal, 2014**). Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant.

### II.2.6.1. Méthodes d'extraction conventionnelle

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus répandue. De nombreux paramètres d'extraction doivent être pris en compte : le type et la concentration du solvant organique, la température, le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction. Parmi ces méthodes on peut citer :

✓ **Le Soxhlet** : C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. Les avantages du Soxhlet sont les suivants : l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale. La durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée sont les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, conduisant à des pertes économiques et à des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger. Etant donné la grande quantité de solvant utilisée, l'étape postérieure d'évaporation/concentration devient limitante. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable (**Luque de Castro et Luque de Garcia, 1998 ; Wang et Waller, 2006**).

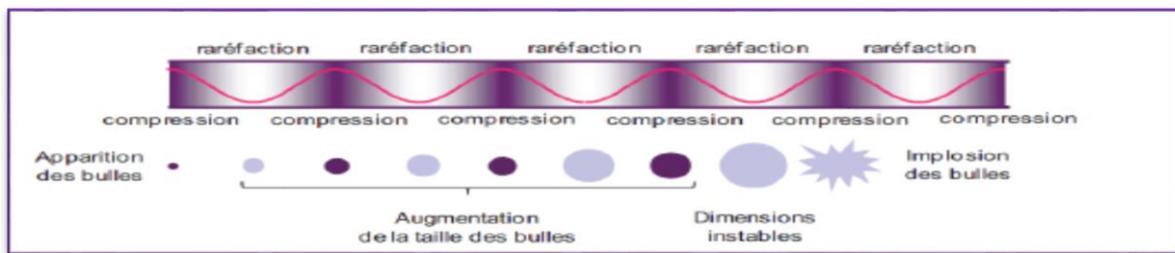
✓ **La macération** : Elle consiste à mettre en contact le matériel végétal avec le solvant d'extraction, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à 4°C pour empêcher l'action des polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques, pendant une durée déterminée. Cette technique repose sur la solubilité des substances dans un solvant d'extraction. Pour une meilleure extraction, la matrice végétale est généralement broyée. Les polyphénols sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte tels que l'éthanol, le méthanol ou l'acétone ou de l'eau (**Peroumal, 2014**).

### II.2.6.2. Méthodes d'éco-extraction

L'éco-extraction est une technique qui permet de réduire le temps d'extraction et la consommation d'énergie.

#### II.2.6.2.1. Extraction assistée par ultrasons

Dans les liquides, la propagation des ondes entraîne des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Cette différence de pression induit un mouvement à l'intérieur du fluide. Lors d'un cycle de raréfaction, des bulles de cavitations vont se former à partir de noyaux gazeux existant dans le fluide (**Fig. 8**). L'effet de tension sur le fluide produit de nouvelles cavités. Lorsque les bulles atteignent une dimension instable, elles implosent pendant le cycle de compression libérant des énergies très importantes.



**Figure n°7 :** Représentation des bulles de cavitation sous l'effet des ultrasons (**Mason et Paniwnyk, 2000**).

Lorsque les bulles de cavitation sont générées à proximité de la surface du matériel végétal, l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse (**Fig. 9**). Une augmentation locale de la pression (1000 atm) et de la température (5000 K) induit la destruction des parois cellulaires de la matrice végétale permettant ainsi la libération des molécules d'intérêt dans le milieu environnant (**Chemat et al., 2011**).



**Figure n°8 :** Destruction de la membrane cellulaire par l'implosion de bulles de cavitation (**Walker, 1978**).

L'extraction assistée par ultrasons peut être utilisée sur diverses matrices végétales pour l'extraction des antioxydants, notamment les composés phénoliques. Généralement, le rendement et la cinétique d'extraction sont améliorés (**Chemat, 2011**).

#### II.2.6.2.2. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de haute fréquence allant de 300 MHz à 300 GHz entre les ondes radio et les infrarouges. Sous l'action des micro-ondes, les molécules vibrent en libérant de la chaleur rapidement conduisant à une augmentation

importante de la température à l'intérieur du matériel végétal et provoquant finalement la rupture des cellules. Les composés à extraire sont alors libérés vers l'extérieur et peuvent soit constituer directement l'extrait (cas de l'extraction assistée par micro-ondes sans solvant) soit se mélanger avec le solvant environnant (cas de l'extraction assistée par micro-ondes avec solvant). L'échauffement rapide de la matière constitue l'une des spécificités du chauffage micro-onde. Le transfert de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur du matériel végétal, induisant ainsi une cinétique d'extraction plus courte.

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique adaptée pour l'obtention de composés antioxydants, notamment les polyphénols. Elle permet aussi de réduire le volume de solvant utilisé tout en assurant un meilleur rendement par rapport aux méthodes d'extraction classiques (**Chemat, 2011**).

#### **II.2.6.2.3. Extraction par fluide pressurisé**

Cette technique d'extraction solide-liquide emploie les mêmes solvants que la macération mais à des pressions (100 à 140 atm) et des températures (40 à 200°C) plus élevées pendant un temps très court (5 à 15 minutes) (**Garcia-Salas et al., 2010**). Cette combinaison de hautes pressions et de températures situées au-dessus du point d'ébullition du solvant favorise la diminution de la viscosité du solvant, du temps d'extraction et la désorption de solutés de la matrice végétale.

En fin d'extraction, l'extrait est récupéré dans un récipient de collecte par un flux de gaz neutre comprimé, en général de l'azote. Le processus d'extraction peut être répété plusieurs fois avec du solvant frais, ce qui permet d'améliorer le transfert des composés à extraire et le rendement d'extraction.

#### **II.2.6.2.4. Extraction par eau subcritique**

L'extraction par eau subcritique est une variante de la technique d'extraction par fluide pressurisé. L'eau chaude maintenue sous sa forme liquide grâce à l'utilisation de hautes pression et température est appelée eau subcritique. Lorsque l'eau est chauffée à 250 °C à une pression supérieure à 40atm, sa constante diélectrique ( $\epsilon=27$ ) est comparable à celle de l'éthanol ( $\epsilon=24$ ) et du méthanol ( $\epsilon=33$ ) (**Luque-García et Luque de Castro, 2003**). Ainsi l'extraction par eau subcritique permet d'extraire des composés moyennement polaires à non polaires contrairement à l'eau à température et pression ambiantes.

#### **II.2.6.2.5. Extraction par fluide supercritique**

Dans des conditions de températures et de pressions supérieures aux valeurs de ses points critiques, le fluide est dit supercritique et présente un état à la fois proche d'un gaz et d'un liquide.

Le dioxyde de carbone est le solvant le plus largement utilisé en raison de ses conditions critiques facile à atteindre (31,1 °C and 73,8 MPa), sa non toxicité, sa disponibilité. Il est également peu couteux, non inflammable et chimiquement stable (**Garcia-Salas et al., 2010**). Lors de l'extraction, le solvant passe de manière continue à travers l'échantillon et les molécules d'intérêts sont obtenues sous forme concentrées après élimination du CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse. Ce type de solvant ne convient pas pour l'extraction des polyphénols en raison de leur faible polarité. L'ajout d'un co-solvant comme l'éthanol ou le méthanol est nécessaire.

#### **II.2.6.2.6. Extraction assistée par des enzymes pectolytiques**

Les préparations enzymatiques commerciales contiennent principalement des pectinases, des cellulases, des hémicellulases, des glucanases ou encore des tannases. Ces enzymes sont couramment utilisées pour fragiliser ou dégrader les parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu intracellulaire. Elles servent donc principalement à améliorer l'extraction des polyphénols. Cependant, c'est une technique onéreuse en raison du coût des enzymes employées (**El Darra, 2013**).

#### **II.2.7. Propriétés chimiques et mécanismes d'action contre les radicaux libres**

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes stabilisés par résonance. Cet anion a la possibilité de perdre un électron pour former un radical (**Sartori-Thiel, 2003**) ou être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical. Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre (**Korkina et al., 2012**).

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. (**Sartori-Thiel, 2003**). Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale (**Manach et al., 2004**).

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Cette activité est due aux groupements hydroxyles présents sur cycles benzoïques et à la proximité des groupes alkyls. Les flavonoïdes est la famille qui réunit toutes ces caractéristiques (**Rice-Evans et al., 1996**).

## II.2.8. Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques

**1. Activité antioxydante :** Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, les polyphénols, en particulier, les **flavonoïdes**. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $NO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$ ,  $RO^{\cdot}$  et  $ROO^{\cdot}$ ) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides nucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydant en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (**Quideau et al., 2011**).

**2. Activités antibactérienne, antifongique et antivirale :** Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, les champignons, et les virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (**Xia et al., 2011**). La vigne, *Vitis vinifera*, possède des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'acide gallique, d'acides hydroxycinnamiques, de flavanols, de flavonols, et de tanins (**Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009**).

Les composés, appartenant aux **acides phénoliques**, les plus représentatifs sont les acides cinnamiques et caféiques. On les retrouve présents dans le thym et le téragone. Ces composés sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus (**Cheng et al., 2008**).

La capacité des **tanins** à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (**Cowan, 1999**).

**3. Activité anti-inflammatoire :** Les études de l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes sont très répandues, bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (**Benavente-Garcia et Castillo, 2008; Conforti et al., 2008**). Dans la famille des **stilbènes**, le resvératrol, a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro*. Les recherches se tournent actuellement vers la synthèse de produits à base de resvératrol dans le but de diminuer l'utilisation de médicaments synthétiques (**Udenigwe et al., 2008**).

### II.2.9. Applications industrielles des polyphénols

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels, agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, flavanols et tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires (**Daglia, 2012**).

La capacité antioxydante des polyphénols est utilisée dans les produits agroalimentaires pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (**Moure et al., 2001**).

## III. Activité antioxydante

Radicaux libres, Espèces Réactives d'Oxygène (ERO), Stress oxydant et Antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **R. Gerschman** puis **D. Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En **1969**, les Américains **Mc Cord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant, la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des EROs dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

### III.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (**Sayre et al., 2008 ; Bloomer et al., 2008 ; Browne et al., 2008 ; Power et al., 2010**). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants. L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les EROs (**Mac Laren, 2007**).

### III.2. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Jacques et André., 2004**). Cette molécule est très instable et réagit

rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Martinez-Cayuela, 1995**). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes, voir quelques nanosecondes) (**Mac Laren, 2007 ; Sayre et al., 2008 ; Goto et al., 2008**).

Les principales espèces réactives de l'oxygène sont le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) ainsi que certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (**Jacques et André., 2004 ; Gutteridge, 1993**).

### III.2.1. Production des radicaux libres

Chez les plantes, la source majeure des EROs est le chloroplaste avec la production de l'oxygène singulet au niveau de l'antenne des photosystèmes et de l'anion superoxyde qu niveau du système de photolyse de l'eau et du PSI

L'une des sources majeures de production des EROs dans la cellule animale est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par la cytochrome oxydase mitochondriale (**Marfak, 2003**).



Les autres chaînes de transport d'électrons situées dans le peroxysomes et le RE contribuent également à la production du  $O_2^{\cdot-}$  dans la cellule. D'autre part, les EROs peuvent se produire au cours des processus pathologiques ou la production du radical répond à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (NADPH oxydase et xanthine oxydase) (**Antwerpen, 2006**).

Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Favier, 2003**). D'autres systèmes sont capables de produire les EROs : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, et prostaglandines (**Babior et al., 2002**) ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical  $O_2^{\cdot-}$ .

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso *et al.*, 2007). L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes (Hadi, 2004). Des toxiques, tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Hadi, 2004).

### III.2.2. Conséquences moléculaires du stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003). La mise en évidence des dérivés de l'oxydation de ces différents substrats seront donc des marqueurs de la présence d'un stress oxydant (Cano, 2007).

✓ **Oxydation de l'ADN** : Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations des bases et des pontages ADN protéines (Krippel-Drews *et al.*, 1994). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, donnant naissance à un grand nombre de bases modifiées ou indirect résultant de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthéno-dérivés.

✓ **Oxydation des protéines** : L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés (groupement thiol des cystéines). Ils sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) (Jacques et André, 2004). A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux.

✓ **Oxydation des lipides** : Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique provoque la désagrégation des membranes biologiques.

### III.2.3. Alimentation et stress oxydant

La production des EROs peut se faire au niveau cellulaire en réponse à divers stimuli, tel que la surcharge métabolique elle-même provoquée par une surabondance de macronutriments. Ainsi, un repas riche en graisse et en glucides induit une réponse oxydatif et inflammatoire plus intense et prolongée avec une production accrue des ERO chez les patients obèses par rapport aux sujets normo-pondérés (**Patel et al., 2007**). Il est possible donc de choisir des aliments antioxydants et non inflammatoire afin de minimiser l'inflammation et le stress oxydatif postprandial. Une bonne alimentation fournit directement l'essentiel des éléments pouvant assurer une bonne défense antioxydante. Cette alimentation devrait garantir :

- ◆ Un apport en Vitamines A et C, en caroténoïdes et en flavonoïdes qui ont pour rôle la neutralisation des entités radicalaires en les piégeant (Scavengers).
- ◆ Un apport en oligoéléments (Fer, Sélénium, Cuivre, Zinc et Manganèse) indispensables à l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, Se-GPx).

Sur la base de ces données, les scientifiques accordent de plus en plus d'importance à une alimentation riche en fruits et légumes.

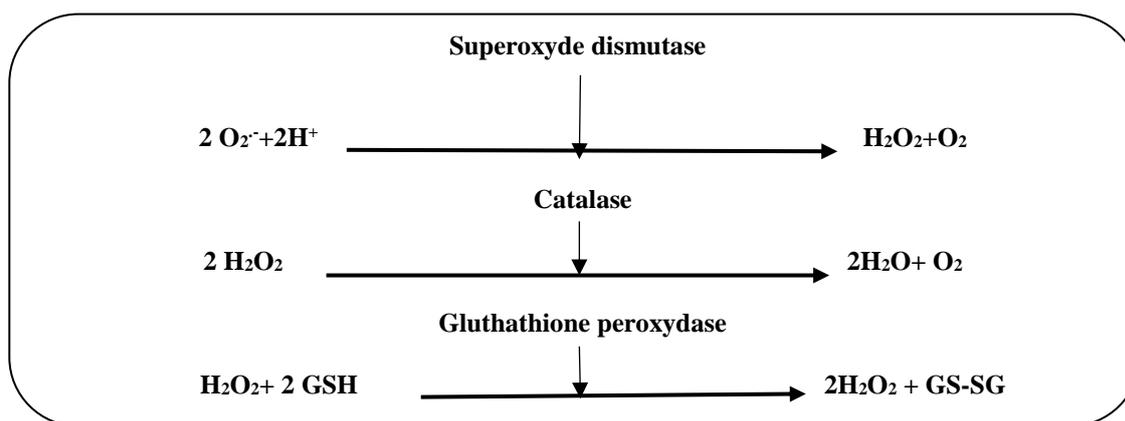
### III.3. Les antioxydants

En termes de protection et de préservation des aliments, différentes mesures pour contrôler et minimiser l'oxydation de lipides sont recherchées par les industries. L'ajout des antioxydants peut prévenir ou ralentir le processus d'oxydation. Actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels est constaté. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (**Le Cren, 2004**).

Pour contourner les dommages causés par les EROs, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (**Halliwell et Gutteridge, 2007**).

#### III.3.1. Les différents types d'antioxydants

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces pour l'élimination des radicaux libres primaires de façon permanente (**Avissar et al., 1989**). Cette ligne de défense est constituée de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et des peroxydases (glutathion et ascorbate) (**Favier, 2006**). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



**Figure n°9 :** Réactions enzymatiques de piégeage des EROs (Halliwell, 2006).

Cette deuxième ligne de défense, consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents. Ce sont des molécules exogènes, apportées par l'alimentation comme les vitamines, les minéraux et les polyphénols. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* (vitamine E, acide ascorbique,  $\beta$ -carotène, flavonoïdes, composés phénoliques etc.) (Kohen et Nyska, 2002). Il existe des antioxydants synthétiques largement utilisés (butylhydroxytoluène (BHT) du butylhydroxyanisole BHA) et des esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate doctyle, et de dodécyle) et des antioxydants synthétiques moins courant tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA) et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Ionox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT (Johnson, 1988).

### III.3.2. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les EROs ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques et la transduction du signal (Favier, 2003).

Dans l'ensemble, dans les tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits ; la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydant (Sohal et al., 2002).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols...) (**Kohen et Nyska, 2002**).

### III.3.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène cas de la vitamine E ( $\alpha$  tocophérol) ou d'électrons souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol (**Favier, 2006**).

Il y a actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (**Le Cren, 2004**).

### III.3.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diversifiée des antioxydants, il n'y a pas de méthode universelle de mesure de l'activité antioxydante d'une façon bien précise (**Cristina et al., 2009**). Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Cristina et al., 2009**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH<sup>+</sup> (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) etc. Les différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Georgieva et al., 2010**).

#### ✓ Piégeage du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le  $NBT_2^+$  (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi, un composé antioxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune.

### ✓ Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur son absorption dans l'UV. Comme la concentration de  $H_2O_2$  diminue par les composés piègeurs, absorbance à 230nm diminue également. Néanmoins certains échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant la réalisation d'une mesure à blanc (Malgalhae *et al.*, 2008).

### ✓ Piégeage du radical hydroxyle ( $HO\cdot$ )

Le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) est un radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (Castro *et Freeman*, 2001). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction élevé (2310 mV) qui lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine (Siddhuraju *et Becker*, 2007).

La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical  $OH\cdot$  avec une molécule détectrice (Clement *et Armstrong*, 1972). Les molécules détectrices utilisées dans la littérature, sont nombreuses. On peut citer le désoxyribose (Halliwell *et al.*, 1987), la dopamine (Slivka *et Cohen*, 1985), la thymine (Hicks *et Gebick*, 1986), la 4- nitrosodiméthylaniline (Kraljic *et Yrumbore*, 1965) .

### ✓ Piégeage du radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ) par la méthode de TRAP et ORAC

La mesure de l'activité antiradicalaire par la technique de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par Cao *et al.*, (1993) est une méthode simple et reproductible permettant d'évaluer la capacité antioxydante de différentes molécules. La  $\beta$ -PE ( $\beta$  Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydant. En présence d'AAPH [(2,2'-azobis (2-amidinopropane) dichloride], un donneur du radical peroxy, la structure tétramérique de la  $\beta$ -PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation est dépendante de la concentration en radicaux peroxydes du milieu réactionnel. Elle peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la  $\beta$ - PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la fluorescence, est directement reliée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel.

Dans le test TRAP (total radical Trapping Antioxidant Potential), l'AAPH (Total radical-trapping antioxidant parameter) est solubilisée en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur comme le luminol devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C.

La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celui d'un antioxydant comme le Trolox (témoin) (**Schlesier *et al.*, 2002**).

✓ **Piègeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>)**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Brand-Williams *et al.*, 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Popovici *et al.*, 2009**).

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

✓ **Piègeage du ABTS (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])**

La méthode de radicale ABTS est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de l'oxydation mono électronique du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 - éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS<sup>•+</sup>) :



Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption (**Jiri *et al.*, 2010**).

✓ **Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing - antioxydant Power)**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe<sup>3+</sup>) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaiz (1986) (Bougandoura, 2013)**. La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (**Ou *et al.*, 2001**).

✓ **Blanchissement de la bêta-carotène (β-carotene bleaching method)**

Cette technique spectrophotométrique développée par **Marco (1968)**, puis légèrement modifiée par **Miller (1971)** consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs (**Von Gadow *et al.*, 1997**) ou sous forme d'extraits végétaux (**Moure *et al.*,**

2000; Koleva *et al.*, 2001) induit un retard de la cinétique de décoloration du  $\beta$ -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple.

✓ **Méthode de thiocyanate ferrique (FTC)**

L'activité antioxydante des extraits de plantes est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique selon la méthode décrite par (Bidie *et al.*, 2011).

✓ **Méthode de la xanthine oxydase**

Cette méthode est basée sur l'inhibition de XO (xanthine oxydase) qui conduit une diminution de la production d'acide urique, qui a été déterminée par spectrophotométrie. (Oskoueian *et al.*, 2011).

✓ **Chélation du fer**

La capacité chélatrice des extraits des plantes est déterminée selon la méthode de **Le et al.** (2007). La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe (II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions  $Fe^{2+}$  (Benbrinis, 2012).

## **VI. Activité antimicrobienne**

La présence des pathogènes dans les denrées alimentaires est responsable de nombreuses maladies qui peuvent être mortelles (Burt, 2004). Au cours des dernières années, l'industrie agroalimentaire s'intéresse aux extraits naturels des plantes et principalement aux huiles essentielles comme alternatives aux additifs artificiels, d'une part pour conserver les aliments et diminuer leur altération et d'autre part pour prévenir et contrôler la croissance des microorganismes.

### **IV.1. Diversité du monde microbien**

#### **IV.1.1. Les bactéries**

Les bactéries se divisent en deux groupes majeurs : bactéries à gram positif (colorées en violet), bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes ; celles des bactéries gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir (Leclerc *et al.*, 1995 ; Madigan *et al.*, 1997).

✓ **Bactéries gram négatif** : Les bactéries Gram négatif possèdent une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane cytoplasmique (ou membrane interne), d'un périplasme contenant une paroi fine et d'une membrane externe ; ces bactéries ayant deux membranes biologiques sont qualifiées de didermes.

✓ *Escherichia coli* : Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, *Escherichia coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La majorité des souches d'*Escherichia coli* ne sont pas pathogènes (**Edberg et al., 2000**). C'est la seule bactérie qui soit sans équivoque d'origine fécale et, à ce titre, elle est considérée comme un organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale.

✓ *Pseudomonas aeruginosa* : Cette espèce, connue sous le nom de bacille pyocyanique ou bacille du pus bleu, est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries gram négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés) (**Leclerc et al., 1995**).

✓ *Salmonella typhimurium* : Les salmonelles (*Salmonella*) forment un genre de protéobactéries appartenant à l'ordre des entérobactéries. Elles provoquent des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire (**Leclerc et al., 1995**).

✓ *Acinetobacter baumannii* est une bactérie Gram-négatif du genre *Acinetobacter*. Il s'agit d'un germe d'infection opportuniste chez l'Homme, particulièrement chez les personnes immunodéprimées. Elle est connue comme agent de maladies nosocomiales où sa transmission est manu portés. Elle a aussi été isolé du sol et de l'eau.

✓ *Klebsiella pneumoniae* : Le genre *Klebsiella* (klebsielles), de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces dont l'espèce-type *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquente. La *Klebsiella* est naturellement présente au niveau de certains organes comme le tube digestif ou les poumons, mais son action est bien contrôlée par l'organisme, d'où l'absence d'infection.

✓ *Enterobacter cloacae* : *Enterobacter* est un genre de bactérie appartenant à la classe des Gamma proteobacteria et à la famille des *Enterobacteriaceae*. L'habitat est l'intestin de l'Homme et des animaux. *Enterobacter* est aussi trouvé dans les selles, les eaux d'égout, le sol, les produits laitiers. Certaines souches du genre *Enterobacter* peuvent être responsables d'infections nosocomiales (**Ruiz-Garbajosa et al., 2006**).

✓ *Proteus mirabilis* est une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries et au genre *Proteus*. Elle est commensale du tube digestif des animaux et peut être responsable d'infections essentiellement urinaires et cutanées.

✓ **Bactéries gram positifs** : Les bactéries Gram positif possèdent une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane cytoplasmique et d'une épaisse paroi; puisqu'elles n'ont qu'une membrane biologique, elles sont aussi appelées bactéries monoderms.

✓ *Staphylococcus aureus* : Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, aérobies ou anaérobies facultatifs. Le staphylococcus est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques).

✓ *Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'Homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin (Ruiz-Garbajosa et al., 2006).

✓ *Listeria monocytogenes* : C'est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'homme.

✓ *Bacillus cereus* : Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles Gram positif. Le bacille peut produire six types de toxines, cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches (Logan et al., 2006 ; From et al., 2005).

#### IV.1.2. Les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes pluricellulaires ou unicellulaires. Le terme champignon est devenu ambigu car il désigne un taxon obsolète. Ce terme englobe à la fois les *Fungi* (ou *Mycota*), les *Oomycota*, les *Chytridiomycota* et les *Mycetozoa*. Leurs cellules, pourvues d'une paroi chitineuse ou cellulosique, sont immobiles et se nourrissent des molécules organiques se trouvant directement dans le milieu. Leur appareil végétatif est un thalle ; ce sont donc des thallophytes.

✓ *Candida albicans* est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. C'est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. On le retrouve chez 80 % de la population, et il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier.

#### IV.2. Types d'agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (Asada et al., 1998). Ces substances ont une affinité plus importante pour les micro-organismes provoquant leur destruction tout en minimisant les dommages qu'elles causent à l'organisme (Perry et al., 2002). Il existe trois types d'agents antimicrobiens ; des agents physiques, chimiques et chimio thérapeutiques.

✓ **Les agents physiques** : Exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide où

sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violet, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha, rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application (**Bousseboua, 2001**).

✓ **Les Agents chimiques** : Correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents (**Bousseboua, 2001**).

✓ **Les Agents chimio thérapeutiques** : Sont des composés chimiques naturels ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ces composés agissent à faibles doses. Ils exercent une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Ils inhibent le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensifs pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux (**Guillaume, 2000**).

✓ **Les agents biologiques** :

**Les enzymes** : Divers enzymes lipidiques pourraient jouer un rôle dans la protection des aliments contre les microorganismes. Elles pourraient avoir des applications dans la conservation spécialement quand les bactéries sporulantes sont à craindre (**Bourgeois et al., 1996**).

**Les huiles essentielles** : Sont des molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes ; elles sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microorganismes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. 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 à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

### **IV.3. Huiles essentielles comme agents antimicrobiens**

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus (**Safaei-Ghomi et al., 2010; Belletti et al., 2008**).

C'est en 1875 que Buchholtz avait mis en évidence pour la première fois que les HEs sont douées d'une activité biocide envers les microorganismes (**Pauli et Schilcher, 2010**).

Les huiles essentielles sont parmi les métabolites secondaires les plus actifs vis-à-vis des microorganismes. *In vitro*, l'effet microbiocide de certaines HEs a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (**Valnet et al., 1978**).

Cette affinité du potentiel antifongique est expliquée par le fait que les plantes sont beaucoup plus attaquées par les champignons que par les bactéries (**Agrios, 2005**). D'autre part, les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles aux HEs par rapport aux bactéries Gram positif grâce à la physiologie de leur paroi (**Burt, 2004**).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), des PBP 2a (penicillin binding protein) (quinones, terpénoïdes) provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et des  $\beta$ lactamases (alkyls gallates).

Les composants ayant des structures polyphénoliques comme les flavonoïdes et les tannins sont fortement actifs contre les microorganismes testés. Les polyphénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles contre les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation (**Dugo et al., 1998 ; Dorman, 2000; Chaumont et al., 2001**). Les monoterpénols, sont connus après les phénols, pour avoir une action plus bactéricide que bactériostatique. Ces molécules à large spectre, sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Elles agiraient comme des agents dénaturants des protéines ou comme des agents déshydratants (**Onawunmi, 1984**). Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisées sont le néral et le géraniol (des citrals), le citronnellal et le cuminal (**Inouye, 2001**).

#### **IV.4. Nature de l'activité antibactérienne**

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets (**Hammer, 1999**) : Une activité létale ou bactéricide qui est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies et une inhibition de la croissance ou effet bactériostatique.

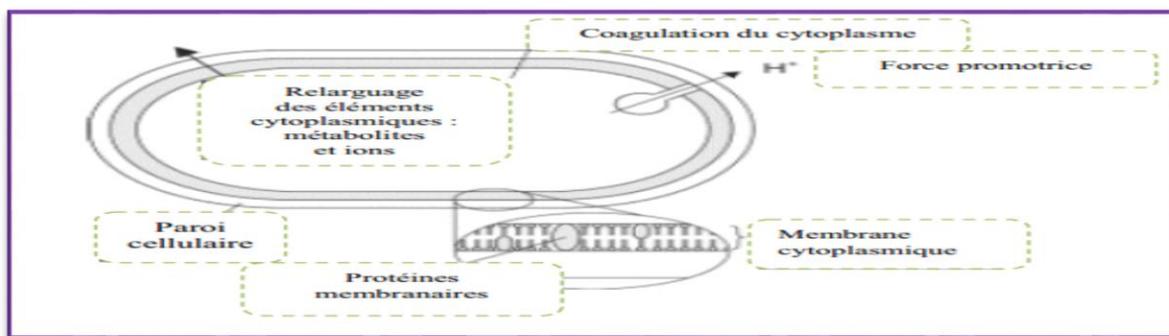
L'activité bactériostatique est plus souvent assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide. Cependant il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (**Kunle et al., 2003; Walsh et al., 2003**).

L'effet bactéricide des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols sur *Staphylococcus aureus* (Desjobert et al., 1986), ou encore celle de l'*Origanum compactum* sur *Escherichia coli* (Burt et Reinders, 2003) a été mis en évidence. Toutefois, cette action bactéricide des huiles essentielles sur la cellule bactérienne demeure encore insuffisamment élucidée (Lakhdar et al., 2012).

#### IV.5. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est liée principalement aux profils chimiques. Plusieurs familles chimiques sont présentes dans la même préparation. Les huiles essentielles peuvent comporter plus de soixante composants différents dont le composant majoritaire peut constituer de plus de 85% des huiles essentielles (Lahlou, 2004). Cette remarquable diversité constitutionnelle permet d'expliquer l'étendu du champ d'action.

Cependant le mécanisme par lequel ils agissent sur les micro-organismes reste difficile à cerner, chaque constituant de l'huile possédant son propre mode d'action. Il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson et al., 2002) tels que la précipitation des protéines et des acides nucléiques (Rafi et al., 1994), l'inhibition de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN, des protéines et des peptido-glycanes (Combe et al., 1988). Il a aussi été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, de la force motrice des protons, la fuite d'électron ainsi que la coagulation du contenu protéique des cellules.



**Figure n°10 :** Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

Le mode d'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier de leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche de phospholipides de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de fluidité de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions ( $K^+$ ). Ce mécanisme a été observé *in vitro* avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram<sup>+</sup> (*Staphylococcus aureus*) et Gram<sup>-</sup> (*E. coli*) et les levures (*Candida albicans*) (Carson et al., 2002; Cox et al., 2000).

L'effet inhibiteur de certains aldéhydes sur des micro-organismes fongiques est essentiellement dû d'une part à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire et d'autre part à la formation d'un complexe entre le donneur d'électron et l'aldéhyde, induisant un changement de l'état ionique de la membrane qui se traduit par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Cet état entraîne une mort certaine de la cellule fongique (**Kurita et al., 1979**).

Les extraits phénoliques possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes. Ils sont efficaces contre un large spectre de microorganismes pathogènes et non pathogènes. Leur action se déroule en trois phases (**Dorman, 2000**).

1. Attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
2. Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
3. Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

#### **IV.6. Effets antimicrobiens des composants des huiles essentielles**

Les effets des composants des huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- ✓ **Indifférence** : L'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- ✓ **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- ✓ **Synergie** : L'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- ✓ **Antagonisme** : L'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

Pour les bactéries gram positifs, des associations d'huiles essentielles de cannelle et de thym sont synergiques ou indifférentes sur *Staphylococcus aureus* et sont indifférentes sur le genre *Bacillus* sp. (**Hermal, 1993**). Pour les bactéries gram négatif, comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, les associations ne sont pas plus efficaces que les huiles essentielles pures et elles sont souvent indifférentes. Par contre, une prédominance de cannelle est plus efficace que celle du thym, contrairement aux bactéries à gram positif (**Hermal, 1993**).

#### **IV.7. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : La composition chimique de l'HE et le microorganisme resté (type, structure...) (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

#### IV.7.1. Activité liée à la composition chimique

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, certains composés minoritaires pourraient agir de manière synergique (**Lahlou, 2004**).

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément mais des différences quantitatives existent. En effet, l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément (**Lahlou, 2004; Didry et al., 1993**).

Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures (**Cosentino et al., 1999; Dorman et Deans, 2000**). Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (**Burt et Reinders, 2003; Cox et al., 2000**). Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane (**Pibiri, 2008**). Cependant, les phénols seuls ne sont pas responsables de l'intégralité de l'activité des huiles essentielles ; les autres composés chimiques doivent également être pris en compte (**Cosentino et al., 1999**). Les alcools sont généralement plus connus aussi bien pour leur activité létale que pour leur action bactériostatique sur les cellules végétatives, en dénaturant les protéines (**Dorman et Deans, 2000**). Les aldéhydes, fortement électronégatif sont de puissants agents antimicrobiens en réagissant avec les composés nitrés vitaux (protéines et acides nucléiques) des bactéries (**Desjobert et al., 1997; Dorman et Deans, 2000**).

#### IV.7.2. Activité liée au microorganisme

Une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (Gram positif ou Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance. En effet, les bactéries Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatif (**Zaika Spices and Herbs, 1988 ; Santos et Novales, 2012**).

La résistance bactérienne aux huiles essentielles, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm. En effet, un isolat clinique récent peut montrer une résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte (**Alviano et Alviano, 2009**), tandis que les microorganismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles (**Fine et al., 2001**).

## IV.8. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, à leur volatilité, à la nécessité de les tester à de faibles concentrations et aux problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon :

- ✓ Le milieu dans lequel est réalisé la diffusion de l'huile essentielle (liquide, solide ou gazeux)
- ✓ La nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, en puits, en solution alcoolique ou en dispersion dans un émulsifiant.

Une première étape consiste à faire un « screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes après sous-culture sur milieu sans antibiotiques (Andrews, 2001; Cosentino et al., 1999).

### IV.8.1. Techniques de screening des huiles essentielles

#### IV.8.1.1 Aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Girault et Bougeon, 1971). Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose) de 6 mm sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (10  $\mu$ L) (Bondi et al., 1993). Après ensemencement et incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (Fig.11).

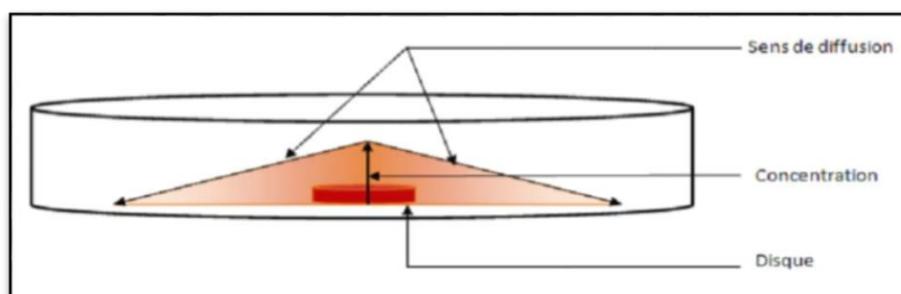


Figure n°11 : Schéma du principe de la mise en œuvre de l'antibiogramme

### IV.8.1.2 Technique de diffusion en puits

Un puits (d'environ 6mm) est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle pure ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont mesurées (**Dorman et Deans, 2000**).

Pour ces deux techniques, la sensibilité du germe testé peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (**Duraffourd et al., 1990**).

## IV.8.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles

### IV.8.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide

L'huile essentielle est mélangée aux concentrations désirées avec le milieu gélosé liquéfié par simple agitation manuelle. Après refroidissement, le milieu estensemencé puis incubé (**Taudou, 1990**). L'addition d'un émulsifiant (Tween 80), inerte, stable et dépourvu d'action synergique antibiotique, peut être réalisée pour améliorer la solubilité de l'huile essentielle et sa diffusion dans la gélose (**Perruci et al., 1994**).

### IV.8.2.2. Techniques de diffusion en milieu liquide

#### ✓ Test de microdilution: (**Carson et al., 1995**)

L'incorporation de l'huile essentielle dans le milieu de culture liquide nécessite la présence d'un émulsifiant (Tween 80) pour la préparation des différentes concentrations d'huile essentielle. La détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle se fait au moyen d'une microplaque de 96 puits. La détermination de la CMI est réalisée en faisant appel à un indicateur de croissance en solution (Triphényl Tétrazolium Chloride, TTC). La croissance bactérienne est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge de la solution témoignant de la réduction ou de la précipitation du TTC. La CMI est ainsi déterminée par le puits de la microplaque, qui ne montre aucun changement de couleur. La CMB est calculée en prélevant 10 µL des puits ne montrant pas de croissance bactérienne sur un milieu solide. La plus faible concentration tuant 99,9% des micro-organismes en culture sur ce milieu correspond à la CMB.

#### ✓ Test de macrodilution (**Onawunmi 1989**)

Le principe est le même que celui du test de micro dilution, sauf qu'il est effectué dans des tubes contenant l'huile essentielle, à différentes concentrations, incorporée dans un bouillon de culture liquide. La CMI est déterminée au niveau du tube ne montrant aucune croissance microbienne visible.

### IV.3.7.2. 3. Techniques de diffusion en phase vapeur

#### ✓ Méthode des micro-atmosphères : (Kellner et Kobert ,1954)

Le disque imprégné d'essence est disposé au centre géométrique du couvercle de la boîte de pétri et non pas au contact avec la gélose. Après fermeture de la boîte, les substances volatiles s'évaporent dans l'enceinte de la boîte. La lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halo qui sera mesuré par un pied à coulisse. Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles ; elle met seulement en évidence la sensibilité du microorganisme testé aux constituants volatils à la température d'incubation.

## V. Activité insecticide

Les principales espèces ravageuses des denrées stockées appartiennent aux Coléoptères et aux Lépidoptères. En effet, des enquêtes ont révélé que les principaux ravageurs Lépidoptères des céréales sont les *Sitotroga cerealella* (Oliv.), *Ephestia kuehniella* (Zell.) et *Plodia interpunctella* (Hüb.). Pour les Coléoptères, les principaux ravageurs sont *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (Fab.), *Trogoderma granarium* (Everts) et *Tribolium castaneum* (Hbst.).

L'utilisation des insecticides chimique constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les insectes ravageurs ; le recours aux produits chimique d'origine végétale apparait comme la meilleure alternative de lutte propre (Abbassi et al., 2005).

Face à la demande croissante de promotion d'un développement durable et de la protection de l'environnement, des méthodes alternatives sont préconisées. Dans le cas des pays en voie de développement, il est urgent de mettre l'accent sur l'exploitation des pratiques locales à travers un recensement des composantes de la biodiversité (Kossou et al., 2001). Une sélection selon des critères basés sur l'ethnobotanique a plus de chance d'aboutir à la découverte d'un principe actif d'intérêt qu'un criblage de plantes effectué au hasard (Lewis et Elvin-Lewis, 1995).

### V.1. Etude bioécologique du *Tribolium castaneum*

*Tribolium castaneum* représentent une partie très importante des ravageurs de denrées stockées (Syed Shayfur et al., 2007). Ce ravageur a été introduit accidentellement en Afrique (Ngamo et Hance, 2007). La capacité de cette espèce à trouver sa nourriture, à coloniser le milieu infesté et son aptitude à persister dans de petites quantités d'aliment, lui attribuent son statut de ravageur. Bien que ce dernier soit secondaire, requérant une infestation préalable par des ravageurs primaires, il peut facilement infester le blé ou d'autres graines endommagées durant la récolte (Farrell, 2010). Selon un rapport de la FAO (1976 in Delobel et Tran, 1993),

il s'agit de l'un des deux insectes les plus nuisibles aux produits céréaliers usinés.

### V.1.1. Caractères généraux des Ténébrionidés

Les ténébrionidés sont des coléoptères de taille comprise entre 2 mm et 80 mm, de forme très variée, à téguments le plus souvent rigides, épais, noirs mat ou luisant, de teinte sombre, coloré ou « métalliques » par interférence, avec des yeux généralement grands, ovales ou ronds chez certaines sous-familles. Les antennes sont composées de 11 articles, plus rarement 10. Ils sont aptères ou ailés. Ils présentent une nervation alaire du type primitif. Ils possèdent 5 sternites abdominaux, les pattes sont longues ou tout au contraire contractées, souvent elles sont fouisseuses. Certains ténébrionidés ont été signalés comme nuisibles sur les plantes cultivées, d'autres s'attaquent aux denrées alimentaires stockées ou emmagasinées. Parmi ces dernières, le genre *Tribolium* comprend deux espèces principales espèces cosmopolites et nuisibles : *T. castaneum* *Herbst.* Et *T. confusum* *Duv.*

### V.1.2. Etude du genre *Tribolium*

Les *Tribolium* sont de petits coléoptères allongés et parallèles de couleur brun-rouge. La tête semi-circulaire est large plate à son bord antérieur, aplatie en une sorte de chaperon qui couvre les pièces buccales et échancre les yeux sur près de la moitié de leurs surfaces.

A l'état d'imago, ils ont une longueur de 4 mm, sont peu actifs et fuient la lumière. Il existe plusieurs espèces mais deux seulement présentent un intérêt primordial en raison de leur fréquence dans les denrées amylacées. Il s'agit de *Tribolium confusum* *DUV* décrit sous ce nom pour la première fois en 1798 par *HERBST.* et *Tribolium castaneum* *Herbst.*

Les deux espèces, très semblables d'aspect et de taille identiques, se distinguent par la forme de leurs antennes. Chez *T. confusum* *DUV.* Les antennes vont en s'élargissant régulièrement de la base au sommet, tandis que chez *T. castaneum* *HERBST.*, les trois derniers articles sont nettement plus gros et forment une sorte de massue (**Lepesme, 1944**). De plus, chez *T. confusum* le bord interne des yeux est surmonté par une crête saillante en une sorte d'arcade, ce qui n'est pas le cas chez *T. castaneum* *Herbst.*

Il vole parfois sur de courtes distances mais *T. confusum* *DUV* n'a jamais été observé en vol, bien que pourvu d'ailes normalement développées.

### V.1.3. Position systématique

Selon **Lepesme (1944)** *Tribolium castaneum* appartient :

- ✓ Règne : Animalia
- ✓ Sous règne : Metazoa
- ✓ Embranchement : Arthropoda
- ✓ Classe : Insecta

- ✓ **Ordre** : Coleoptera
- ✓ **Sous ordre** : Polyphaga
- ✓ **Famille** : Tenebrionidae
- ✓ **Sous famille** : Ulominae
- ✓ **Genre** : Tribolium
- ✓ **Espèce** : *Tribolium castaneum*.

#### **V.1.4. Origine et distribution géographique**

L'origine de cette espèce est à chercher vraisemblablement en Afrique. C'est un ravageur doté d'une grande faculté d'adaptation et présente actuellement une distribution cosmopolite. Il est plus fréquent sous les climats chauds notamment les tropiques (**Delobel et Tran, 1993**).

*Tribolium castaneum* est retrouvé sous les écorces des arbres ou sous les branches en décomposition. Par la suite il a pu infester les structures anthropogéniques utilisées dans les processus d'entreposage des denrées alimentaires.

#### **V.1.5. Description morphologique des différents stades du *Tribolium castaneum***

Dans la farine infestée, les larves, pupes et adultes sont visibles, à cause de leur taille. Cependant les œufs sont difficilement reconnaissables, particulièrement à l'œil nu car les particules de la farine, adhérant aux œufs, rendent leur identification plus ardue (**Leelaja et al., 2007**).

##### **V.1.5.1. L'adulte**

*Tribolium castaneum* est un petit coléoptère de couleur brun rougeâtre mesurant 3-4 mm de long, son corps est lisse et allongé. Les antennes se terminent par une massue nettement distincte (**Fig. 12 A**). Il se distingue des autres tribolium par la partie ventrale des yeux qui est large et qui sont relativement rapprochés. Les élytres présentent des lignes longitudinales pointillées. C'est un insecte caractérisé par un dimorphisme sexuel ; le male se distingue de la femelle par la présence d'un tubercule pilifère arrondi à la base du fémur antérieur (**Delobel et Tran, 1993**).

##### **V.1.5.2. L'œuf**

Les œufs du vers de farine sont blanchâtres ou transparents, avec des particules alimentaires adhérentes à leur surface. Ils mesurent 0,61 mm à 0,77 mm de long et 0,35mm à 0,4 mm de large. Ils sont fluorescents sous des longueurs d'onde de 365 nm (radiations ultraviolettes) (**Fig.12. A**) (**Leelaja et al., 2007**).

##### **V.1.5.3. La larve**

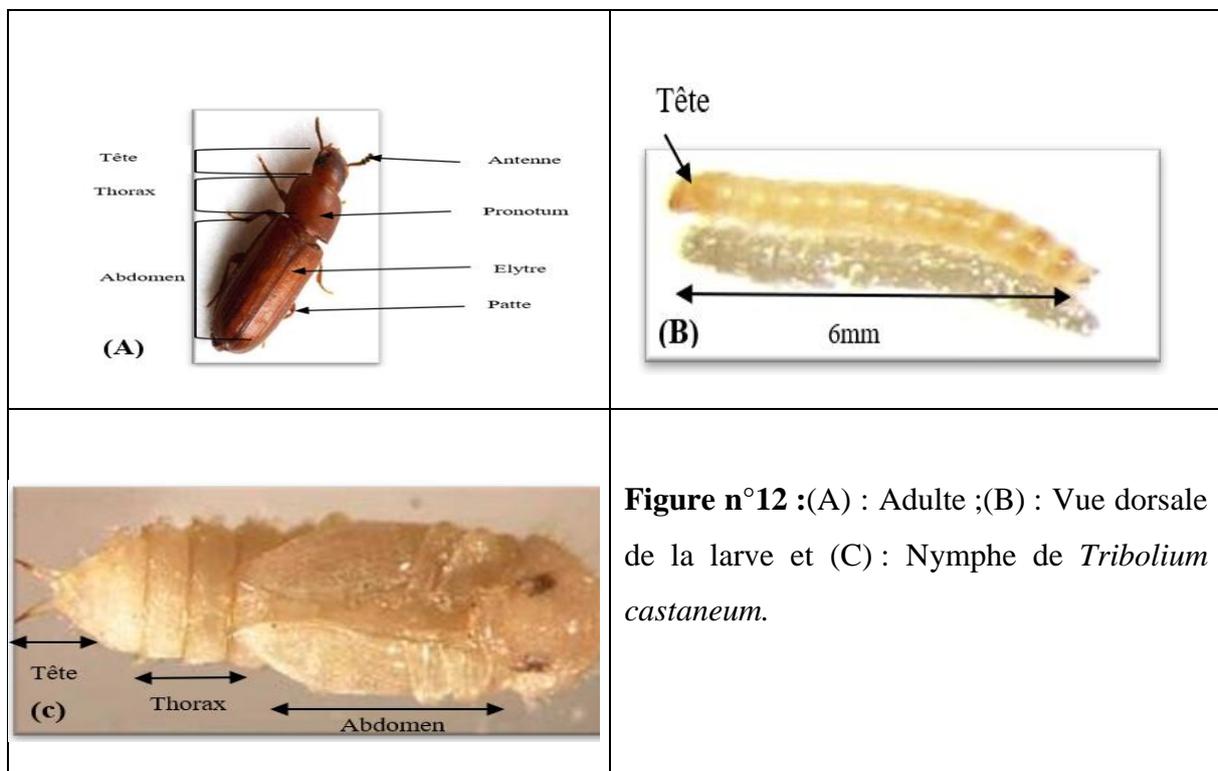
Elle est huit fois plus longue que large, pouvant atteindre 6 mm de long à son plein

développement et portant trois paires de pattes. Elle est vermiforme, cylindrique, d'une couleur jaune très pale à maturité. La tête est brunâtre ornée latéralement de courtes soies jaunâtres.

La larve se distingue par une rangée dorsale de courtes soies à la base du dernier segment abdominal et d'une paire d'urogomphes recourbée vers le haut, dans un plan perpendiculaire à celui du corps (**Fig. 12 B**) (**Delobel et Tran, 1993**).

#### V.1.5.4. La nymphe

Elle mesure 5mm de long, nue, de couleur blanchâtre, devenant progressivement brun pale (**Fig.12C**). Les nymphes femelles se reconnaissent des nymphes males par les papilles génitales, situées juste en avant des urogomphes, qui sont nettement plus développées chez les femelles que chez les males (**Sokoloff, 1974**).



**Figure n°12** :(A) : Adulte ;(B) : Vue dorsale de la larve et (C) : Nymphe de *Tribolium castaneum*.

#### V.1.6. Biologie et cycle de développement

C'est une espèce très prolifique ; au cours de leur vie, les femelles peuvent pondre plus de 1000 œufs (2 à 10 œufs/jour) directement dans le substrat alimentaires (**Rees, 2004**). Entre 3 et 12 jours post-oviposition, les œufs vont éclore en petites larves actives, qui restent généralement cachées à l'intérieur de l'aliment, loin de la lumière (**Mason, 2003**).

Elles se nourrissent dans le milieu, subissant 5 à 11 mues (fonction des conditions individuelles, environnementales et la disponibilité de source d'alimentation) avant de se métamorphoser en une nymphe nue. La durée du stade larvaire varie de 22 à plus de 100 jours selon la température ambiante.

Le stade nymphal dure huit jours, après cela les imagos vont émerger. Les premiers accouplements auront lieu après deux jours de l'émergence des imagos et dureront 3 à 15 minutes. Leur longévité peut atteindre près de 3 mois (**Mason, 2003**).

La durée du cycle complet varie généralement entre 7 semaines à 3 mois. La température favorisant le développement de ces insectes est de 20 à 37°C avec 60 à 80 % d'humidité relative. Dans ces conditions, la durée d'une génération peut être de 27 à 35 jours.

*Tribolium castaneum* ne se développe pas en dessous de 18°C. A une humidité relative de 10% le développement de cette espèce peut se faire à 25-28°C et il est impossible à hautes températures 35°-38°C (**Delobel et Tran, 1993**).

## **V.2. Ethologie de *Tribolium castaneum***

### **V.2.1. Mobilité**

*Tribolium castaneum* est un insecte qui se déplace rapidement lorsqu'il est dérangé. L'adulte est un très bon voilier ; son vol devient primordial quand l'alimentation est rare ou détériorée. Il se déplace de préférence en fin d'après-midi, par temps chaud et calme, migre à partir de stocks infestés à la recherche de nouvelles sources alimentaires permettant l'oviposition et le développement larvaire. Les adultes peuvent voler 48h après leur émergence, les femelles nouvellement émergées (2 à 10 jours) ont tendance à voler plus que les jeunes males, qui préfèrent rester dans le substrat pour s'accoupler (**Perez- Mendoza et al., 2007**).

### **V.2.2. Régime alimentaire de *Tribolium castaneum***

Le *Tribolium* rouge de la farine est un insecte, psychophage, mycophage et occasionnellement nécrophage et prédateur d'autres insectes. Il a pu être observé dans les pourritures et sous les écorces d'arbres (**Alabi et al., 2008**).

Au niveau des minoteries, des usines alimentaires, des boulangeries et des habitations, les adultes et les larves se nourrissent de farines de céréales et autres produits de mouture. Ils sont incapables de perforer les grains ; seul le germe est consommé la plupart du temps (**Delobel et Tran, 1993**). D'autres produits, pâtes, pois, haricots, noix, épices, chocolat, résidus de pressage de l'huile et graines oléagineuses peuvent être infestés par les triboliums.

## **V.3. Les ennemis naturels de *Tribolium castaneum***

Certains arthropodes particulièrement les acariens, tel que *Pediculoides vebtricosus* (*Nemp*), *Acarophenax tribolu* (*Nemp*) tendent à limiter l'activité de tribolium ; deux hyménoptères de la famille des bethylides *Rhabdepyris zea* (*Turu et Waters*) *Sleroderma immigrans* (*Bridw*) parasitent les larves (**Benazzeddine, 2010**).

#### V.4. Pertes et dégâts

Les céréales et les légumineuses constituent la base de la nourriture des populations (**Guey et al., 2011**). Depuis que les grains sont stockés par l'homme, le problème de leur conservation est posé. Il consiste à mettre hors d'atteinte des intempéries, des prédateurs et des parasites, des masses de grains plus ou moins importantes pour des durées variables. Les agressions d'origines biologiques sont dues à des êtres vivants (rongeurs, oiseaux, insectes, acariens et microorganismes). Ce sont les insectes et les acariens, qui causent le plus de dégâts aux denrées stockées. Les dégâts causés par l'infestation d'insecte pendant le stockage sont un problème grave, près de 20 à 25% des grains alimentaires sont endommagés par des insectes nuisibles (**Jacobson, 1989**).

Les insectes ravageurs des denrées stockées, majoritairement des coléoptères, peuvent causer non seulement une réduction des graines mais également une diminution de la qualité des graines et de la viabilité des semences, compromettant leur consommation et leur semis. Ces pertes interviennent à tous les stades, de la récolte à la consommation et plus de 30% de la production est perdue (**Alzouma, 1995 ; Ngamo et Hance, 2007**). Cette proportion est plus forte en région sahélienne du fait de la longue période de stockage (**Ngamo et Hance, 2007**). Si aucune protection n'est faite après sept mois de stockage, la perte des denrées peut être totale.

De plus, l'humidité issue du métabolisme de leurs pullulations et les produits d'excrétion azotée favorise l'apparition de moisissures dans les lieux de stockage. Le tribolium recherche surtout les denrées amylacées pulvérulentes comme la farine, le son, etc. (**Lepesm, 1944**). Ce parasite infeste aussi le riz, le maïs, le sorgho, le millet, les légumineuses, le manioc et la farine de manioc et l'igname. Les adultes et larves se nourrissent surtout des brisures ; ils attaquent les grains endommagés et affectionnent les germes des grains (**Robiche et al., 2002**). Les adultes, mais aussi les larves, se nourrissent tout d'abord du germe puis de l'entreposage ce qui permet aux insectes de proliférer, cela entraîne une augmentation de la température dans l'entrepôt, favorisant davantage la prolifération des parasites.

#### V.5. Stratégies et moyens de lutte

La protection des céréales stockées contre les attaques d'insectes et d'acariens soulève des problèmes variés et elle doit faire appel à un ensemble de techniques différentes qu'il est nécessaire d'appliquer à bon escient. Le souci majeur d'un stockeur est de garder son stock de céréale intact. Un ensemble de mesure préventive et curative doivent être prises. Il s'agit de toutes techniques destinées à réduire l'infestation au champ, au début du stockage ainsi que pendant le stockage.

### V.5.1. Méthodes traditionnelles

Diverses méthodes traditionnelles ont été répertoriées dont le ramassage des graines à un stade phénologique précoce, une récolte régulière des gousses dès leur maturité, et une association du niébé avec l'arachide ou une céréale lors des cultures. Un séchage (usage de la fumée, séchage au soleil) préalable au stockage devient nécessaire jusqu'à l'obtention d'un taux d'humidité des graines de l'ordre de 13%. La fumée et la chaleur s'avèrent-renfermer une action physique quelque peu répulsive voire même insecticide. Un tri de la récolte avant le stockage est nécessaire ; Le paysan choisit les graines indemnes pour réduire l'infestation initiale. Un nettoyage, soigneusement entrepris, des locaux de stockage, des sacs en jute, et de tous les moyens utilisés pour le transport ou la manutention des graines est indispensable. Le stockage hermétique est de plus en plus pratiqué en milieu rural (**Seck et Gaspard, 1992**).

✓ Un stockage dans des récipients en argile séchée ou dans des fûts métalliques qui doivent être remplis au maximum de manière à limiter le volume d'oxygène dans ces enceintes ou dans des sacs en plastique est recommandé. Les sacs en polypropylène ayant une doublure en coton ont donné des résultats satisfaisants (**Caswell et Vanhuis, 1991 in Lienard et Seck, 1994**).

✓ Un mélange aux graines de substances minérales pulvérulentes (cendres, chaux, sable, silice, ...) peut les préserver d'infestation par les insectes. C'est un procédé très ancien et universel. Ces substances pulvérulentes ont pour effet de rayer la cuticule et de blesser les articulations qui gêneraient les déplacements et la respiration des insectes. La cendre constitue une barrière physique qui empêcherait l'entrée des adultes dans la graine des stocks, diminuerait leur oviposition et réduirait leurs émergences (**Kossou et Aho, 1993 ; Lienard et Seck, 1994**).

### V.5.2. La lutte chimique

Pour combattre les insectes ravageurs des cultures et des stocks de récoltes, les paysans recourent souvent à la lutte chimique, qui représente pour eux la méthode de protection la plus efficace pour sauvegarder leurs productions. Au-delà du fait qu'elle soit onéreuse, cette méthode présente et génère de nombreux inconvénients à court et à long terme (**Seck et al., 1991 ; Gueye et al., 2011**). Un mauvais usage de ces produits de synthèse conduit à la fois à de graves conséquences sanitaires pour l'utilisateur, le consommateur et ainsi qu'à la pollution de l'environnement et à des désordres écologiques (**Regnault-Roger et al., 2002; Ngamo et Hance, 2007; Toumnou et al., 2012; Adjalian et al., 2014; Kayombo et al., 2014**).

L'usage intensif et répété des produits chimiques non appropriés a provoqué l'apparition du phénomène de résistance chez de nombreux ravageurs (**Kumar, 1991**). Ce phénomène de résistance, outre de compromettre l'efficacité des mesures de lutte, peut avoir des séquelles

préoccupantes sur les plans économiques et sanitaires, mais également écologiques, par l'accroissement des doses d'insecticides utilisées.

Les insecticides utilisés affectent également les populations d'ennemis naturels qui sont des organismes utiles. Des études approfondies effectuées sur l'influence des insecticides sur les ennemis naturels des ravageurs démontrent clairement que ces derniers perturbent sérieusement la relation ravageurs-ennemis naturels, dont la conséquence est non seulement la résurgence du ravageur, mais encore plus sa pullulation (**Kumar, 1991 ; Ilboudo, 2009**). Deux principaux genres de produits chimiques sont utilisés pour la conservation des stocks de graines, il s'agit des insecticides de contact et des fumigants.

Les insecticides de contact sont des produits pénétrant les tissus de l'insecte après avoir traversé la cuticule. Les familles d'insecticides les plus utilisées dans les zones de culture sont les organophosphorés et les organochlorés suivis par les pyréthrinoïdes et les carbamates (**Ngamo, 2004**).

Les fumigants sont des insecticides à haute tension de vapeur qui agissent sous forme gazeuse. Ces composés très toxiques pour l'homme et les animaux sont soumis lors de leur application à des normes de sécurité très strictes. Par rapport aux insecticides de contact, ils possèdent l'avantage de ne laisser aucun résidu sur les denrées. La fumigation est un traitement purement curatif. Une fois réalisée, le stock n'est plus protégé contre de nouvelles infestations. Dans les pays chauds, la phosphine (**PH<sub>3</sub>**) est le fumigant le plus couramment utilisé (**Howe, 1978; Hindmarsh et al., 1978**). Certains de ces fumigants comme le bromure de méthyle, ont fait l'objet d'une interdiction aux Etats-Unis, depuis 2005, en raison de leur nuisance sur la couche d'ozone (**Pizano, 2014**).

Compte tenu des effets néfastes de l'utilisation des produits de synthèse sur la santé humaine et de l'inefficacité de la plupart des méthodes traditionnelles, d'autres voies de protection des récoltes doivent être exploitées. Des voies qui doivent être non seulement moins onéreuses mais surtout plus rassurantes sur la santé humaine et sur l'environnement. Parmi ces nouvelles alternatives figurent la lutte biologique

### **V.5.3. Lutte biologique**

La lutte biologique ou « biological control » est l'utilisation et la gestion par l'homme d'ennemis naturels tels que les prédateurs, les parasitoïdes ou des agents pathogènes pour contrôler les populations d'espèces nuisibles et les maintenir à des seuils de nuisibilité acceptables et admissibles. Quand l'ennemi utilisé est un insecte, il s'agit d'une lutte à l'aide d'entomophages qui peuvent être des prédateurs ou des parasitoïdes. Par contre, si l'ennemi est

un microorganisme, il s'agit d'une lutte microbiologique. En effet, des micro-organismes entomopathogènes (bactéries, champignons, nématodes, protozoaires et virus) sont également introduits dans la lutte biologique (Dajoz, 1982). *Bacillus thuringiensis* est l'espèce bactérienne la plus largement utilisée pour la lutte biologique, avec au moins quatre sous-espèces utilisées pour contrôler les insectes nuisibles tels que les coléoptères, les lépidoptères, et les diptères.

#### V.5.4. Lutte physique

**Irradiation gamma :** Le principe de l'irradiation gamma repose sur l'exposition des populations d'insectes, soit à des doses élevées d'irradiation pour tuer tous les stades de développement de l'insecte, soit à des doses plus faibles pour les stériliser (Elbadry et Ahmed, 1975 ; Hekal et El-Kady, 1987).

**Atmosphère contrôlée :** L'enrichissement de l'atmosphère par l'azote (N<sub>2</sub>) ou par le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) fait chuter la teneur en oxygène et ainsi asphyxie de l'insecte.

#### V.5.5. Lutte par l'utilisation des plantes

L'utilisation des plantes est un moyen de lutte qui fait l'objet de recherches de plus en plus poussées (Huang, et al., 1999). Depuis quelques décennies, l'homme s'est intéressé à leurs activités biologiques, en particulier celles de leurs composés secondaires considérés comme étant des substances pouvant être utilisées contre les pathogènes et les ravageurs. Les agriculteurs avaient d'ailleurs coutume de mettre dans les sacs de grains des plantes odorantes comme la menthe, l'ail, le laurier, etc... pour protéger leurs stocks contre les insectes. Ces végétaux possèdent une action insecticide ou répulsive via des composés volatiles qu'ils émettent. L'utilisation de ces substances végétales en tant que biopesticides dans la protection des graines de légumineuses a été pratiquée sous plusieurs formes : poudres de plantes, extraits aqueux, huiles essentielles et huiles végétales.

**1. Les poudres des plantes :** Un nombre important de plantes a été testé sous forme de poudre et ont montré une action anti appétante ou répulsive vis-à-vis de plusieurs insectes ravageurs des denrées stockées. Ces poudres peuvent provenir de différents organes (feuilles, écorces, graines, fruits, etc...) de plantes séchées (Gwinner et al., 1996 ; Suleiman et Yusuf, 2011).

**2. Les extraits aqueux :** C'est une méthode de conservation couramment utilisée par les fermiers africains qui réalisent un trempage des feuilles de plantes dans l'eau pour obtenir une solution à effet insecticide (Gakuru et Fouabi, 1996). Selon Regnault-Roger et Hamraoui (1997), les plantes les plus efficaces appartiennent à la famille des Lamiaceae. Les principaux extraits aqueux d'origine végétale utilisés contre les ravageurs des grains stockés sont les extraits de pyrèthre (Asteraceae), de neem (Melicaceae), de poivron (Solanaceae) et les racines d'Annona (Annonaceae) (Gwinner et al., 1996).

**3. Les huiles végétales** : Les huiles végétales ont très tôt été utilisées dans la lutte contre les insectes sous forme d'émulsion. Ce sont à la fois des insecticides de contact qui agissent par leurs propriétés physiques et chimiques et des adjuvants pour leurs molécules liposolubles et synergiques dans certains cas (**Regnault-Roger et al., 2002**).

**4. Les huiles essentielles** : Elles constituent un mélange très complexe de monoterpénoïdes, de sesquiterpénoïdes et de phénols bio-génétiquement connexes qui confèrent aux plantes un arôme et une saveur uniques (**Isman, 2000**). Peu à peu, elles ont constitué un remarquable outil de défense contre les insectes nuisibles en général et ceux des denrées stockées en particulier (**Keita et al., 2001**). Les plantes insecticides, à travers notamment leur huile essentielle, peuvent limiter la dépendance des paysans aux insecticides chimiques de synthèse. L'analyse chromatographique de quelques huiles essentielles révèle qu'elles renferment majoritairement des monoterpènes hydrocarbonés, composés volatiles qui leur allouent des propriétés insecticides. La toxicité de nombreuses huiles essentielles et de leurs constituants a été appréciée sur de nombreux ravageurs des graines. Ainsi, les huiles essentielles de *Laurus nobilis* (Lauraceae), d'*Origanum glandulosum* (Lamiaceae), de *Clausena anisata* (Rutaceae), de *Salvia verbenaca* (Lamiaceae), d'*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) ont montré une activité insecticide à l'égard de *Rhyzopertha dominica*, de *Tribolium castaneum*, de *Bruchus rufimanus*, de *Callosobruchus chinensis* et de *C. maculatus* (**Ndomo et Ngamo, 2008 ; Kellouche et al., 2010 ; Mediouni-Benjema et al., 2012 ; Righi et al., 2014**). Les biopesticides à base d'huiles essentielles présentent plusieurs caractéristiques d'intérêt : Ils ont une efficacité à large spectre, mais avec une spécificité pour certaines classes d'arthropodes ou ordres d'insectes ; ils sont très peu rémanents et peuvent donc être appliqués jusqu'au moment de la récolte. Cette faible rémanence permet également aux travailleurs de retourner au champ ou dans une serre dans un court délai après le traitement. De plus, les formulations de biopesticides à base d'huile essentielle sont stables à la température ambiante et peuvent être entreposées pendant plusieurs années.

## V.6. Effet des huiles essentielles sur les insectes

Les plantes aromatiques sont parmi les insecticides les plus efficaces d'origine botanique et les huiles essentielles constituent souvent la fraction bioactive des extraits de plantes. Ce sont des produits qui ne laissent pas de résidus toxiques. Les huiles essentielles ont des effets anti-appétant, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens. Il y a eu également inhibition complète de la pénétration des larves dans les graines traitées au linalool et au thymol. De plus, le thymol s'est avéré inhibiteur de l'émergence des adultes (**Regnault-Roger et Hamraoui, 1995**).

L'octopamine est un neuromodulateur spécifique des invertébrés : cette molécule a un effet régulateur sur les battements de cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés. **Enan (2000) et Isman (2000)** font le lien entre l'application d'eugénol, d' $\alpha$ -terpinéol et d'alcool cinnamique, sur le blocage des sites accepteurs de l'octopamine. En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des arthropodes. Ces huiles sont donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud.

Les huiles essentielles riches en monoterpènes causent la mort des insectes par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux (**Houghton et al., 2006**). Elles agissent directement sur la cuticule des arthropodes à corps mou (**Isman, 2000**). La nature lipophile de l'huile essentielle peut dégrader la couche cireuse de la cuticule, des trachées et des sacs d'air des insectes et causer des pertes en eau et peut entraîner l'asphyxie. L'huile essentielle de *Thymus persicus* et certaines plantes de la famille de Zingiberaceae possède un effet répulsif et toxique vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* et *Tribolium castaneum* (**Moharramipour et al., 2008; Suthisut et al., 2011**).

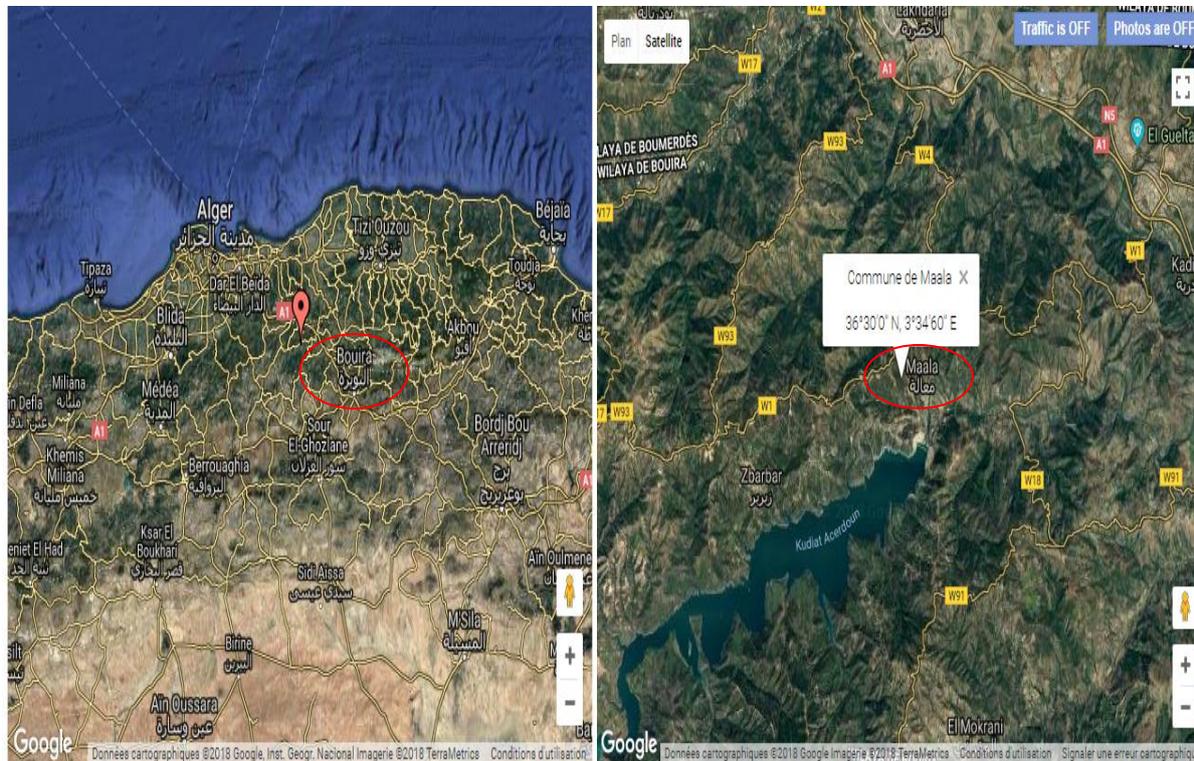
## **Partie 2: Etude expérimentale**

# **Chapitre I : Matériel et méthodes**

## I.1. Matériel biologique

### I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé comprend les branches, les feuilles, les fruits rouges (non murs) et les fruits noirs (mûrs) de *P. lentiscus* (L.) récoltés dans son habitat naturel au niveau de la région de Bouira (Fig. 13).



**Figure n° 13:** Carte géographique de la région de Bouira (Maala).

Les feuilles et les branches ont été récoltées au mois d'Avril 2014, les fruits rouges en octobre 2014 et les fruits noirs en décembre 2014. L'identification de l'espèce a été réalisée en se basant sur la flore de **Quezel et Santa, (1962-1963)** et validée par des enseignants du Département de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA).

Toutes les parties de la plante ont été nettoyées à l'eau et séchées à l'obscurité pendant une quinzaine de jours, dans un endroit sec et aéré, puis broyées finement à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre végétale qui est conservée à température ambiante dans des sacs en papier.

### I.1.2. Matériel microbiologique

Les souches de la collection du CRD-SAIDAL, ont été choisies pour leur fréquence élevée de contamination. Ce sont des lots de « American Type Culture Collection » ATCC ; (Tab. 1).

**Tableau n°1** : Souches utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne.

**TSA**: (Tryptic Soy Agar): Milieu favorable au développement des bactéries (repiquages des souches), **Muller-Hinton**: Milieu favorable à la croissance des bactéries, **Sabouraud** : Milieu connu comme étant favorable au développement des levures.

	Les souches	Familles	N. ATCC	Milieu de culture
<b>Bactéries</b>	Gram <sup>+</sup> <i>Staphylococcus aureus</i>	Micrococcaceae	6538	<b>Muller –Hinton</b>
	Gram <sup>-</sup> <i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	8739	
	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	650614	
<b>Levures</b>	/ <i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcaceae</i>	10231	<b>Sabouraud</b>

**I.1.3. Matériel entomologique**

L'élevage de *Tribolium castaneum* a été réalisé au niveau du département de Technologie Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Dans une étuve obscure réglée à une température de 30°C ± 0,5° C et une humidité relative de 70 ± 5%, 20 adultes sont placés dans des bocaux en verre d'une capacité de 1L contenant 250 g de farine commerciale et 5 g de levure boulangère placées au préalable au congélateur pendant 24 h afin de détruire les œufs et larves des insectes éventuellement présents.

**I.2. Détermination du taux d'humidité**

La détermination du taux d'humidité des différentes parties fraîches et sèches de *P. lentiscus* (L.), a été réalisée en utilisant un humidimètre à infrarouge de type SARTORIUS MA du laboratoire.

**I.3. Screening phytochimique**

L'examen phytochimique est un premier pas dans la recherche des nouvelles molécules d'origine végétale ayant des activités biologiques et thérapeutiques. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilités des constituants présents dans la plante vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente et des réactions de coloration spécifique et de précipitation.

**I.3.1. Etude qualitative des substances extraites à l'eau à chaude**

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 50g du matériel végétal est mis en présence de 300 mL d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est ensuite filtré et l'extrait aqueux est soumis à différents tests qualitatifs pour la mise en évidence de :

- ✓ **Amidon** : Chauffer dans un bain marie jusqu'à l'ébullition, 5mL de la solution à tester avec 10mL d'une solution de NaCl saturée. Ajouter quelques gouttes du réactif de l'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée (**Bruneton, 1999**).
- ✓ **Saponines** : La détection des saponines est réalisée en ajoutant 10mL d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux. La solution est ensuite fortement agitée et le mélange est mis à incuber pendant 20 min à l'air libre. L'apparition d'une mousse indique la présence de saponines (**Trease et Evans, 1987**).
- ✓ **Tannins** : La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de l'extrait aqueux, 1mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> à 1%. L'apparition d'une coloration verte indique la présence de tanins (**Trease et Evans, 1987**).
- ✓ **Mucilage** : A 1 mL de la solution aqueuse sont ajoutées 5 mL d'alcool absolu. La présence de mucilage est détectée par l'apparition d'un précipité floconneux.
- ✓ **Leucoanthocyanes** : A 2 mL d'une solution aqueuse, additionner respectivement 1 mL de NaOH, 1mL d'eau distillée et 1mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) et quelques copeaux de magnésium. En présence de leucoanthocyanes, une coloration rose-rouge apparaît.
- ✓ **Caroténoïdes** : A une solution aqueuse de 1mL, 3 mL d'acide chlorhydrique (d'HCl) et 3 mL d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sont ajoutés. L'apparition d'une coloration vert bleu témoigne de la présence des caroténoïdes (**Études rwandaises, 1977**).
- ✓ **Anthocyanes** : Leur présence est révélée en traitant 2 mL d'une solution aqueuse avec 2 mL de HCl (2N) et quelques gouttes de NH<sub>4</sub> OH. Une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé indiquent la présence des anthocyanes (**Debrayb et al., 1971 ; Paris et al.,1969**).

### I.3.2. Etude qualitative des substances extraites à l'éthanol

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 50g de matériel végétal est mis en présence de 300 mL d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est ensuite filtré et l'extrait éthanolique est utilisé pour la mise en évidence de :

- ✓ **Flavonoïdes** : La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 mL de l'extrait éthanolique avec 1 mL de HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence par l'apparition d'une couleur rose ou rouge après 3min (**Earnsworth, 1974**).
- ✓ **Tannins galliques et cathéchiqes** : La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de l'extrait éthanolique, 2mL d'eau et 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1%. En présence de tannins, une coloration bleu-noire (tannins galliques) verte ou bleue verte (tannins cathéchiqes) apparaît (**Trease et Evans, 1987**).

- ✓ **Composés phénoliques** : La réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) permet de caractériser les polyphénols. A 2 mL de l'extrait éthanolique, une goutte de solution aqueuse de chlorure ferrique à 5% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique la présence de polyphénols (**Koffi et al, 2009**).
- ✓ **Terpénoïdes (Test de Salkowski)** : A 0,5g d'extrait sont ajoutés 2 mL de chloroforme et 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Une coloration brun rougeâtre de l'interface indique la présence des terpénoïdes.
- ✓ **Stéroïdes et triterpénoïdes (Test de Liebermann-Burchard)** : 1mL d'extrait éthanolique est concentré dans une étuve à  $60^\circ\text{C}$ . Le résidu sec ainsi obtenu est solubilisé dans 1mL d'anhydride acétique ; quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont ensuite ajoutées. L'apparition d'une coloration bleu vert indique la présence de triterpénoïdes et de stéroïdes (**Trease et Evans, 1987**).
- ✓ **Composés réducteurs** : Leur détection consiste à chauffer 1mL de l'extrait éthanolique avec 10 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans,1987**)
- ✓ **Phlobotannins** : Dans un tube à essais propre sont ajoutés successivement, 2 mL d'extrait éthanolique et 3 mL d'acide chlorhydrique ; le tube est chauffé au BM à  $80^\circ\text{C}$  pendant environ 10 minutes. L'apparition d'une coloration verte rougeâtre indique la présence de phlobotannins.
- ✓ **Protéines** : A 1 mL d'extrait éthanolique sont ajoutés 4 mL du réactif de Folin ; une coloration bleue indique la présence des protéines.
- ✓ **Glycosides** : Dans un tube à essais propre sont ajoutés successivement 2 mL d'extrait éthanolique et 2 mL d'acide sulfurique ; l'ensemble est mis à bouillir pendant 5 minutes et filtré. Un volume de chloroforme est ajouté au filtrat. Après avoir bien mélanger, deux couches apparaissent ; la couche organique est prélevée en présence d'ammoniac, une coloration rouge rosée indique la présence de glycosides d'antraquinone dans la couche organique
- ✓ **Quinones** : 1 mL d'extrait est traité par quelques gouttes d'une solution de soude à 10%. L'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones (**Oloyede, 2005**).
- ✓ **Huiles essentielles** : 2mL d'extrait sont mélangés avec 0,1 mL d'une solution de  $\text{NaOH}$  (0.1 %) et quelques gouttes d' $\text{HCl}$  (35-37%) diluée. Un précipité blanc indique la présence des huiles essentielles.

### **I.3.3. Etude qualitative des substances extraites à l'acide sulfurique**

10 g de la poudre végétale sont macérés sous agitation et à température ambiante dans 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) dilué (1/10). Le macérât est filtré, et le papier filtre est lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 mL de filtrat. L'extrait acide est utilisé pour la détection des alcaloïdes.

✓ A 1 mL de filtrat sont ajoutés 5 gouttes du réactif de Meyer. En présence d'alcaloïdes un précipité blanc-jaunâtre apparaît.

✓ A 1 mL de filtrat sont ajoutés 5 gouttes du réactif de Wagner. En présence d'alcaloïdes un précipité brun apparaît (**Paris et al., 1969**).

### **I.4. Elaboration des coupes histologiques**

La localisation des organes producteurs des huiles essentielles des différents organes de *P. lentiscus* (L.) permet d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de son extraction. Les coupes ont été préparées au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Des coupes transversales à main levée sont effectuées sur les branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs et sont ensuite colorées.

La coloration des coupes nécessite le passage dans différents bains. Elles sont tout d'abord placées dans bain d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel à 12°) pendant 20 minutes pour vider les cellules de leur contenu. Elles sont ensuite plongées dans un bain d'eau distillée pendant 1 à 5 mn pour rincer l'eau de javel. Par la suite, les coupes sont passées dans une solution d'acide acétique à 5% pendant 5 mn afin de faciliter la coloration des parois. Puis elles sont-plongées dans un autre bain à eau distillée pendant 1 minute pour le rinçage. Pour différencier les parois celluloseux (rose) des parties lignifiées (vert), les coupes sont trempées dans un bain contenant un colorant (Carmino-vert) pendant 1 minute puis elles sont mises dans un bain d'eau. Les coupes sont finalement disposées entre lame et lamelle et observées à l'aide d'un microscope et les meilleures coupes sont photographiées.

### **I.5. Extraction des composés du métabolisme secondaire**

#### **I.5.1. Extraction de l'huile essentielle des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) par la méthode d'hydrodistillation assistée par ultrasons**

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée sur la matière sèche des parties aérienne de *P. lentiscus* L. (feuilles+ branches), fruits rouges et fruits noirs séparément au laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique par la technique d'hydrodistillation au moyen d'un appareil de type Clevenger.

### I.5.1.1. Prétraitement dans un bain à ultrason

Un prétraitement dans un bain ultrason a été utilisé avant l'extraction par hydro distillation. Les prétraitements par ultrasons ont été réalisés sur les feuilles avec branches, les fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) préalablement broyés et mélangé à de l'eau afin d'amplifier l'effet du traitement. 100 g de matière végétale, ont été introduits dans 4 béchers à raison de 25g de poudre végétale par bécher, tout en ajoutant une faible quantité d'eau distillée (20 mL). Ces préparations sont déposées dans un bain à ultrason de type (Transonic TI-H Fisher bioblock). Le traitement a été effectué à une fréquence de 25 KHz, à trois puissances différentes qui sont respectivement de 20, 40 et 60 w pendant 15 min. Les macéras sont ensuite réunis puis transvasés dans un ballon de 2L. L'addition de l'eau distillée a respecté un rapport matériel végétal /eau de 1/4, 1/8 et 1/12.

### I.5.1.2. Extraction par hydrodistillation standard

L'extraction par hydrodistillation « standard » a été réalisée pendant 30, 60 et 90 minutes à partir du début de l'ébullition. Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter et la phase aqueuse est séparée de la phase organique (phase supérieure) qui constitue l'huile essentielle et qui sera séchée avec du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) afin d'éliminer toutes traces d'eau. L'huile essentielle séchée, séparée du sulfate de sodium par filtration sur de la laine de verre, est conservée à 4°C dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement en vue de son analyse. Le rendement en huile essentielle est évalué à partir de 3 extractions différentes.

### I.5.1.3. Rendement d'extraction

$$\text{Rdt}\% = V_{\text{HE}} / 100 \text{ g de matière végétale sèche}$$

Dans le cadre de notre étude le rendement d'extraction en huiles essentielles est exprimé en volume de l'huile récupérée en mL pour 100g de matière végétale sèche :

Avec :

Rdt%: Rendement en huile essentielle

$V_{\text{HE}}$  : Volume de l'huile essentielle obtenue (mL)

### I.5.1.4. Optimisation du rendement d'extraction par hydrodistillation assistée par ultrasons

Les techniques conventionnelles d'extraction ou d'isolation de composés chimiques de matrices végétales présentent souvent des contraintes telles que les faibles rendements, des temps d'extraction très longs et l'utilisation de grandes quantités de solvants.

Le rendement diminue fortement, quand la charge du matériel végétal augmente et quand on introduit une quantité d'eau trop importante (**Boutejiret, 1990**). Afin d'évaluer les meilleures conditions pour l'extraction de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noir de *P. lentiscus* (L.), trois paramètres ont été étudiés : le temps d'extraction, la puissance de l'ultrason appliquée et le ratio matériel végétal /eau.

#### I.5.1.5. Evaluation des conditions optimales d'extraction

Le plan d'expérience utilisé est un plan composite centré aussi appelé Box-Behnken Design (BBD). Au cours de ce plan, 3 paramètres sont étudiés simultanément : temps d'extraction, puissance des ultrasons appliquée et ratio matière végétale/eau (**Tab. 2**).

Le plan d'expérience et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel statistique Design Expert software (9.0.6.2). La méthodologie des surfaces de réponse permet de modéliser les réponses obtenues et de déterminer l'optimum de chaque paramètre afin de favoriser l'extraction des huiles essentielles des différentes parties de *P. lentiscus* (L.).

Ce plan d'expérience a généré 17 essais pour 3 facteurs, avec 5 répétitions au centre pour évaluer l'erreur expérimentale et réaliser une analyse de la variance du modèle postulé.

**Tableau n°2** : Niveaux des différentes variables indépendantes du processus d'hydrodistillation assistée par ultrasons des feuilles/ les branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) sous la forme codée et non codée.

Variables indépendantes	Niveaux et rangs		
	(-1)	(0)	(+)
Temps d'extraction (A, min)	30	60	90
Puissance de l'ultrason (B, W)	20	40	60
Ratio eau /Matériel végétal (C, g/mL)	1/4	1/8	1/12

Les principaux facteurs qui influent sur l'efficacité d'extraction [temps d'extraction (A, min), puissance ultrasonore appliquée (B, W) et ratio matière végétale /eau (C, g/ mL)], ont été sélectionnés en tant que variables indépendantes qui doivent être optimisés pour l'extraction.

Un modèle polynomial de second degré, qui relie la réponse aux différentes variables indépendantes, est représenté comme suit :

$$Y=b_0+b_1X^1+b_2X^2+b_3X^3+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{23}X_2X_3$$

Les données expérimentales pour prévoir les rendements d'extraction sont représentées à l'aide de cette équation où :

Y est la réponse exprimée en (%),

$b_0, b_{12}...b_{23}$  : sont des coefficients constants des termes linéaires, quadratiques et d'interaction des variables,  $X_1, X_2$  et  $X_3$  sont les variables codées indépendantes.

Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Design Expert software (version 9.0.6.2).

#### **I.5.1.6. Modélisation des surfaces de réponse**

La méthodologie des surfaces de réponse (*MSR :Response Surface Methodology*) a été utilisée pour estimer les effets principaux des facteurs étudiés, temps d'extraction (**A**, min), puissance des ultrasons appliquée (**B**, W) et ratio matériel végétal /eau (**C**, g/ mL,) au cours du processus d'hydro distillation sur le rendement d'extraction en huiles essentielles.

Cette méthodologie vise à déterminer, d'une façon quantitative, les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative (**Goupy, 1999**). Cette méthode est un ensemble d'outils permettant la compréhension et l'exploitation d'objets simplificateurs de la fonction réponse étudiée, plus largement et plus aisément exploitables.

Les surfaces de réponses sont obtenues à l'aide du logiciel design expérimental (9.0.6.2), qui permet de visualiser les effets combinés de deux facteurs sur la réponse. Les surfaces de réponses ont été déterminées pour le rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L) en fonction de deux facteurs (rapport eau /matériel végétal, temps d'extraction), (puissance des ultrasons, temps d'extraction), (rapport eau /matériel végétal, puissance des ultrasons) tout en gardant le troisième facteur à des valeurs constantes.

#### **I.5.1.7. Analyse de la variance**

L'analyse de la variance (ANOVA ou Analysis of Variance) permet de comparer les variances des valeurs calculées par le modèle et les résidus. Cette analyse constitue un test statistique (test de Fisher-Snedecor). Le test de Fisher-Snedecor ( $F_1$ ), si l'équation établit bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse. Ces tests statistiques permettent d'évaluer la qualité du modèle (descriptive et prédictive), sa validation (Analyse de la variance) et la significativité des coefficients (test de Student).

### **I.5.2. Préparation des extraits non volatils des différentes parties de *P. lentiscus* (L.)**

#### **I.5.2.1. Extraction par solvants**

Les extraits ont été obtenus en utilisant la méthode de Soxhlet (l'extraction solide-liquide) au niveau du laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

Quatre solvants ont été utilisés (Le méthanol, éthanol, acétone et l'hexane).

Cette méthode consiste à épuiser la matière végétale à l'aide d'un solvant afin de libérer les composés non volatils présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

Les différents organes de la plante sèche de *P. lentiscus* (L.) sont broyés et réduits en poudre fine afin d'améliorer le rendement des extractions.

20 g de poudre sont placés dans une cartouche en cellulose, puis dans le réservoir du Soxhlet. Le ballon est ensuite rempli avec 250 mL de solvant et l'extracteur est surmonté d'un réfrigérant. A l'aide d'un chauffe ballon, le solvant est porté à ébullition. Le solvant est condensé par le réfrigérant puis tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la substance à extraire. Le réservoir se remplit. Dès que le niveau de solvant est à hauteur du coude, le réservoir se vidange automatiquement. Le solvant et la substance à extraire sont entraînés dans le ballon. L'expérience est répétée jusqu'à ce que le solvant obtenu soit incolore (3h environ). Après l'extraction, le solvant riche en substances extraites, est évaporé à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (Rotavapor). L'extrait non volatil ainsi récupéré est pesé et conservé à 4-6°C jusqu'à son utilisation.

### **I.5.2.2. Extraction par l'eau**

Elle est basée sur la préparation d'une décoction. 10g de la poudre végétale sont introduites dans 150mL d'eau distillée ; l'ensemble est chauffé à reflux pendant 2h. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

### **I.5.2.3. Calcul du rendement d'extraction**

Le taux d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

**P<sub>0</sub>** : poids du ballon vide (g).

**P<sub>1</sub>** : poids du ballon après évaporation du solvant (g).

**E** : poids de l'échantillon (poudre) (g).

## **I.6.Détermination de la teneur en polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par spectrophotométrie selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu décrite par **Singleton et al., (1999)** en utilisant l'acide gallique comme standard. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans les extraits étudiés. Le réactif de Folin-Ciocalteu contient un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de

Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (**Daels-Rakotoarison, 1999**).

0.25 mL d'extrait dissout dans un solvant (Méthanol, Ethanol, eau, acétone et hexane) sont mélangés à 1.25 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes de temps de réaction, 1mL de solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 75g/l) sont ajoutés. L'absorbance est lue à 765 nm après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante.

L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration d'extrait. La même procédure est appliquée au standard acide gallique (0-140 mg. L<sup>-1</sup>).

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Fig.1.Annexe) et sera exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### **I.7.Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux**

La méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) modifiée (**Lamaison et Carnet, 1990**) est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits étudiés. Le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) forme un complexe avec les flavonoïdes dont on dose l'absorbance à 420 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine.

A 1 mL d'extrait dilué dans un solvant (méthanol, éthanol, eau, acétone et hexane) est ajouté 1 mL de chlorure d'aluminium à 10%. Le mélange est ensuite vigoureusement agité. Après 1h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 420 nm. Cette expérience est répétée trois fois. La même procédure est appliquée au standard la quercitrine (0-47 mg. L<sup>-1</sup>).

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine et sera exprimée en mg équivalent quercétine par g d'extrait (mg EQ/g d'extrait) (Fig.2.Annexe).

### **I.8. Caractérisation des huiles des différents organes de *P. lentiscus* (L.)**

La caractérisation d'une essence consiste à vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur), à déterminer ses indices physico-chimiques (densité et indice de réfraction...), à obtenir son profil chromatographique pour une quantification relative des différents constituants.

#### **I.8.1. Caractérisation des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.)**

##### **I.8.1.1. Caractéristiques organoleptiques**

L'analyse sensorielle est une source d'information essentielle qui reflète les attentes et les tendances des consommateurs. L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue

généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur ainsi que la flaveur. Dans cette étude, trois critères, l'odeur, la couleur et l'aspect, sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique.

**L'odeur** : L'odorat est un sens très sensible. Les parfumeurs parviennent à classer et à caractériser des substances chimiques et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air.

- ✓ **La couleur** : La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Dans notre cas, elle a été appréciée et décrite visuellement.
- ✓ **Aspect physique** : L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent. Elle peut apparaître sous différentes formes : solide, liquide ou solide - liquide.

#### I.8.1.2. Caractéristiques physicochimiques

La qualité d'une huile et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques. Ces normes ont été déterminées par plusieurs organisations internationales (ISO : International standard organisation, AFNOR : Association française de normalisation, AOAC : Association of Official Agricultural Chemist). Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

#### 1.Densité relative à 20°C (NF 75-111)

Un volume bien déterminé de l'huile essentielle est pesé à l'aide d'une balance de précision. La densité de l'HE est calculée d'après la formule suivante :

$$D_{HE} = M_1 / M_2$$

$D_{HE}$  : Densité de l'huile essentielle.

$M_1$  : Masse en gramme d'un volume d'huile essentielle.

$M_2$  : Masse en gramme d'un volume d'eau distillé.

**2.Indice de réfraction** : L'indice de réfraction des liquides est mesuré à l'aide d'un Réfractomètre. L'indice de réfraction  $\eta^t_D$ , est calculée selon la relation suivante :

$$\eta^{20}_D = \eta^t_D + (t - 20) * 0.0004$$

**t** : Température de laboratoire ;

**D** : Raie de sodium ;

**0,0004** : Indice de réfraction quand la température varie de 1° C.

**3.Indice d'Acide (IA) :** L'indice d'acide d'une huile est défini comme étant le nombre de milligrammes de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme d'huile essentielle. La détermination se fait selon la norme (**NF EN ISO 3961, 1999**). 2 g d'huile essentielle sont introduits dans un ballon contenant 5mL d'éthanol neutralisé et 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphthaléine). Le liquide est titré avec une solution d'hydroxyde de potassium (0,1N) contenu dans une burette jusqu'à l'obtention d'un virage persistant de la solution (rose) pendant 30 secondes. Le volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé est noté. L'indice d'acide est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{IA = V \cdot C \cdot (56.11/M)}$$

IA: Indice d'acide

V: Volume de KOH utilisé (mL).

C: Concentration exacte, en moles par litre de la solution de KOH.

M : Masse de la prise d'essai.

✓ **Indice d'ester :** L'indice d'ester est le nombre de milligrammes de potassium (KOH) nécessaires pour effectuer la saponification totale des esters sels contenus dans un gramme d'huile.

2 g d'huile sont introduit dans un ballon. A l'aide d'une burette, 25 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium (0.1N) sont ajoutés ainsi que quelques billes en verre. Un réfrigérant à reflux est adapté au ballon sur un bain d'eau bouillante. Le ballon est refroidi, le tube démonté et 20 mL d'eau sont ajoutés au bain ainsi que quelques gouttes de solution de phénolphthaléine. L'excès d'hydroxyde de potassium est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,5 N). L'indice d'ester est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{IE = 28.05 \cdot (V - V_0)/M}$$

IE : Indice d'ester

V : Volume en mL de HCl utilisé dans cette détermination

V<sub>0</sub>: Volume en mL de HCl utilisé dans cette détermination de l'essai à blanc

M : Masse de la prise d'essai.

Un essai à blanc a été effectué dans les mêmes conditions opératoires et en utilisant les mêmes réactifs, en ajoutant 1mL d'éthanol (0,1 N) neutralisé.

✓ **Indice de peroxyde :** Cet indice sert à évaluer l'état de conservation au cours du stockage. La mesure est réalisée selon la méthode décrite par la norme (**NFT 6220, 1995**).

1g d'huile est dissoute dans 12.2 mL d'une solution d'acide acétique/chloroforme (3:2, V : V). 15 mL d'une solution de KI saturée sont ensuite additionnés au mélange. Après 5min à l'obscurité, 60mL d'eau distillée sont ajoutées.

Dans une seconde étape, 1mL d'une solution d'empois d'amidon sont ajoutés (une couleur violette apparaît), avant le titrage par la solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  à 0,01N, jusqu'à la disparition de la couleur violette. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions. L'indice de peroxyde est calculé par la formule suivante :

$$IP = (V - V_0) \cdot N \cdot 1000 / m$$

Avec

V = Volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour le titrage de l'échantillon,

$V_0$  = Le volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc,

m = la prise d'essai de l'échantillon exprimée en gramme (g),

N = La normalité (mol/L) de la solution de thiosulfate de sodium,

✓ **Indice d'iode** : L'indice d'iode est la masse d'iode, exprimée en grammes, fixé sur 100 grammes de corps gras. La détermination est réalisée selon la norme (NF EN ISO 3961, 1999) par dissolution d'une prise d'essai dans un solvant et addition du réactif de WIJS. Après 5-10 minutes l'addition d'une solution d'iodure de potassium et d'eau et titrage de l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium. L'indice d'iode ( $I_i$ ), exprimé en grammes pour 100g d'huile est donné par la formule suivante :

$$I_i = \frac{12.69 \cdot C(V_1 - V_2)}{m}$$

C : Concentration, en moles par litre, de la solution de thiosulfate de sodium ;

$V_1$  : Volume, en mL, de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc ;

$V_2$  : Volume, en mL, de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour la détermination ;

m : masse, en grammes, de la prise d'essai.

✓ **Indice de saponification** : L'indice de saponification qui est déterminé selon la norme (NF ISO 3657,1990). C'est la quantité d'hydroxyde de potassium, exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier un gramme de corps gras. La saponification est obtenue à chaud, par ébullition à reflux d'un échantillon avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, et titrage de l'excès d'hydroxyde de potassium par une solution titrée d'acide chlorhydrique en présence de phénolphtaléine. L'indice de saponification ( $I_s$ ) (mg KOH/g de corps gras) est donné par la formule suivante :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1) \cdot C \cdot 56.1}{m}$$

Où :

$V_0$  : Volume en mL de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc ;

$V_1$  : Volume en mL de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée pour la détermination ;

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique ;

m : masse en grammes, de la prise d'essai.

### I.8.1.3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) par CPG et CPG/SM

Les huiles essentielles extraites ont été soumises à des analyses qualitatives et semi-quantitatives par chromatographie.

#### I.8.1.3.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse qualitative par CPG des échantillons d'huiles essentielles a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de Technologie Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique l'aide d'un chromatographe Chrompack CP 9002 constitué d'une colonne capillaire de phase stationnaire DB5 non polaire d'une longueur de 30 mètres, diamètre interne de 0.32 mm et une épaisseur de 0.25µm. La programmation de la température est comme suit : 50°C en isotherme pendant 3 minutes puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 220°C. Le mode d'injection est de type split avec un rapport de division de 1/50 ; la température de détection est de 280°C, la pression est de 30 K Pascal ; le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 1 mL/min ; Le volume d'huile essentielle injectée est de 0.2 µL.

L'identification des composés est réalisée par comparaison de leurs indices de rétention (indice de Kovats) à ceux cités par la littérature et à ceux de certains étalons disponibles dans notre laboratoire. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcanes (C6 - C24) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon.

Les indices de Kovats (IK) sont calculés selon la formule suivante :

$$IR = 100z + 100n \frac{TR_c - TR_z}{TR_{z+n} - TR_z}$$

où

n : différence des nombres d'atomes de carbone ;

TR<sub>c</sub> : temps de rétention du composé étudié (mn);

TR<sub>z</sub> : temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbone qui précède le composé étudié (mn);

TR<sub>z+n</sub> : temps de rétention de l'alcane à z+n atomes de carbone qui suit le composé (mn).

#### I.8.1.3.2. Analyse semi-quantitative de l'huile essentielle de *P. lentiscus* (L.) par CG/SM

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de Toxicologie à Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie National (INCC/GN) à Bouchaoui, selon les conditions opératoires suivantes :

✓ **Chromatographie phase gazeuse (CPG)** : La CG a été réalisée avec programmation de la température : 35° C en isotherme pendant 5 min. puis augmentation de la température à raison de 6° C/min jusqu' à 250° C. Mode d'injection : Split à T= 250° C. La température de détection est de 280° C "interface" et la pression est de 6,75 psi. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 mL/ min. Le volume d'huile injecté est de 0,2 µL.

✓ **Spectrométrie de masse (SM)** : La spectrométrie de masse a été réalisée avec un mode de détection scan, un potentiel d'ionisation de 70 EV et une pression (Source, analyseur) de 6 psi.

L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur la comparaison des spectres de masse des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature, l'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée, la comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature sur le même type de colonne et la proposition et le pourcentage de probabilité de présence du composé, fournis par des bases de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

## **I.8.2. Caractérisation de l'huile fixe de *P. lentiscus* (L.)**

### **I.8.2.1. Caractéristiques organoleptiques**

De même que l'huile essentielle, les caractéristiques organoleptiques de l'huile fixe des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) ont été déterminées.

### **I.8.2.2. Caractéristiques physicochimiques**

Tous les paramètres physicochimiques déterminés pour l'huile essentielle (densité, indice de réfraction, indice d'acidité.....), ont été également déterminés pour l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) selon la norme AFNOR. Un autre paramètre important est déterminé pour l'huile fixe : **l'extinction spécifique en UV** à 232 nm et à 270 nm qui est considérée comme une image de l'état d'oxydation d'un corps gras.

#### ➤ **Extinction spécifique en UV (Absorbance spécifique dans l'ultraviolet)**

L'oxydation de l'acide linoléique conduit à la formation d'hydroperoxydes linoléique qui absorbent la lumière ultraviolette au voisinage de 266 nm. Si l'oxydation se poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation, en particulier des hydroperoxydes et des cétones insaturées qui absorbent la lumière à 232 et 270 nm. La détermination des coefficients d'absorption spécifique (extinction spécifique) dans le domaine de l'ultraviolet est nécessaire pour l'estimation de la phase d'oxydation de l'huile.

0,25 grammes d'huile sont dissoutes dans 25 mL de cyclohexane. L'absorbance de la solution de matière grasse est mesurée dans une cuve en quartz à l'aide d'un spectrophotomètre U.V/Visible (de type UNTCAM HELIOS) aux longueurs d'onde spécifiques de 232 et 270 nm.

Les coefficients d'extinction  $K_{232}$  et  $K_{270}$  sont exprimés par l'équation suivante :

$$K = A \lambda / C * l$$

Où :

- K** : Extinction spécifique à la longueur d'onde  $\lambda$ ;
- A  $\lambda$**  : Absorbance mesurée à la longueur d'onde  $\lambda$ ;
- C** : La concentration de la solution (g/100ml);
- I** : Epaisseur de la cuve en centimètre (1cm).

### I.8.2.3. Détermination de la composition chimique

#### I.8.2.3.1. Composition en acides gras

L'identification des acides gras (AG) est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG, après leur transformation préalable en esters méthyliques des acides gras (EMAG) de façon à accroître leur volatilité (**Kayoks et al., 1994**).

#### ✓ Préparation des esters méthyliques des acides gras

Les esters méthyliques se forment par transestérification dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium comme phase intermédiaire avant la saponification (**point 5 de la méthode ISO 5509 2000, point 5 de la méthode IUPAC 2.301**). Cette technique permet de séparer les EMAGs en fonction de leur nombre d'atomes de carbone mais aussi en fonction du nombre et de la position des doubles liaisons, ainsi que d'éventuels groupes fonctionnels (**Beretz. et al, 1982**).

Dans une éprouvette à bouchon vissant de 5 mL de capacité, peser 0,1 g de l'échantillon d'huile ; les dissoudre dans 2 mL d'Hexane et agiter. 0,2 mL d'une solution méthanolique 2 N d'hydroxyde de potassium sont ensuite ajoutés ; Le tube est bouché à l'aide d'un bouchon muni d'un joint en PTFE puis agité énergiquement pendant 30 secondes. Il est ensuite laissé à décanter jusqu'à ce que la partie supérieure de la solution devienne claire ; La couche supérieure hexanique, est celle qui contient les esters méthyliques.

#### ✓ Chromatographie en phase gazeuse des E.M.A.G

La chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) est la principale technique pour déterminer le profil d'acides gras des huiles. L'analyse des esters méthyliques est réalisée à l'aide d'un chromatographe Chrompack CP 9002 muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), constitué d'une colonne capillaire de phase stationnaire non polaire DB 5, d'une longueur de 30m et un diamètre de 0.32mm et une épaisseur de 0.25 $\mu$ m. La température est programmée à 50°C en isotherme pendant 3 minutes puis la température est augmentée à raison de 2°C/min jusqu'à 250°C. Un mode d'injection split avec un rapport de division de 1/100 a été utilisé ; la

température de détection est de 280°C ; la pression est de 30 K Pascal ; le gaz vecteur utilisé est l'Azote avec un débit de 1mL/min. Le volume d'huile injectée est de 0.8µL.

L'identification des acides gras est réalisée par comparaison des temps de rétention avec ceux d'un mélange d'esters méthyliques standard. La détermination des pourcentages est basée sur la méthode de normalisation interne admettant que la somme des aires des pics représente la totalité des constituants.

La teneur en un constituant donné *i*, exprimé en, pourcentage de masse des esters méthyliques est donné par la formule suivante :

$$\% i = (S_i / \sum S) \times 100$$

Avec ***S<sub>i</sub>*** : surface du pic correspondant au composé ***i***.

A partir de la composition en acide gras de nos huiles, l'indice de peroxydation (PI), est calculé selon l'équation proposée par **Song et al. (2000)**.

$$PI = (\% \text{ monoénoïque} \times 0.025) + (\% \text{ diénoïque} \times 1) + (\% \text{ triénoïque} \times 2) + (\% \text{ tétraénoïque} \times 4) + (\% \text{ pentaénoïque} \times 6) + (\% \text{ hexaénoïque} \times 8).$$

Cet indice renseigne sur la qualité de l'huile.

#### **I.8.2.3.2. Extraction de l'insaponifiable (Norme française T60 205)**

L'insaponifiable d'un corps gras correspond à l'ensemble des constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (**WOLF, 1968**). Le principe de cette méthode repose sur la saponification d'une prise d'essai de 5 g d'huile (soit **M** cette masse) par 50 ml d'une solution de potasse éthanolique (2N) à chaud, sous reflux pendant 20 min. Après l'ajout de 50 ml d'eau distillée, les substances insaponifiables sont extraites par l'éther diéthylique suivi d'un lavage avec l'eau distillée jusqu'à réaction neutre de lavage. La phase organique est ensuite filtrée sur le sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide par un évaporateur rotatif. Le résidu ainsi obtenu est séché à 150 °C puis laissé refroidir dans un dessiccateur (Soit **m** la masse trouvée). La teneur des insaponifiables est déterminée par la relation suivante :

$$\% \text{ insaponifiable} = (m/M).100$$

#### **I.8.2.3.3. Extraction des phosphatides**

Les phosphatides sont formés de mélange complexes de plusieurs classes de composés où entrent les acides gras, le glycérol, l'acide phosphorique et, dans certains cas, des bases

alcooliques azotées ou des acides aminés. Leur faible solubilité dans l'acétone permet de les précipiter de manière simple et de les doser par gravimétrie. Le dosage est effectué selon la méthode décrite par **Wolf, (1969)**.

La prise d'essai est traitée par l'acétone puis la solution obtenue est filtrée, le filtre et le résidu sont lavés avec le même solvant. Le filtre est séché à l'étuve puis pesé après refroidissement.

25g d'huile (l'extrait à l'hexane) sont dissous dans 200 mL d'acétone, soit P cette masse. Après 2 heures à 4°C, la solution est filtrée sur un filtre taré. Ce dernier est ensuite lavé avec de l'acétone jusqu'à ce que le solvant de lavage ne contienne plus de corps gras. Sécher le filtre à 100-105°C et le peser après refroidissement au dessiccateur. Soit P1 ce poids.

La teneur en phosphatides est donnée par la formule suivante :

$$\text{Phosphatides (\%)} = (P1/P) \times 100$$

#### I.8.2.3.4. Détermination de la teneur en pigments

**1.Les caroténoïdes :** La détermination de la teneur en ces pigments dans l'huile est basée sur une méthode spectrophotométrique, l'absorption se fait à 470 nm. 7,5 grammes d'huile sont introduits dans une fiole jaugée de 25 mL qui sera remplie, jusqu'au trait de jauge par du cyclohexane. L'absorbance de la solution obtenue est mesurée par rapport à celle du solvant à 470 nm (**Mosquera Minguez et al., 1991**). La teneur en caroténoïdes est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Carotène (ppm)} = (A_{470} \times 25 \times 10000) / (2000 \times 7,5)$$

#### 2.Les Chlorophylles

La détermination de la teneur en pigments chlorophylliens dans l'huile est effectuée selon la méthode décrite par **Wolff, (1968)** et **Mosquera Minguez et al. (1991)**. 5 mL d'huile sont dissout dans 5 mL de tétrachlorure de carbone. Après homogénéisation, les absorbances à 670, 630 et 710 nm sont mesurées. La teneur en chlorophylles est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Chlorophylles en ppm (mg/kg)} = A_{670} - [(A_{630} + A_{710}) / 2] / 0.1086$$

**A<sub>630</sub>** : absorbance à 630 nm par rapport à une cuve de référence contenant de tétrachlorure de carbone.

**A<sub>670</sub>** : absorbance à 670 nm

**A<sub>710</sub>** : absorbance à 710 nm

**L** : trajet optique = 1 cm

**0,1086** : coefficient lié à l'appareil.

## I.9.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *P. lentiscus* (L.)

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'huile essentielle et des extraits non volatils des différentes parties aériennes de *P. lentiscus* (L) a été réalisée par trois méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur et le piégeage du radical libre ABTS. Le pouvoir antioxydant a été comparé à un antioxydant de synthèse (BHT).

### I.9.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. Le DPPH est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confèrent une coloration violette (**Fig. 14**). Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres.



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (**Brand-William et al., 1995**).



Figure n° 14 : Forme libre et réduite du DPPH (**Brand-Williams et al., 1995**).

Cette étude est réalisée en suivant la méthode décrite par **Hazzit et al. (2009)**. 25µL de dilutions des huiles essentielles et d'extraits testés sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 975µL d'une solution méthanolique de DPPH (0.0024g/100 méthanol). Après 30 minute d'incubation à l'abri de la lumière, de l'oxygène atmosphérique et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. 03 répétitions sont réalisées pour chaque concentration et pour chaque échantillon. La même procédure est appliquée aux témoins (BHT : références de comparaison).

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

$$\text{I\%} = \left[ \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch}}}{A_{\text{blanc}}} \right] \times 100$$

Avec :

$A_{\text{blanc}}$  : Représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (huile essentielle, extrait ou témoin) à une concentration donnée ;

$A_{\text{éch}}$  : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min.

### I.9.1.1. Détermination de la concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC<sub>50</sub>)

L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %) appelée aussi EC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50), est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50 % des radicaux libres. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC<sub>50</sub> est petite.

### I.9.2. Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est une analyse de l'activité antioxydante rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des phénols totaux à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux Fe<sup>2+</sup>.

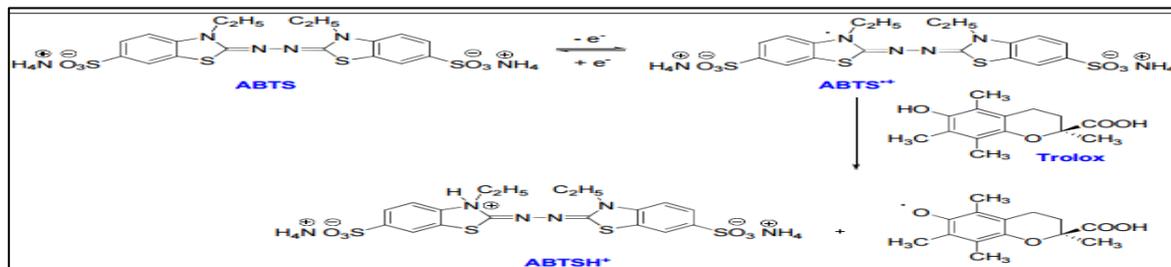
L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés est évaluée par la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)**. À 0.125 mL de la solution de l'échantillon, on ajoute 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH=6.6) et 2.5 mL d'hexacyanoferrate de potassium à 1% (p/v). Le mélange est incubé pendant 30 min à 50°C. Par la suite de 2.5 mL d'acide trichloroacétique à 10% (p/v) sont ajoutés. Le tout est centrifugé 10 mn à 1500 tr/ min en cas de précipité. A 2,5 mL de la phase supérieure sont ajoutés 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (0.1%) (p/v). L'absorbance est mesurée à 700 nm. La mesure a été répétée 3 fois pour chaque concentration de chaque échantillon étudié. Le BHT a été utilisé comme témoin positif.

La valeur IC<sub>50</sub> est la concentration efficace donnant une absorbance de 0,5 et elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe du pouvoir réducteur exprimé en absorbance en fonction de la concentration de l'antioxydant.

### I.9.3. Le test ABTS ou 2, 2-Azino-bis (3-rthylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity

La méthode à l'ABTS est basée sur l'évaluation du degré de réduction du cation ABTS (vert) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 12-16 h à 4°C à l'abri de la lumière (**Scalzo et al., 2005**).

Le radical ABTS<sup>+</sup> (absorbant à 734nm) est formé par perte d'un électron e<sup>-</sup> d'un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de protons H<sup>+</sup>), le radical d'azote concerné piège un H<sup>+</sup>, conduisant à formation d'ABTSH<sup>+</sup> qui entraîne la décoloration de la solution (**Fig.15**).



**Figure n°15:** Formation et piégeage du radical  $ABTS^+$  par un antioxydant donneur de proton.

L'inhibition du radical  $ABTS^+$  est effectuée selon la méthode décrite par **Cavar et al., (2012)**. Les solutions d'ABTS à 7.00mM et de persulfate de potassium à 2.45 mM sont mélangés en quantités égales. La solution obtenue est laissée pendant 12 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Elle est ensuite diluée en mélangeant 1 mL d'ABTS avec 60 mL d'éthanol de manière à obtenir une absorbance au spectrophotomètre de  $1,00 \pm 0,02$  à 734 nm. L' $ABTS^+$  est utilisé comme témoin négatif et le BHT comme témoin positif. Le test ABTS effectuée pour les huiles essentielles, les extraits et le BHT est réalisé en diluant la solution ABTS avec l'éthanol jusqu'à une absorbance de  $1 \pm 0,02$  à 734nm. L'éthanol est utilisé pour régler le zéro.

On ajoute à 1 mL de la solution  $ABTS^+$  25  $\mu$ L de l'échantillon. Après 7 minutes l'absorbance est mesurée à 734 nm. 3 répétitions pour chaque concentration ont été réalisées.

L'activité antiradicalaire des échantillons testés, exprimée en pourcentage d'inhibition d' $ABTS^+$  est calculée selon la formule suivante :

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

Avec :

$A_0$  : Absorbance de l'ABTS seul (témoin négatif)

A : Absorbance de l'ABTS + échantillon à tester.

Le pourcentage d'inhibition après 7 min a été tracé en fonction de la concentration, et l'équation de la courbe a été utilisée pour obtenir la valeur d' $IC_{50}$ . La concentration inhibitrice de 50% du radical ABTS est calculée de la même manière que celle utilisée pour le radical DPPH.

## I.10.Évaluation de l'activité antimicrobienne de *P. lentiscus* (L.)

Cette étude consiste à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de nos échantillons d'huiles essentielles et d'extraits des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) par une méthode qualitative et une méthode quantitative.

### I.10.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits étudiés par la méthode de diffusion sur milieu gélosé

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de *P. lentiscus* (L.) est celle de la diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques de

cellulose stériles appelés aromagrammes. Cette technique permet de déterminer la sensibilité des germes vis-à-vis des extraits végétaux étudiés. C'est une technique validée par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL. Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (**Pharmacopée Européenne, 2008**).

Cette méthode consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 9 mm de diamètre imprégné de la solution à étudier sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant, appelée halo ou zone d'inhibition. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié fonction du diamètre d'inhibition (**Hellal, 2011**).

Les milieux gélosés de Muller-Hinton et de Sabouraud sont mis à fondre dans un bain Marie à 95°C. Une première couche est versée aseptiquement dans des boîtes de Pétri à raison de 15mL par boîte avec 3 répétitions par souche. Les boîtes de Pétri sont laissées à refroidir et à solidifier sur la paillasse.

L'inoculum est préparé à partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures). Des suspensions microbiennes troubles sont réalisées en prélevant plusieurs colonies bien isolées et identiques et en les déposant dans 5 mL d'eau physiologique stérile. Les tubes sont agités au vortex pendant quelques secondes jusqu'à l'homogénéisation ;

Une première lecture de la densité optique de la suspension est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm en estimant la transmission entre 22 et 32% (0.2 à 0.3) pour les bactéries et entre 2 et 3% pour les levures, ce qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/mL. Si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, elle est ajustée en ajoutant de l'eau physiologique si elle est supérieure à la valeur maximale ou en ajoutant des colonies si elle est inférieure à la valeur minimale, jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

La deuxième couche est préparée à partir des deux milieux MH et SAB fondus dans un bain Marie à 95°C, puis refroidis jusqu'à une température de 45°C ; 50 mL de chaque milieu sont transvasés dans des flacons stériles. Les milieux sontensemencés avec 200 µL de chaque suspension microbienne prélevée à l'aide d'une micropipette stérile. Les flacons sont agités manuellement ; puis 5 mL de chaque milieuensemencé sont déposés rapidement sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. La couche est immédiatement étalée en faisant pivoter la boîte de pétri sur elle-même pour avoir une surface uniforme. Les boîtes de pétri sont laissées à solidifier sur la paillasse.

Un disque de cellulose stérile est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pince stérile. A l'aide d'une micropipette, les disques sont imbibés avec 3 $\mu$ L de l'huile pure ou de la solution d'extrait. Les disques sont ensuite déposés sur la surface de la gélose préalablement préparée et laissés à diffuser pendant 30 mn.

Les boîtes sont ensuite mises à incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures. Pour chaque expérimentation, 3 répétitions ont été réalisées.

La lecture des résultats est réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour chacune des souches testées à l'aide d'une règle à coulisse. La présence d'une zone claire autour du disque est le signe d'une activité inhibitrice et son absence est le signe de l'innocuité des substances étudiées.

### **I.10.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits étudiés par la méthode de dilution en milieu solide**

Cette étude est réalisée dans le but de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des souches les plus sensibles des échantillons testés.

#### **I.10.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus basse d'un agent antimicrobien inhibant visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24 h pour les bactéries et 48h pour les levures d'incubation.

Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents antimicrobiens

La CMI est déterminée selon la méthode des dilutions sur milieu gélosé (MH pour les bactéries et SAB pour les levures) selon le protocole expérimental suivant :

A partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures), des suspensions de 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> germes/mL pour chacun des germes à tester sont réalisées dans 5 mL d'eau physiologique par ajustement de la transmission à une longueur d'onde de 620 nm qui doit correspondre à une DO entre 0.2.et 0.3 pour les bactéries et une DO comprise entre 2-3 pour la levure. A partir de cette suspension, une série de dilutions allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup> sont préparées en prélevant 1 mL de la solution mère auquel on ajoute 9 mL d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10<sup>-2</sup>. La dilution 10<sup>-4</sup> est obtenue selon le même procédé. Cette dernière dilution sera utilisée pour la détermination de la CMI.

Par ailleurs une dilution à 2% d'HE ou de l'extrait est obtenue en diluant 1 mL d'huile essentielle pure ou de l'extrait (100mg/L) dans 50 mL de milieu (MH et/ou SAB) liquide additionné de Tween 80 stérile dans un premier flacon qui est immédiatement homogénéisé. Des dilutions de 1/2 en 1/2, sont obtenues en versant la moitié de la dilution 2% dans un deuxième flacon qui est complété avec 25 mL de milieu formant ainsi la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%. 20 mL de chaque dilution préparée sont versés dans des boîtes de pétri qui sont laissées à solidifier

Chaque boîte de pétri est divisée en trois parties correspondant aux trois souches bactériennes à tester. Les boîtes de pétri sontensemencées par 3µL de suspension microbienne à  $10^{-4}$  germes/mL.

Les disques stériles sont déposés sur la surface de la gélose dans l'autre partie des boîtes de Pétri ; chaque suspension microbienne à raison de 3µL en face du spot correspondant sont ensuiteensemencés au moyen d'une micropipette.

Les boîtes de Pétri sont laissées à diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes puis incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures ; Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été réalisées.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en notant la plus faible concentration inhibitrice d'HE et d'extrait. La CMI est la concentration où aucune croissance visible n'est constatée tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

#### **I.10.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

Le caractère bactéricide des huiles essentielles et des extraits étudiés est défini par la détermination de la CMB qui correspond à la concentration minimale en huiles essentielles et extraits pour obtenir la destruction de 99,99% de l'inoculum initial (soit moins de 0.01% des survivants) en 24 heures pour les bactéries et 48h pour les levures.

Les milieux MH et SAB sont mis à liquéfier dans un bain Marie à 95°C puis sont coulés dans des boîtes de pétri et laissés à solidifier ; Les disques correspondants aux concentrations de l'huile essentielle ou d'extraits où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination de la CMI sont prélevés aseptiquement puis déposés dans les boîtes de pétri déjà préparées. Les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pour les levures ;

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en déterminant la plus faible concentration d'HE ou d'extrait où aucune croissance d'une souche donnée n'est constatée. Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été réalisées.

N.B : la CMB  $\leq$  la CMI.

Le rapport CMB/CMI permet de déterminer les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des extraits végétaux. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait a un pouvoir bactériostatique et il est bactéricide quand ce rapport est inférieur ou égal à 4 (**Dramane et al., 2010**).

### **I.11.Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle et des extraits de *P. lentiscus* (L.) sur *Tribolium castaneum***

L'étude porte sur l'évaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles et des extraits des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) collectée dans la région de Bouira sur un ravageur de denrées stockées, le *Tribolium castaneum*.

Les tests de toxicité ont pour objet d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) d'une substance toxique chez les diverses espèces animales ou végétales. En pratique, il s'agit de déterminer les différentes formes de toxicité (par ingestion, inhalation ou par contact) et de faire une évaluation quantitative des principaux effets létaux ou sub-létaux (**Ramade, 2007**). Deux modes de traitement seront étudiés, l'un par contact et l'autre par inhalation.

#### **I.11.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles et des extraits par contact**

##### **I.11.1.1. Principe**

L'imprégnation des papiers filtres est la méthode utilisée pour déterminer la toxicité de l'huile essentielle et des extraits des différentes parties de *P. lentiscus* (L.). Ce test a pour but de déterminer la dose d'huile essentielles et d'extraits la plus toxique par contact sur *Tribolium castaneum*. Ce procédé nous permet de travailler sur des échantillons comportant un grand nombre d'individus adultes pris aléatoirement à partir d'une population d'insectes hétérogène (âges et sexes confondus).

##### **I.11.1.2. Protocole expérimental**

Après le tamisage de la farine infestée par *Tribolium castaneum*, 10 insectes adultes ont été prélevés.

Les doses utilisées ont été fixées sur la base des essais préliminaires. Plusieurs tests à blanc sont réalisés avec répétitions afin de fixer avec exactitude la meilleure gamme de doses à utiliser. Les doses ont été choisies de telle sorte que chaque dose soit le double de la précédente selon une progression géométrique de raison 2.

Quatre doses ont été choisi pour chaque type d'extraits ; 5, 10, 20 et 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  d'acétone, pour les huiles essentielles, 12, 24, 48 et 96  $\text{mg}/\text{mL}$  d'acétone pour les différents extraits phénoliques et 2, 4, 8 et 16  $\mu\text{L. mL}^{-1}$  pour l'extrait d'huile fixe des fruits rouges et noirs ont été utilisées.

Pour la préparation des solutions d'huiles essentielles et des extraits testés, l'acétone a été choisi comme solvant pour ses différentes vertus (évaporation très rapide, absence d'effets résiduels, solubilisation complète et rapide, inertie chimique vis-à-vis des H.E. et des matériaux utilisés. (Papier-filtre, verre...)).

Ce solvant est utilisé seulement dans le test de contact, pour permettre une répartition homogène des huiles essentielles et d'extraits testés sur le substrat traité.

Quatre solutions d'huiles essentielles et d'extraits sont préparées en diluant des quantités préalablement choisies d'huiles et d'extraits dans un 1 mL d'acétone. Chacune des solutions ainsi préparées a été répandue uniformément sur un disque de papier filtre type Watman de 10 cm de diamètre ( $78.5 \text{ cm}^2$ ) préalablement placés dans des boîtes de Pétri en verre de même diamètre pour obtenir des doses de 0.0636, 0.1273, .2547 et 0.5095  $\mu\text{L}$  d'H.E./ $\text{cm}^2$ . Pour les différents extraits testés, les doses obtenues sont de 0.1528, 0.3057, 0.6114 et 1.2229 mg d'extrait/  $\text{cm}^2$ . Une autre dose constituée uniquement d'acétone a été utilisée comme dose témoin.

Les boîtes de pétri sont laissées ouvertes jusqu'à l'évaporation complète du solvant. Le nombre de répétitions est de 3 pour chaque expérimentation.

Au bout de 5 min (temps nécessaire pour permettre l'évaporation de l'excès de solvant utilisé), 10 insectes sont introduits dans les boîtes de Pétri qui ont ensuite été fermées avec une fine moustiquaire maintenue par un élastique. Les comptages des insectes morts sont réalisés chaque 24 heure pendant une période de huit jours.

La mortalité des insectes est déterminée en calculant le nombre d'individus morts. Les insectes sont considérés comme mort s'il y a absence de tout mouvements corporels même après chatouillement des pattes. Le comptage des insectes morts est effectué quotidiennement sous une loupe pendant une période de 8 jours.

## **I.11.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles et des huiles fixes par inhalation**

### **I.11.2.1 Principe**

L'évaluation de la toxicité des huiles essentielles et des huiles fixes par inhalation est réalisée grâce à un test où la dose est fixée mais dont le temps d'inhalation est variable.

### **I.11.2.2 Protocole expérimental**

L'évaluation de la toxicité des huiles essentielles et des huiles fixes de *P. lentiscus* (L.) par inhalation a été réalisée selon les étapes suivantes :

Après le tamisage de la farine infestée par *Tribolium castaneum*, 10 insectes adultes ont été prélevés par boîte.

Cinq temps de lecture sont choisis à partir du temps maximal d'action des huiles essentielles (seuil de toxicité) au bout duquel tous les insectes sont morts. Ce temps maximal correspond à 24 h. Les temps de lecture sont 3h, 6h, 9h, 12h, 24h.

L'évaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation est réalisée grâce à un test où la dose est fixée à 20 µL, alors que pour les huiles fixes la dose est fixée à 16µL.

Des piluliers de 3,6 cm de diamètre et de 6,5 cm de hauteur correspondant à un volume de 68,64cm<sup>3</sup> sont utilisés pour l'ensemble de l'expérimentation. A l'intérieur des piluliers sont fixés sur la face interne du couvercle des demis bâtonnets de coton-tige de 2 cm de long imbibés de 20 µL soit 0,2914 µL/cm<sup>3</sup> d'huile essentielle et de 16 µL soit 0.2331µL/cm<sup>3</sup> d'huile fixe.

Afin de permettre une saturation complète de l'atmosphère par l'huile essentielle et l'huile fixe, les petits pots cylindriques sont maintenus fermés pendant 10 mn. Après saturation des pots, 10 adultes sont déposés rapidement au fond de chaque pot. Le témoin est réalisé sans aucun traitement (C'est-à-dire bâtonnets secs). Les pots sont fermés hermétiquement et scotchés de l'extérieur pour éviter toute fuite d'odeur. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque huile testée ainsi que pour le témoin.

Le dénombrement de la mortalité se fait à chaque temps de lecture et le nombre d'individus morts est comparé par rapport aux témoins

➤ **Expression des résultats** : L'efficacité d'un produit biocide est évaluée par la mortalité de l'organisme cible. Cependant le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tué par ce toxique. Il existe, en fait dans toute population traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par ce toxique. Les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule **d'Abbott (1925)** :

$$MC (\%) = [(M-Mt) / (100-Mt)] \times 100$$

Avec : MC (%) : Pourcentage de mortalité corrigée ;

M (%) : Pourcentage de morts dans la population traitée ;

Mt (%) : Pourcentage de morts dans la population témoin.

### I.11.3. Calcul des doses et des temps létaux

#### I.11.3.1. Calcul des doses létales DL<sub>30</sub>, DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub>

L'efficacité d'un toxique se mesure par sa DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> qui représentent les quantités de substance toxique entraînant la mort de 50% et 90% d'individus d'un même lot respectivement.

La DL<sub>30</sub> a été également calculée ; elle correspond à la concentration de ces substances entraînant la mort de 30% d'individus.

Elles sont déduites à partir du tracé des droites de régression. Pour cela, les pourcentages de mortalité corrigés sont transformés en probits (**Finney, 1971**) et la variable ‘dose’ en log de dose.

#### **I.11.3.2. Calcul des temps létaux TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub>**

Les trois temps létaux reflètent les durées où le toxique entraîne la mort de 30 %, 50% et 90% d’individus traités à une concentration déterminée. Elles sont déduites à partir de la droite de régression de la relation probits en fonction des logs de temps.

### **I.12.Analyse statistique**

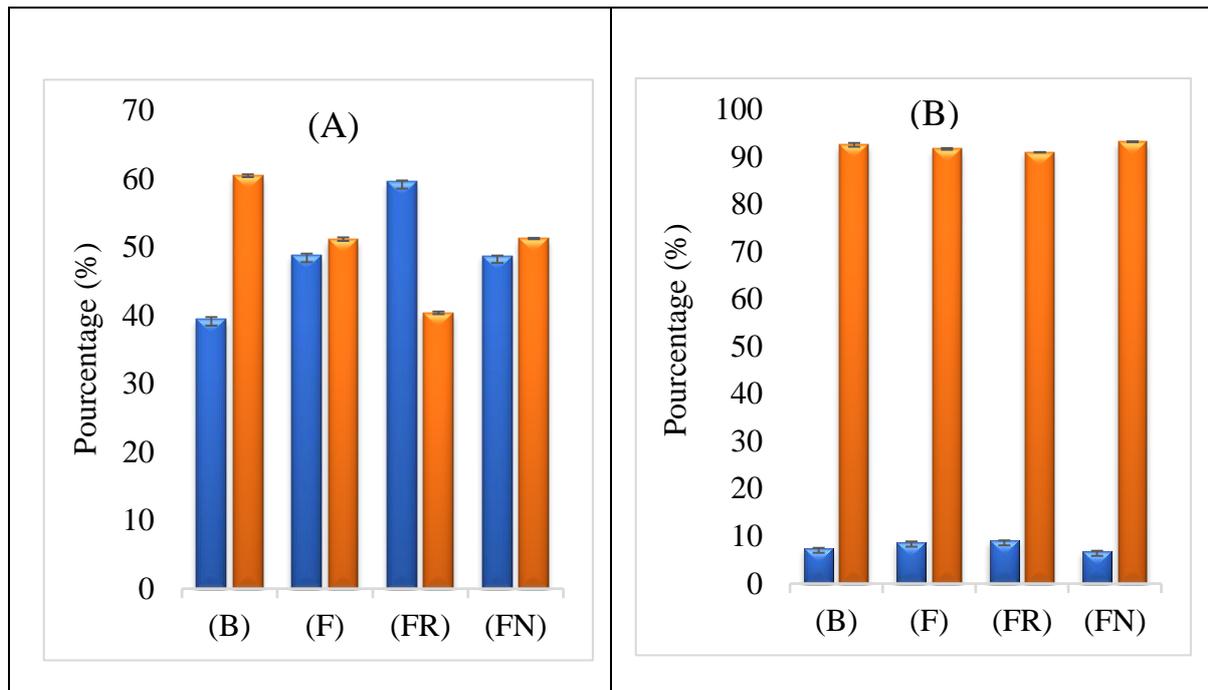
Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple et sont exprimées en tant que moyenne d'écart type  $\pm$  de trois analyses (moyen (SE)  $\pm$  d'écart type) ; elles sont calculées en utilisant des méthodes statistiques classiques.

Tous les graphes et les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant le logiciel : **Excel** (Microsoft Office 2016).

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

### II.1. Taux d'humidité et de matière sèche

Les végétaux sont riches en eau et peuvent renfermer jusqu'à 60 à 80 % d'eau. Les branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs frais fraîchement prélevés sont riches en eau avec respectivement un taux d'humidité de  $39.52\pm 0.26\%$ ,  $48.81\pm 0.26\%$ ,  $59.59\pm 0.19\%$  et  $48.70\pm 0.09\%$ . Le taux de matières sèches est de  $60.48\pm 0.20\%$ ,  $51.19\pm 0.26\%$ ,  $40.40\pm 0.19\%$  et  $51.29\pm 0.095\%$  respectivement pour les branches, les feuilles, les fruits rouges et les fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) (Fig. 16 A).



**Figure n °16** : Taux d'humidité (H%) et de matière sèche (MS%) des branches (B), feuilles (F), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de *P. lentiscus* (L.) fraîchement prélevés (A) et séchés (B).

Les feuilles, les fruits rouges et les fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) disposent d'une teneur en eau élevée par rapport à celle des branches.

Les résultats de notre analyse sont proches de ceux rapportés dans la littérature (Ghanemi et Haggani, 2017 ; Bampouli et al., 2014 ; Arabi et Boucherguine, 2013 ; Benrokia et Aouar, 2015).

Pour une bonne conservation des échantillons, les différentes parties de la plante ont été mises à sécher afin d'éviter l'action des enzymes. En effet, le séchage inhibe les enzymes existantes dans le matériel végétal frais (la polyphénol oxydase) (Espin et Tomas-Babera, 2001). Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau du matériel végétal doit être inférieure ou égale à 10 % (Paris et Moyse, 1965).

Après séchage, les résultats ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10% pour les quatre parties de la plante séchées avec respectivement  $7.49\pm 0.04\%$ ,  $8.78\pm 0.10\%$ ,  $9.06\pm 0.05\%$  et

**6.84±0.08 %** pour les branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). La teneur en matière sèche des plantes séchées est respectivement de **92.50±0.04%**, **91.64±0.18%**, **90.93±0.05 %** et **93.15±0.08%** (Fig. 16 B).

Cette teneur en eau, inférieure à 10%, confère aux poudres une meilleure conservation, avec moins de risque de contamination par les champignons et d'altération des principes chimiques. De plus, le séchage des plantes permet d'augmenter le rendement d'extraction des huiles essentielles (Zrira et al., 1995 ; Bourkhiss et al., 2009 ; Noumi et al., 2011 ; Haloui et al., 2015 b).

## II.2. Screening phytochimique de *P. lentiscus* (L.)

Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques. Ils sont produits, en réponse aux stress environnementaux et/ aux agressions biotiques (Mohammedi, 2013).

Une investigation chimique préliminaire entreprise sur les différentes parties *P. lentiscus* (L.) (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs), a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires. La détection de ces composés chimiques est effectuée par des réactions qualitatives.

*P. lentiscus* (L.) est riche en métabolites secondaires (Tanins, saponines, tanins catéchiques, tanins galliques, composés phénoliques, flavonoïdes, leucanthocyanes, protéines, terpénoïdes, antocyanes, composés réducteurs et huiles essentielles) dans les différents organes (Tab.3). Toutefois, l'amidon est présent dans les fruits rouges et noirs alors qu'il est absent dans les branches et les feuilles. Les alcaloïdes sont retrouvés dans les feuilles seulement, les phlobotanins, les stéroïdes, les tritérpenoïdes et le mucilage dans les branches, les fruits rouges et les fruits noirs alors qu'ils sont absents dans les feuilles. Les caroténoïdes, les glycosides et les quinones sont absents dans les quatre parties de la plante (Tab.3).

Ces métabolites secondaires sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique (Mohammedi, 2013). De nombreux travaux ont décrits les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes de ces familles chimiques (Bruneton, 2009 ; Amarowicz et al., 2000 ; Alves et al., 2013 ; Azofeifa et al., 2013 ; Singh et al., 2014).

Les familles chimiques détectées dans notre étude sont comparables avec les résultats de certains travaux antérieurs (Wu et Prior, 2005 ; Longo et al., 2007 ; Atmani et al., 2009 ; Tomaino et al., 2010 ; Hamad et al., 2011, Hamad et al. 2001, Cheurfa., 2015, Saiah et al., 2015) et viennent confirmer les travaux de Benhammou et al., 2008 ; Rodríguez-Pérez et al. 2013 ; Arabi et Boucherguine, 2013 ; Zitouni et al., 2016) sur la même plante.

**Tableau n °3** : Résultats des tests phytochimique réalisés sur les différents organes de *P. lentiscus* (L.).

Les groupes chimiques	Les branches	Les feuilles	Les fruits rouges	Les fruits noirs
Les Tanins	+	+	+	+
Les Saponins	+	+	+	+
	Catéchiques	+	+	+
Les Tanins	Galliques	+	+	+
Les Composés phenoliques	+	+	+	+
Les Flavonoides	+	+	+	+
Les Leucanthocyanes	+	+	+	+
Les Alcaloides	-	+	-	-
L'Amidon	-	-	-	-
Les Caroténoides	-	-	-	-
Les Phlobotannins	+	-	+	+
Les Protéines	+	+	+	+
Mucilage	+	-	+	+
Les Terpenoides	+	+	+	+
Les Quinones	-	-	-	-
Les Stéroïdes	+	-	+	+
Les Triterpenoides	+	-	+	+
Les Glycosides	-	-	-	-
Les Antocyanes	+	+	+	+
Les composés réducteurs	+	+	+	+
L'huile essentielle	+	+	+	+

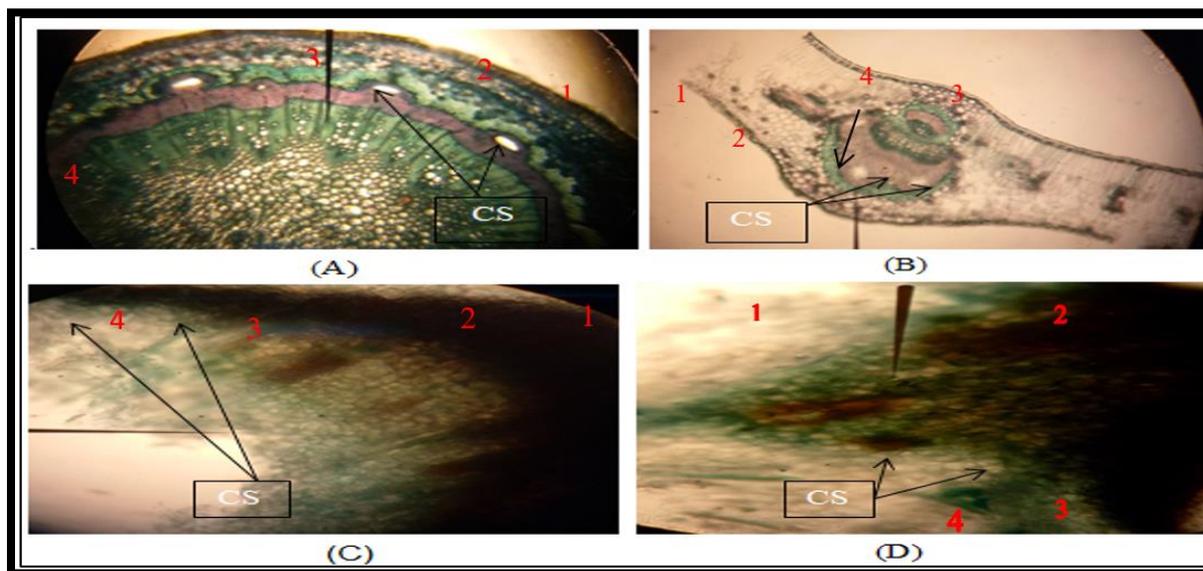
+ : Présence, - : Absence.

La richesse des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) collectée dans la région de Bouira (Algérie) en divers composés phytochimiques connus pour leur potentiel pharmacologique est compatible avec les nombreux usages traditionnels de cette plante médicinale.

### II.3. Structure histologique des différentes parties de *P. lentiscus* (L.)

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme et les chloroplastes de cellules végétales spécialisées (Charabot et al., 1899). Elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures de la plante telles que les poils sécréteurs ou les trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs.

L'étude histologique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) a montré une structure caractérisée par une cuticule épaisse, un épiderme constitué de cellule non chlorophyllienne. L'épiderme des parties aériennes est recouvert d'une couche protectrice (Suty, 2014), avec un parenchyme très développé, un sclérenchyme qui est un tissu de soutien. Les observations des coupes histologiques des différents organes de *P. lentiscus* (L.) effectuées au microscope optique ont montré la richesse de ces organes en canaux sécréteurs (Fig. 17). Les canaux sécréteurs (tissus sécréteurs internes) sont des structures plus ou moins complexes et sont responsables de la biosynthèse, du stockage et de l'émission des huiles. Ils sont situés au niveau du parenchyme des branches et au niveau du sclérenchyme pour les feuilles, fruits rouges et fruits noirs.



**Figure n° 17 :** Coupe transversale des branches (A), feuilles (B), fruits rouges (C) et fruits noirs (D) de *P. lentiscus* (L.) montrant la présence de canaux sécréteurs (CS) des huiles essentielles en microscope optique (Gr.10x 40). (1) : Cuticule ;(2) : Epiderme ;(3) : Parenchyme (4) : Sclérenchyme.

Les structures sécrétrices sont localisées à l'intérieur de l'espace intercellulaire (sécrétion endogène) nécessitant un broyage de la matière végétale afin de faciliter l'extraction et obtenir de meilleurs rendements en huiles essentielles.

De même, les observations microscopiques des coupes histologiques des feuilles et branches de *P. lentiscus* (L.) effectuée par Kaissa et al., (2013), montrent l'existence de canaux sécréteurs contenant la majorité des huiles dans les feuilles (sclérenchyme) et dans la tige (parenchyme cortical).

#### **II.4. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons**

Un procédé d'extraction d'huiles essentielles assistée par ultrason nommé "Extraction Assisté par Ultrason, EAU" a été mis au point et optimisé. Dans ce procédé, les ultrasons sont employés comme une technologie de prétraitement permettant l'extraction de l'huile essentielle

de façon simple et rapide. Ce procédé d'extraction a été appliqué et validé pour l'extraction d'huile essentielle à partir des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

Il s'agit d'un dispositif de laboratoire permettant l'extraction d'huiles essentielles en combinant la technique de l'hydrodistillation et l'application des ultrasons comme prétraitement. Les objectifs de cette méthode sont de pouvoir obtenir des rendements élevés d'huile essentielle tout en diminuant les durées d'extraction, et en diminuant la consommation d'énergie.

#### **II.4.1. Optimisation du rendement d'extraction de l'huile essentielle par la méthodologie des surfaces de réponses.**

Pour optimiser l'étape d'extraction, trois paramètres ont été testés : le temps d'extraction (A), la puissance des ultrasons (B) et le ratio matériel végétal/eau (C). La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) a été utilisée pour évaluer les effets des variables du processus d'extraction des huiles essentielles. La MSR a été appliquée aux données expérimentales pour déterminer la combinaison optimale des variables qui donne la réponse optimale. Le principal intérêt d'un plan d'expérience est de réaliser le minimum d'expérimentation en vue d'aboutir à un maximum d'informations concernant l'effet des paramètres opératoires considérés.

##### **II.4.1.1. Plan d'expérience Box-Behnken et modèle statistique**

L'optimisation de l'extraction des huiles essentielles assistée par ultrason a été étudiée à l'aide d'une méthodologie en surfaces de réponses conduite à partir d'un plan **d'expérience Box-Behnken**. La conception du plan expérimental est effectuée à l'aide du logiciel statistique, Design Expert software (version 9.0.6.2), afin d'étudier l'influence et la pertinence des paramètres impliqués dans l'extraction de l'huile essentielle. Trois facteurs indépendants [Le temps d'extraction (A), la puissance des ultrasons (B) et le ratio matériel végétal/eau (C)] sont évalués, ainsi que l'interaction éventuelle entre ces variables, afin d'obtenir les combinaisons optimales de temps d'extraction, puissance d'ultrasons et du ratio matériel végétal/eau conduisant à des pourcentages maximaux de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

Une étude préliminaire composée de plusieurs expériences a été conduite et nous a permis de déterminer les trois facteurs influençant particulièrement le procédé d'extraction de l'huile essentielle. Le choix des domaines de variation des paramètres étudiés ainsi que les niveaux des différentes variables codées et non codées (le temps d'extraction, la puissance ultrasons et le ratio matériel végétal/eau) du processus d'extraction ont été définis à l'issue des essais préliminaires (**Tab.2**).

Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser une seule réponse, le rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ) exprimé en pourcentage (%). Avec trois paramètres, ayant chacun trois niveaux, 17 combinaisons sont possibles, avec cinq répétitions de dont la valeur est égale à (0.0.0). Il faut également noter que les expériences ont été exécutées de façon aléatoire afin d'éviter toute influence de l'expérimentateur sur la réponse. Le plan d'expérience avec les valeurs de diverses réponses ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ) trouvées sont présentées sur le Tableau 4.

**Tableau n°4 :** Conditions expérimentales et valeurs du rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) prédits et expérimentales obtenue par le Plan Box Benken. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

	(A)	(B)	(C)	(Y <sub>1</sub> %) Exp	(Y <sub>1</sub> ) Prédit	(Y <sub>2</sub> %) Exp	(Y <sub>2</sub> ) Prédit	(Y <sub>3</sub> %) Exp	(Y <sub>3</sub> ) Prédit
1	-1	0	1	0,170 $\pm$ 0,005	0,17	0,570 $\pm$ 0,005	0,57	0,52 $\pm$ 0,01	0,52
2	0	1	1	0,320 $\pm$ 0,002	0,32	0,69 $\pm$ 0,01	0,69	0,66 $\pm$ 0,03	0,66
3	0	0	0	0,27 $\pm$ 0,04	0,27	0,63 $\pm$ 0,01	0,63	0,61 $\pm$ 0,01	0,61
4	-1	0	-1	0,130 $\pm$ 0,005	0,12	0,480 $\pm$ 0,005	0,47	0,44 $\pm$ 0,02	0,44
5	-1	-1	0	0,09 $\pm$ 0,05	0,094	0,4300 $\pm$ 0,0005	0,43	0,41 $\pm$ 0,01	0,41
6	1	1	0	0,330 $\pm$ 0,001	0,33	0,66 $\pm$ 0,01	0,66	0,64 $\pm$ 0,03	0,64
7	0	0	0	0,280 $\pm$ 0,002	0,27	0,640 $\pm$ 0,005	0,63	0,61 $\pm$ 0,02	0,61
8	1	-1	0	0,240 $\pm$ 0,005	0,24	0,600 $\pm$ 0,005	0,60	0,58 $\pm$ 0,05	0,58
9	0	0	0	0,270 $\pm$ 0,005	0,27	0,6300 $\pm$ 0,0005	0,63	0,62 $\pm$ 0,02	0,61
10	-1	1	0	0,210 $\pm$ 0,006	0,21	0,560 $\pm$ 0,006	0,57	0,55 $\pm$ 0,03	0,55
11	0	1	-1	0,220 $\pm$ 0,005	0,23	0,590 $\pm$ 0,001	0,59	0,57 $\pm$ 0,04	0,57
12	0	-1	1	0,190 $\pm$ 0,002	0,18	0,550 $\pm$ 0,005	0,55	0,54 $\pm$ 0,02	0,54
13	0	0	0	0,270 $\pm$ 0,002	0,27	0,63 $\pm$ 0,006	0,63	0,60 $\pm$ 0,04	0,61
14	1	0	1	0,30 $\pm$ 0,01	0,31	0,650 $\pm$ 0,002	0,66	0,63 $\pm$ 0,03	0,63
15	1	0	-1	0,250 $\pm$ 0,005	0,25	0,640 $\pm$ 0,002	0,64	0,59 $\pm$ 0,02	0,59
16	0	-1	-1	0,150 $\pm$ 0,003	0,16	0,530 $\pm$ 0,005	0,53	0,51 $\pm$ 0,01	0,51
17	0	0	0	0,280 $\pm$ 0,002	0,27	0,640 $\pm$ 0,001	0,63	0,61 $\pm$ 0,02	0,61

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle varie de **0,09 $\pm$ 0,05 %** à **0,330 $\pm$ 0,001%** pour l'huile extraite des feuilles/branches, de **0,4300 $\pm$ 0,0005%** à **0,69 $\pm$ 0,01 %** pour celle extraite des fruits rouges et de **0,41 $\pm$ 0,01 %** à **0,66 $\pm$ 0,03%** pour l'huile obtenue à partir des fruits noirs. Notons que le rendement d'extraction est différent d'un organe à un autre. Il est le plus élevé chez les fruits rouges suivi des fruits noirs, puis des feuilles/branches. Les résultats expérimentaux sont très proches aux résultats prédits par le modèle statistique.

Le rendement en huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus* (L.) du Maroc trouvé par Haloui *et al.*, (2014), se situe entre 0.14%-0.33%, en optimisant le rendement d'extraction par hydrodistillation par l'utilisation du plan Plackett-Burman. Le plan d'expérience Box-Behnken utilisé dans notre étude a donné des rendements en huile essentielle élevés, ce qui prouve l'efficacité et la fiabilité de ce modèle pour l'extraction des huiles essentielles.

Les résultats expérimentaux du rendement d'extraction de l'huile essentielle sont analysés en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (MSR). L'expression mathématique de la relation entre la réponse étudiée pour chaque modèle ( $Y_1$ ,  $Y_2$  et  $Y_3$ ) et les variables du procédé d'extraction (A, B et C) est présentée sous la forme d'une équation polynomiale du second degré.

$$Y_1 = +0,27 + 0,065 * A + 0,051 * B + 0,029 * C - 7,500^E - 003 * AB + 2,500^E - 003 * AC + 0,015 * BC - A^2 * 0,032 - 0,025 * B^2 - 0,030 * C^2$$

$$Y_2 = 0.61 + 0.065 * A + 0.048 * B + 0.030 * C - 0.020 * AB - 0.01 * AC + 0.015 * BC - 0.044 A^2 - 0.019 * B^2 - 0.019 * C^2.$$

$$Y_3 = 0.61 + 0.065 * A + 0.048 * B + 0.030 * C - 0.020 * AB - 0.01 * AC + 0.015 * BC - 0.044 A^2 - 0.019 * B^2 - 0.019 * C^2.$$

Où A, B et C sont respectivement les coefficients linéaires de temps d'extraction (min), de la puissance des ultrasons (W) et du ratio matériel végétal/eau ( $g \cdot mL^{-1}$ ). AB représente l'interaction entre les variables A et B, BC l'interaction entre les variables B et C et AC l'interaction entre les variables A et C ;  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  représentent les effets quadratiques des variables A, B et C.

A partir des réponses obtenues suite au plan d'expériences, le logiciel Design Expert nous propose ces modèles quadratiques qui permettent de déterminer la réponse attendue en fonction du niveau des paramètres. Les valeurs prédites sont en très bon accord avec les valeurs expérimentales (**Tab.4**), par conséquent, ce modèle quadratique est bien adapté pour cette mise en place expérimentale.

#### II.4.1.2. Analyse statistique et Evaluation de la qualité du modèle

L'analyse statistique consiste à analyser les données expérimentales à l'aide de la régression linéaire multiple ; elle aboutit à la construction de tableaux d'analyse de régression et à la détermination de la qualité descriptive du modèle. Pour l'analyse des effets des différents facteurs (le temps d'extraction, la puissance ultrasonique et le ratio matériel végétal/eau) sur les réponses ( $Y_1$ ,  $Y_2$  et  $Y_3$ ) obtenues lors du processus d'extraction de l'huile essentielle, nous

avons utilisé l'analyse de la variance (ANOVA) afin d'évaluer la qualité du modèle utilisé (**Tab.1 ,2 et 3. Annexe**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur le rendement d'extraction. Afin de déterminer si le modèle est significatif, la signification statistique de l'équation de régression a été vérifiée par le test-F et le test ANOVA pour les surfaces de réponses.

Cette analyse de la variance concèdera la détermination des divers coefficients de régression du modèle mathématique et permettra d'évaluer si une variable quantitative est significativement influente ou non. L'analyse de la variance consiste à tester une hypothèse nulle (les moyennes sont égales entre elles) contre l'hypothèse alternative (au moins une moyenne différente). Le principe est alors de comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons. Le rapport entre ces deux variances est appelé ratio-F. Cette valeur est comparée à une table statistique permettant l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle de départ (**Ferhat, 2010**).

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influencent. Afin d'avoir une bonne réponse, plusieurs conditions sont vérifiées. Plus l'amplitude de la valeur de F est élevée et celle de P est faible, plus le coefficient correspondant est significatif. Les valeurs de "Prob > F" inférieures à 0.0500 indiquent que les facteurs du modèle sont significatifs. Les valeurs supérieures à 0.10 indiquent que les facteurs du modèle ne sont pas significatifs. Le signe et l'amplitude des coefficients nous permettent d'interpréter les effets des variables sur les réponses. Le signe négatif d'un coefficient au niveau linéaire indique une diminution de la valeur de la réponse avec l'augmentation du niveau de la variable, tandis que le signe positif signifie une augmentation de la réponse. Pour l'interaction, le niveau d'une variable interactive doit augmenter, pendant que celui des autres variables diminuent pour donner des valeurs de réponse similaires (**Yadav et al., 2011**).

Les effets quadratiques indiquent que dans un premier temps, la valeur attribuée à la variable de réponse augmente de manière significative (jusqu'à un point maximal) à mesure que la variable augmente. Dans un deuxième temps, après un point de réponse maximale, l'effet de l'augmentation de la variable devient négatif.

L'analyse de la variance de la régression des modèles adoptés montre que ces modèles sont très significatifs ( $P < 0.001$ ). Les valeurs de F du modèle pour le rendement d'extraction en huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs sont respectivement de **116.73, 195.97 et 174.80** et montrent que ce modèle est largement significatif. Il y a un risque de 0.01 % seulement de rejeter à tort les hypothèses d'égalité avec la variance résiduelle.

Le test F de Fisher avec une très faible valeur de probabilité ( $p_{\text{modèle}} > F = 0.0001$ ) pour la réponse: Y1, Y2 et Y3 indique que le modèle de regression est très significatif pour chaque réponse.

**Myers et Montgomery (1995)** ont suggéré que l'adéquation du modèle est vérifiée par  $R^2$ ,  $R^2$  ajusté,  $R^2$  prédit, son coefficient de variation (CV) et la somme des erreurs quadratiques de prédiction (**PRESS**).

Les termes du modèle significatif peuvent présenter un bon ajustement, ce qui rend la vérification de l'adéquation particulière du modèle essentielle (**Zhang et al., 2010 ; Ghafari et al., 2009 ; Wang et al., 2008**).  $R^2$  peut être défini comme le rapport de la variation expliquée par la régression à la variation totale. C'est une mesure du degré d'ajustement (**Chan et al., 2009**).

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation  $R^2$  (**Chan et al., 2009**). L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales pourra être exprimée à l'aide du coefficient de détermination  $R^2$  (le modèle sera d'autant plus adapté que la valeur de R sera proche de 1). Dans la présente étude, la valeur de  $R^2$  obtenue est de **0.9933**, **0.9960** et **0.9956** respectivement pour la réponse Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> et Y<sub>3</sub>. Ce coefficient qui est une mesure de la qualité d'ajustement du modèle indique un degré élevé de corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites. Cela implique que plus de 99 % des données expérimentales sont compatibles avec les valeurs données prévues par le modèle. Ce qui suggère que plus de 99 % de variation est attribuée aux variables et indique une haute signification du modèle et seulement moins de 1% de l'ensemble des variations ne sont pas expliquées par le modèle pour le rendement en huile essentielle. Les données expérimentales sont compatibles avec les données prédites par le modèle (**Tab. 4**). Ainsi, la réponse a été suffisamment expliquée par le modèle.

Pour certain auteurs,  $R^2$  n'est pas considéré comme le principal point qui implique la précision du modèle (**Tan et al., 2012**). Le  $R^2$  ajusté est plus approprié pour évaluer le modèle si sa valeur est supérieure à 90%. Ce dernier représente la valeur corrigée de  $R^2$  après élimination des termes inutiles des modèles (non significatifs) (**El-Adawi et al., 2011**). S'il y a beaucoup de termes non significatifs inclus dans le modèle, le  $R^2$  ajusté serait remarquablement plus petit que le  $R^2$  (**Chan et al. 2009**). Dans notre étude, le  $R^2$  ajusté est très proche aux de  $R^2$  pour les trois modèles avec une valeur de **0.984**, **0.9910** et **0.9899** pour Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> et Y<sub>3</sub> respectivement. Ces valeurs indiquent un degré élevé de corrélation entre les valeurs observées et les valeurs prédites. Les valeurs élevées du  $R^2$  ajusté préconisent également l'importance du modèle pour la réponse étudiée. Pour  $R^2$  prédit, qui n'est qu'une mesure de la capacité prédictive

du modèle, les valeurs trouvées dans notre étude sont également élevées, **0.9172**, **0.96** et **0.9834** respectivement pour le rendement en huile essentielles des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs. Ces valeurs montrent qu'il existe une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et les valeurs prévues du modèle adapté, ce qui confirme la haute significativité du modèle.

L'ajustement du modèle a été également étudié à travers le test de manque d'ajustement ( $P > 0,05$ ) "lack of fit", qui indique l'aptitude des modèles à prédire la variation avec précision (**Prasad et al., 2011**). La valeur de F du manque d'ajustement (Lack of fit) qui est de **4.17** pour Y1, **1.94** pour Y2 et **0.24** pour Y3, implique que le manque d'ajustement n'est pas significatif. Lorsque le test du "manque d'ajustement" est non significatif, le modèle est jugé bon (**Govarerts et Leboulange, 2000 ; Amouzgar et al., 2010**). Une forte probabilité indique donc que le manque d'ajustement n'est pas statistiquement différent de l'erreur expérimentale. C'est le cas ici avec  $\text{Prob} > F (=0.1008, 0.2643 \text{ et } 0.8660) > 0,05$  respectivement pour Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> et Y<sub>3</sub>. ( $P > 0.05$ ) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant (**Chin et al., 2010**), sachant que si dans un modèle, la P-value du manque d'ajustement est significatif ce modèle sera rejeté (**Granato et al., 2010**). Ces valeurs suggèrent que le modèle prédit représente raisonnablement les valeurs expérimentales, ce qui signifie que ces modèles sont suffisamment précis pour prédire la réponse.

Le coefficient de variation (CV) qui représente le rapport entre l'écart type (déviation standard) et la moyenne, est une mesure de la reproductibilité du modèle. Généralement un modèle peut être considéré comme raisonnablement reproductible si son CV est inférieur à 10 % (**Mason et al., 1989**).

La faible valeur du coefficient de variation obtenue (**3.60 %**, **1.09 %** et **1.21%**) respectivement pour Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> et Y<sub>3</sub> indique que les écarts entre les valeurs expérimentales et prédites sont faibles ; ce qui confirme la bonne précision et la fiabilité des expériences réalisées. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont trouvés des faibles valeurs de CV (**Aminzadeh et al., 2010 ; Agarry et al., 2012**).

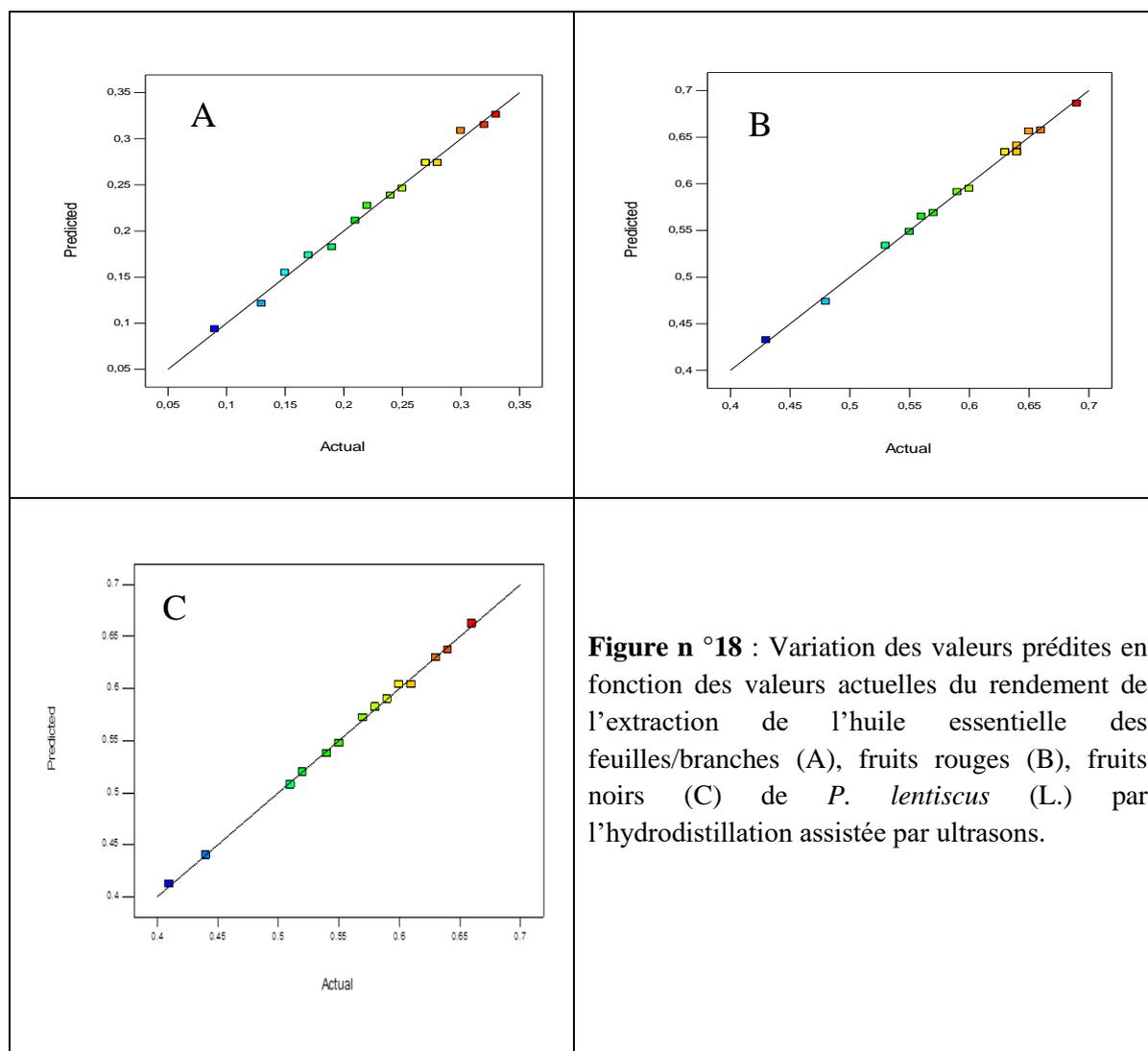
La somme des erreurs quadratiques de prédiction (PRESS), est une mesure qui permet de comparer les capacités prédictives d'un modèle. Des valeurs de **0.0061**, **0.0029** et **0,001238** sont trouvées pour Y1, Y2 et Y3. Des faibles valeurs sont souhaitables (**Palmer et O'Connell, 2009 ; Fhataheya Buang et al., 2014**), donc les valeurs trouvées dans notre étude pour ces modèles sont acceptables.

La Précision adéquate, est un autre paramètre statistique qui permet de vérifier l'adéquation du modèle adapté.

Elle compare la plage de valeurs prédites aux points de conception à la prévision moyenne. Un rapport supérieur à 4 est souhaitable (Myers et Montgomer, 2002). Pour les modèles proposés, cette valeur est de **36.049**, **50.965** et **47.47**. Tous les paramètres statistiques étudiés confirment, que la fiabilité des modèles.

#### II.4.1.3. Analyse graphique du modèle

Les différents indicateurs ( $R^2$ ,  $R^2$  justifié,  $R^2$  prédit) reflètent très bien la qualité descriptive des modèles qui semblent bien traduire les valeurs mesurées du rendement d'extraction de l'huile essentielles des différentes parties de *P. lentiscus* (L.). La qualité descriptive du modèle est observée grâce à un graphique d'adéquation du modèle (Fig. 18).



Les courbes des valeurs observées en fonction des valeurs prévues ont l'allure d'une droite ; Une concordance correcte existe entre les valeurs expérimentales et les valeurs prévues par le modèle pour chaque partie de la plante étudiée (Feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs). Les réponses prédites par le modèle traduisent bien la réalité.

#### II.4.1.4. Effets des différents paramètres sur le rendement d'extraction en huile essentielle par "EAU"

Chaque paramètre est caractérisé par une probabilité  $p$  qui correspond à la probabilité de se tromper en supposant que le paramètre est significatif. Ainsi, un paramètre est considéré significatif si  $p < 0.05$ . Par ailleurs, plus la différence entre la valeur du coefficient et l'écart type est grande, plus le facteur est jugé influent. Cela peut aussi être effectué en comparant le rapport entre le coefficient et l'écart type que l'on appelle « $t$ » par le test de student.

La valeur  $P$  a été utilisée pour vérifier la significativité de chaque coefficient. Plus les valeurs de  $P$  sont petites, plus la significativité du coefficient correspondant est grande (**Sheng et al., 2012 ; Liu et al., 2010**).

Les valeurs de "Prob> F" inférieure à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont significatifs. Le signe positif en face des termes indique un effet synergique ; tout signe négatif indique un effet antagoniste.

Les termes, A, B, C, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ont un effet significatif sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles /branches de *P. lentiscus* (L.). En revanche, les termes AB, AC ont un effet non significatif sur le rendement d'extraction. L'importance relative des valeurs des coefficients indique le maximum d'effet positif sur le rendement d'extraction est dû au temps d'extraction (+0.065), suivie par la puissance des ultrasons (+0.051) et du ratio matériel végétal /eau (+0.029) (**Tab.1. Annexe**). Le rendement en huile essentielle augmente avec l'augmentation des ces variables. La valeur positive de l'interaction AC et BC, indique que ces termes ont un effet positif (synergique). En outre, les termes quadratiques  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ainsi que les interactions AB ont un effet négatif (antagoniste) sur le rendement d'extraction.

Les termes, A, B, C, AB, AC, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ont également un effet significatif sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.). L'importance relative des valeurs des coefficients indique le maximum d'effet positif sur le rendement d'extraction est dû au temps d'extraction (+0.064), suivie par la puissance des ultrasons (+0.049) et du ratio matériel végétal /eau (+0.028) (**Tab.2. Annexe**). Le rendement en huile essentielle augmente avec l'augmentation des ces variables. La valeur positive de l'interaction BC, indique que ce terme a un effet positif (synergique). En outre, les termes quadratiques  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ainsi que les interactions AB et AC ont un effet négatif (antagoniste) sur le rendement d'extraction.

Les termes, A, B, C, AB, AC, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ont un effet significatif sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). L'importance relative des valeurs des coefficients indique le maximum d'effet positif sur le rendement d'extraction est dû au temps d'extraction (+0.065), suivie par la puissance des ultrasons (+0.048) et du ratio

matériel végétal /eau (+0.30) (**Tab.3. Annexe**). La valeur positive de l'interaction BC, indique que ce terme a un effet positif (synergique). En outre, les termes quadratiques  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ainsi que les interactions AB et AC ont un effet négatif (antagoniste) sur le rendement d'extraction,

Les effets linéaires du temps d'extraction (A), de la puissance des ultrasons (B) et du ratio matériel végétal/eau (C) sont les plus importants et les plus influents sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches ( $Y_1$ ), des fruits rouges ( $Y_2$ ) et des fruits noirs ( $Y_3$ ).

#### II.4.1.4.1. Effet du temps d'extraction

Le temps dépend principalement de la tension de vapeur des composés aromatiques. Le facteur temps intervient d'une manière directe dans l'extraction ; plus le matériel végétal est en contact avec l'eau, plus les molécules bioactives sont extraites. En effet, un rendement très faible est obtenu lors d'une extraction qui ne dure que 30 minutes. Il est plus important lorsque l'extraction dure à 60 et 90 min (**Tab.5**).

**Tableau n°5** : Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de *P. lentiscus* (L.) à 30, 60 et 90min.

Expérience	Durée d'extraction	F/B	FR	FN
(2) (-1,0,1)	<b>30min</b>	0.17±0.05%	0.570±0.005%	0.52±0.01%
(13) (0,0,0)	<b>60 min</b>	0.27±0.002%	0.630±0.006%	0.60±0.04%
(14) (1,0,1)	<b>90 min</b>	0.30±0.01%	0.65±0.002%	0.63±0.03%

L'augmentation du temps d'extraction permet aux constituants de point d'ébullition plus lourds et plus élevés de diffuser hors des poches d'huile dans les feuilles augmentant ainsi significativement le rendement en huile essentielle. Cependant, la réduction des rendements en huile essentielle a été observée lors de la prolongation de la durée de distillation au-delà de 180 min (**Yingngam et Brantner, 2015 ; Obed et al.,2016**). L'appareil chaud sert de source de chaleur provoquant l'évaporation de l'huile collectée. En outre, une décomposition de certaines substances volatiles thermolabiles pendant l'extraction peut se produire (**Zhang et al., 2012**).

L'utilisation des ultrasons nous a permis de réduire le temps d'extraction par rapport à une simple hydrodistillation et d'augmenter le rendement d'extraction. De plus, la réduction du temps d'extraction diminue la dégradation thermique des molécules aromatiques obtenues. De même, **Herzi (2013)**, préconise l'utilisation des temps d'extraction réduits afin de préserver la qualité des huiles essentielles des plantes aromatiques.

#### II.4.1.4.2. Effet de la puissance des ultrasons

La technique d'extraction par ultrasons est une technique très utilisée à l'échelle industrielle pour améliorer les phénomènes de transfert de masse. Elle a été reconnue pour son

application potentielle dans l'extraction à partir de plantes des huiles (carvone, gingerol, huile d'amande...), des protéines (soja), des polyphénols, des anthocyanines, des saponines, de ginseng, de polysaccharides ainsi que dans la pasteurisation et la production de produits laitiers (**Bermúdez-Aguirre et Barbosa-Cánovas, 2011 ; Chemat et al., 2011 ; Adam et al., 2012 ; Goula, 2013 ; Both et al., 2014**).

Cette augmentation du rendement est due au phénomène de cavitation qui est se produit pendant la sonication provoquant l'endommagement des membranes et/ou paroi cellulaires et la libération de l'huile essentielle. La puissance des ultrasons est un paramètre qui permet d'améliorer le rendement car son augmentation facilite l'endommagement cellulaire et l'extraction des composés actifs (**Dash et al., 2005 ; Prakash Maran et al., 2013**).

L'implosion des bulles de cavitation générées donne lieu à des micro-jets qui détruisent les glandes sécrétrices et facilitent le transfert de masse et la libération de l'huile essentielle. Une augmentation du rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/ branches de *P. lentiscus* (L.) avec l'augmentation de la puissance des ultrasons de **20 à 60 W** a été observée (**Tab.6**). Cet effet de cavitation est fortement dépendant de différents paramètres : fréquence, intensité des ultrasons, température et temps de traitement. En plus de l'amélioration du rendement, l'extraction assistée par ultrasons fournit des huiles essentielles de très haute qualité avec moins de dégradation thermique (**Porto et al., 2009 ; Asfaw et al., 2005**).

**Tableau n°6** : Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de *P. lentiscus* (L.) à 20,40 et 60 W.

Expérience	Durée d'extraction	F/B	FR	FN
(8) (1,-1,0)	<b>20W</b>	0,240±0.005%	0.600±0,005%	0.58±0.05%
(15)(1,0,-1)	<b>40W</b>	0,250±0.005%	0.640±0,002%	0.59±0.02%
(6) (1,1,0)	<b>60W</b>	0,330±0.001%	0.66±0,01%	0.64±0.03 %

Il existe trois mécanismes interconnectés à travers lesquels la puissance des ultrasons augmente l'efficacité du processus d'extraction en offrant un meilleur transfert de matière (**Mason et al., 2011**).

1 - La destruction des cellules par l'action des micro-jets produits lors de l'implosion des bulles de cavitation près de la surface du solide augmente la perméabilité du tissu et l'extraction des composés bioactifs ;

2 - L'amélioration de la pénétration du solvant dans la cellule et la solubilité des composés due aux températures et aux pressions élevées dans la zone de cavitation ;

3 - L'amélioration du processus de diffusion. En effet, l'agitation provoquée par les ultrasons élimine et renouvelle en continu la couche superficielle de solvant à la surface du solide par les micro-jets, permettant à un solvant frais (ou moins chargé) de saisir la couche et les nouveaux composés extraits.

L'augmentation du rendement d'extraction de l'huile essentielle pourrait être attribuée au phénomène de cavitation qui conduit à une décomposition plus efficace des cellules végétales et qui accélère le transfert de masse entre la plante et le solvant d'extraction (**Kimbaris et al., 2006 ; Tekin et al., 2014**). Cette technique a déjà prouvé sa puissance ; en effet, le rendement d'extraction par "EAU" des huiles essentielles provenant des agrumes japonais a augmenté de 44 % par rapport à celles obtenus par les méthodes traditionnelles (**Mason et al., 2011**).

#### II.4.1.4.3. Le ratio matériel végétal /eau

Le ratio MV/Eau a également à un effet positif significatif sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle. Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus élevé (**Al-Farsi and Lee, 2008 ; Gaboriaud, 1996**).

**Tableau n°7** : Rendement en huile essentielle des feuilles/branches (F/B), fruits rouges (FR) et fruits noirs (FN) de *P. lentiscus* (L.) avec un ratio MV/Eau de 1/4, 1/8 et 1/12.

Expérience	Durée d'extraction	F/B	FR	FN
(16) (0,-1,-1)	<b>1/4</b>	0.150±0.003%	0.530±0.005%	0.51±0.01%
(17) (0,0,0)	<b>1/8</b>	0.28±0.002%,	0.640±0.001%	0.61±0.02%
(14) (1,0,1)	<b>1/12</b>	0.30±0.01%,	0.65±0.002%	0.63±0.03%

En effet, le rendement obtenu lors d'une extraction avec un ratio MV/Eau de 1/4 est faible. Il est plus important lorsque ce ratio est de 1/8 et 1/12 (**Tab. 7**). Cependant, l'utilisation d'un grand volume de solvant pourrait conduire à consommer plus d'énergie et plus de temps (**Jeyaratnam et al., 2016**). L'extraction est fonction de la quantité d'eau présente. Il est nécessaire que la totalité de la matière végétale soit immergée dans l'eau, pour obtenir un système d'ébullition solide-liquide efficace. Cependant, une quantité trop élevée d'eau (>12) est néfaste pour le rendement, probablement parce que cela induit une perte de solutés hydrosolubles. La diminution du rendement final des huiles essentielles pour un taux de solvant élevé peut être attribuée à la dissolution et/ou à la transformation hydrolytique des constituants de l'huile (**Milojevic et al., 2008 ; Zhang et al., 2012**).

L'optimum du rendement d'extraction des huiles essentielles de *T. articulata* est obtenu avec un rapport MV/Eau de 1/10 (Herzi, 2013 ; Muhammad Hazwan *et al.*, 2012). Le rendement en l'huile de *Zingiber cassumunar* a augmenté jusqu'à un rapport de 0,03 g de solide/mL de solvant, puis baisse avec l'augmentation du rapport (Teoh Yi Peng *et al.*, 2012).

La quantité d'huile isolée de fleurs de *Fagraea fragrans Roxb* augmente avec l'augmentation du ration MV/eau, puis elle diminue lorsque ce rapport est plus de 12 mL.g<sup>-1</sup> (Yingngam et Brantner, 2015).

#### II.4.4.1.5. Analyse des surfaces de réponses et tracés de contours

La surface de réponse 3D est une représentation graphique en trois dimensions ; elle a été utilisée pour déterminer l'effet individuel et cumulatif de l'interaction mutuelle entre les variables. La surface de réponse analyse la nature géométrique de la surface, les maxima et les minima de la réponse. Elle visualise la relation entre les réponses et les niveaux expérimentaux de chaque variable et le type d'interactions entre deux variables de test (Zhong et Wang, 2010).

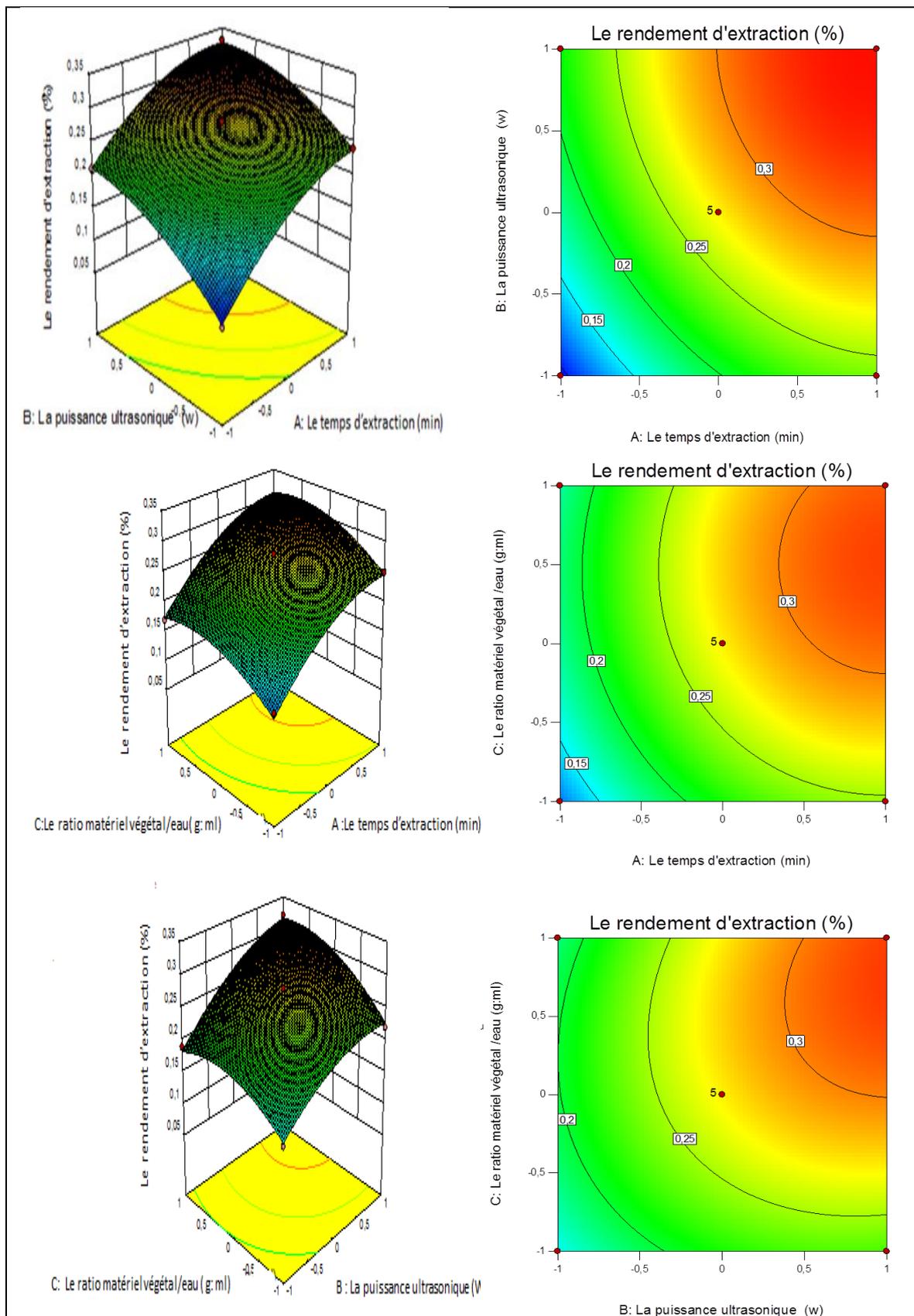
Le tracé de contour par ce modèle est une technique graphique pour représenter une surface de réponse polynomiale de trois dimensions en traçant z-tranches sur un format à deux dimensions. Des lignes sont tracées pour relier les coordonnées (x, y) où se produit cette z-valeur (Zhang *et al.*, 2010).

L'étude des graphes de contours fournit une méthode simple d'optimisation du rendement d'extraction et d'identification des interactions entre les variables (Fig. 19,20 et 21). Chaque courbe représente les combinaisons entre deux variables quand la troisième variable est maintenue à un niveau constant. Ces niveaux constants sont les niveaux centraux de chacune des variables. La forme elliptique des tracés de contours indique la bonne interaction des deux variables et la forme circulaire n'indique aucune interaction entre les variables.

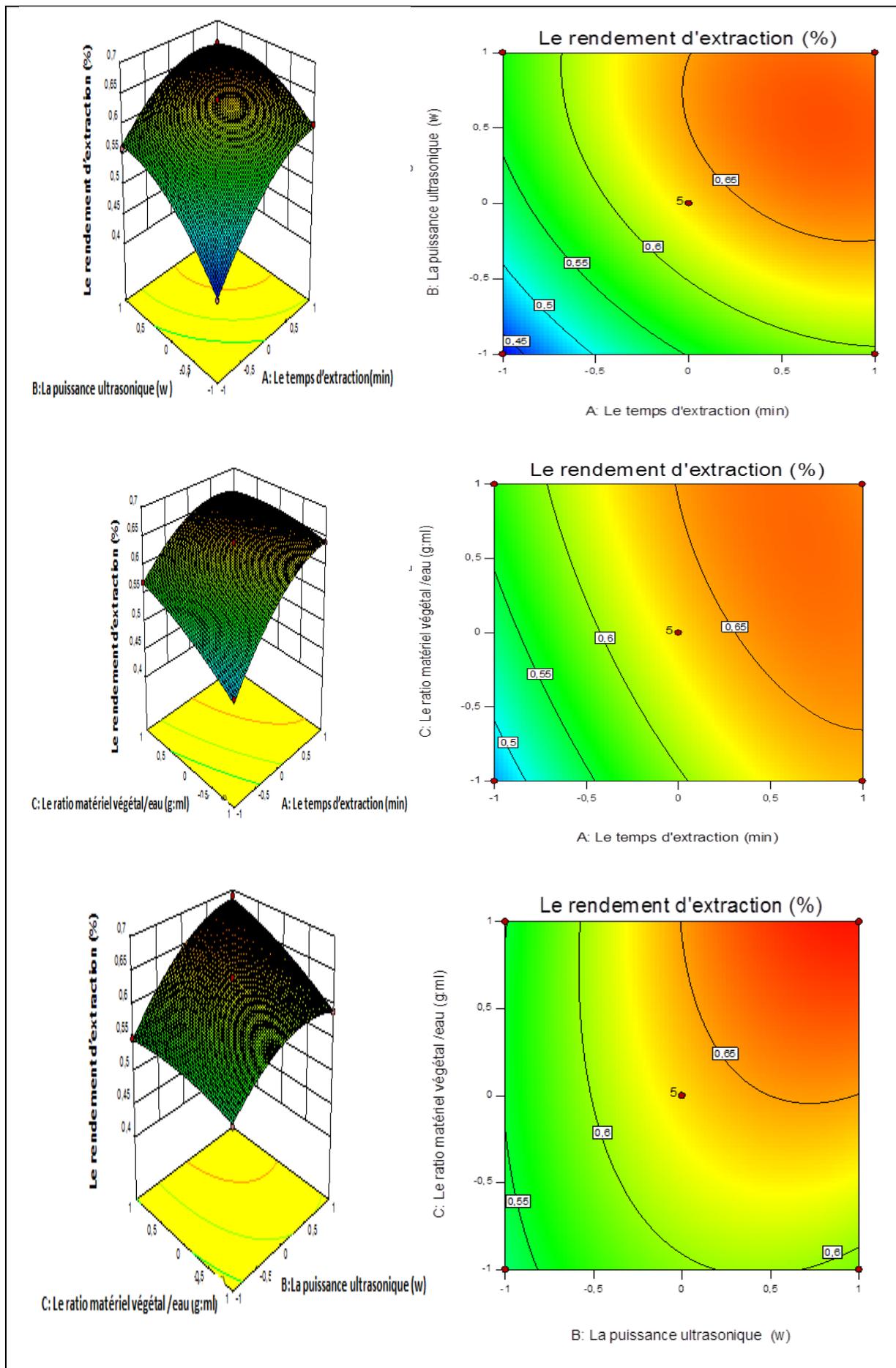
L'étude précédente consiste à déterminer l'influence de chaque paramètre sur l'extraction de l'huile essentielle de *P.lentiscus* (L.) par l'hydrodistillation assistée par ultrasons et à optimiser l'ensemble des paramètres. Les paramètres choisis sont : le temps d'extraction (30, 60 et 90 min), le ratio solide / liquide (1/4, 1/8 et 1/12 g.mL<sup>-1</sup>), la puissance des ultrasons (20,40 et 60W) a une fréquence de 25 KHR et à une température de 25 °C.

La valeur optimale du rendement obtenue lors de l'extraction de l'huile essentielles des feuilles/ branches est t de **0.330±0.001%**. Ce rendement est atteint après **90 min** d'extraction après utilisation d'un prétraitement aux ultrasons d'une puissance de **60 W**, en utilisant un ratio matériel végétal/eau de **1/8 (g.mL<sup>-1</sup>)**. Un rendement optimal de **0.69±0.01 %** et **0.66±0.03%**, est obtenue respectivement pour les fruits rouges et fruits noirs pour une durée d'extraction de

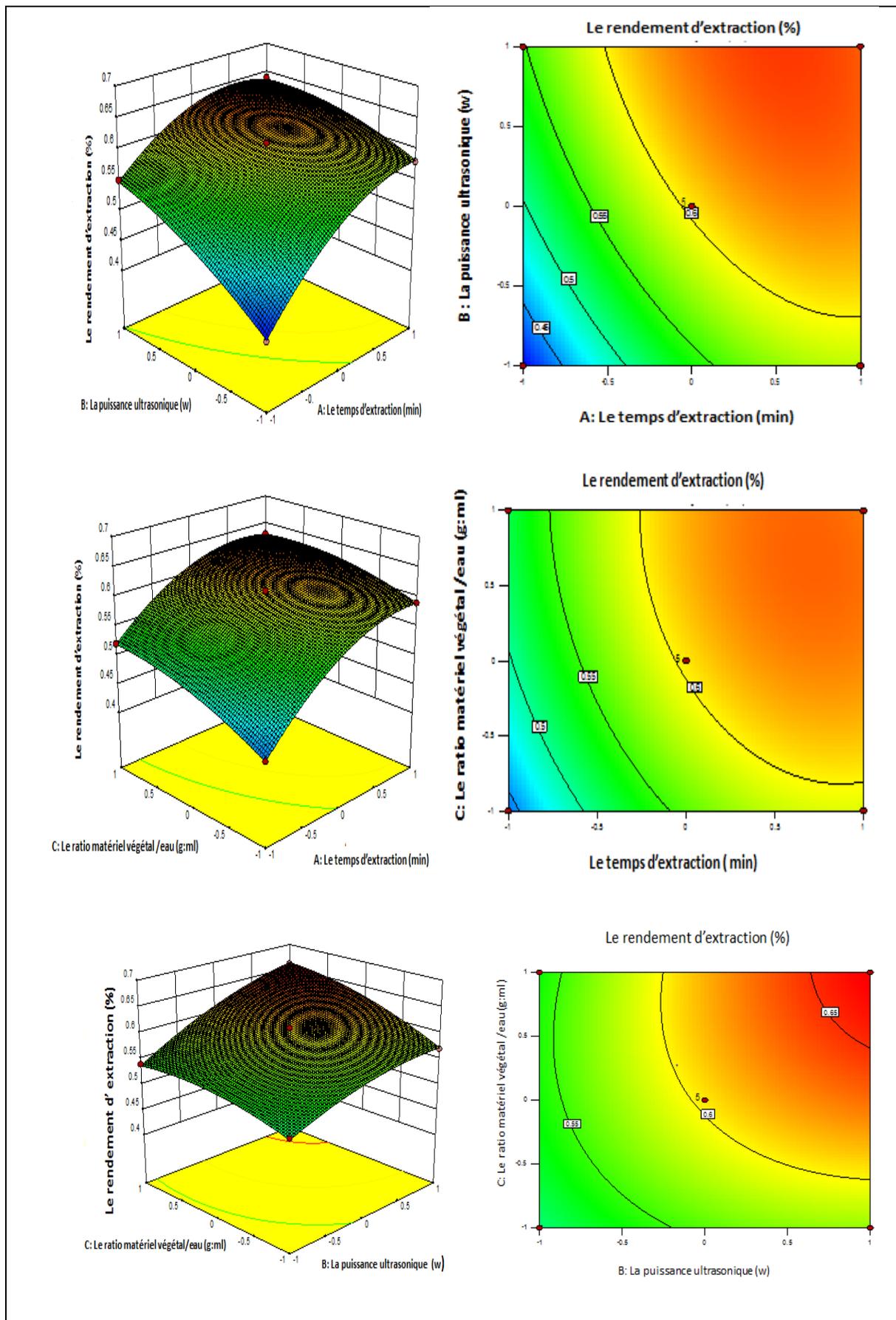
**60 min** en appliquant un prétraitement avec ultrasons d'une puissance de **60W**, en utilisant un ratio matériel végétal/eau de **1/12 (g. mL<sup>-1</sup>) (Tab.8)**.



**Figure n°19 :** Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.



**Figure n °20 :** Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.



**Figure n °21 :** Surfaces de réponse et tracés des contours de l'effet des variables indépendantes et leurs interactions sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons.

**Tableau n°8** : Rendement d'extraction en huiles essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) obtenu par "hydrodistillation" standard et par "EAU".

	F/B	FR	FN
<b>L'hydrodistillation standard</b>	0.103±0.005%	0.416±0.015%	0.386±0.020%
<b>EAU</b>	0.330±0.001%	0.69±0.01 %	0.66±0.03%

Ces résultats montrent l'importance du prétraitement par ultrasons sur le rendement d'extraction. En effet, le rendement obtenu pour une extraction par une hydrodistillation standard sans prétraitement est de **0.103±0.005%**, **0.416±0.015%** et **0.386±0.020%** respectivement pour les feuilles + branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) (**Tab.8**).

Le rendement moyen de l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus* (L.) extraite par l'hydrodistillation standard varie d'une localité à une autre ; il est de **0.32%** à Tipaza (**Meghaz et al., 2015**), de **0.25%** dans la région de Boumerdès (**Arab et al. 2014**), de **0.07 %** pour les feuilles collectées dans la région de Tlemcen (**Benhammou et Atik-Bekkara, 2009**). En effet, les différences constatées peuvent être attribuées à plusieurs facteurs. La diversité interspécifique ; la nature des organes sur lesquelles les huiles ont été extraites, la localité où sont récoltés les échantillons, sont autant de paramètres qui peuvent avoir une influence sur le rendement en huile (**Rodolfo et al., 2006**). Ces différences peuvent être dues également à plusieurs autres facteurs tels que, l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (La température et l'humidité) (**Granger et al, 1973 ; Rosua et Granados, 1987 ; Fournier et al., 1989 ; Haeckel et Omar, 1993 ; Khajeh et al., 2004 et 2005 ; Viljoen et al., 2006 ; Sefidkon et al.,2007 ; Arab et al. 2014**).

L'utilisation des plans d'expérience a permis de maximiser le rendement d'extraction des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.). Ceci montre l'importance de l'optimisation des paramètres quand une modification est effectuée sur un ou plusieurs paramètres tels que le rapport MV /EAU, le temps d'extraction et la puissance des ultrasons. Le rendement en huiles essentielles est optimisé par l'extraction aux ultrasons, montrant la viabilité de cette procédure avec des rendements élevés en utilisant cette technique comme prétraitement.

De plus, la technique de prétraitement aux ultrasons est plus efficace que l'hydrodistillation seule car elle permet de résoudre la plupart de ses inconvénients qui sont une longue durée d'extraction, une consommation d'eau importante, l'obtention de faibles rendements, la faible sélectivité du procédé et la dégradation thermique des composés. Elle permet d'obtenir une huile essentielle plus pure, plus proche de l'odeur naturelle de la plante cible.

## II.5. Etude des caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle extraite des différents organes de *P. lentiscus* (L.)

Les huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *P. lentiscus* (L.) sont limpides ; elles présentent un aspect liquide, de coloration jaune clair pour celle extraite des feuilles/branches, jaune pâle pour les fruits rouges et jaune foncé pour les fruits noirs. Elles dégagent toutes une très forte odeur aromatique caractéristique (**Tab.9**). Les paramètres organoleptiques de nos huiles essentielles sont en accord avec ceux des normes **AFNOR (2000)**. La plupart des huiles essentielles sont de couleur jaune pâle et parfois incolore, sauf pour les essences à azulène (camomille, matricaire) qui ont une couleur bleue (**Martini (2006)**).

**Tableau n °9** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielles de *P. lentiscus* (L.)

	Couleur	Odeur	Aspect
<b>Feuilles /branches</b>	Jaune claire	Forte odeur caractéristique et fraîche	Liquide, mobile et limpide
<b>Fruits rouge</b>	Jaune pâle	Forte odeur caractéristique et fraîche	Liquide, mobile et limpide
<b>Fruits noirs</b>	Jaune foncé	Forte odeur caractéristique et fraîche	Liquide, mobile et limpide

Les huiles essentielles issues des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) possèdent des odeurs proches des arômes originels de la plante fraîche utilisées pour l'extraction. L'odeur dégagée est agréable avec un caractère herbal rappelant la plante fraîche.

Les caractères organoleptiques restent importants (**Valnet J., 1984 ; Chanegriha et al., 1998**). L'examen olfactif qui précède ou suit toute analyse est indispensable car, si l'odeur de l'huile essentielle n'est pas satisfaisante, il importe peu que les constantes physico-chimiques soient correctes ; le produit est à rejeter.

## II.6. Caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle extraite des différentes parties de *P. lentiscus* (L.)

Les propriétés organoleptiques ne donnent qu'une idée fluctuante et fragmentaire d'une huile essentielle, Une caractérisation physicochimique plus précise est nécessaire. Ces indices (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester..... etc.), constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle (**Afssaps, 2008**).

**Tableau n°10** : Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

	Feuilles/branches	Fruits rouges	Fruits noirs
<b>Densité</b>	0.8600 $\pm$ 0.0004	0.854 $\pm$ 0.001	0.856 $\pm$ 0.001
<b>Indice de réfraction</b>	1.469 $\pm$ 0.005	1.459 $\pm$ 0.0009	1.4610 $\pm$ 0.0004
<b>Indice d'acide (mg KOH/g)</b>	2.036 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.04	1.91 $\pm$ 0.05
<b>Indice d'ester (mg KOH/g)</b>	21.19 $\pm$ 0.09	24.3 $\pm$ 0.2	23.50 $\pm$ 0.05
<b>Indice de saponification (mg OH/g)</b>	35.09 $\pm$ 0.20	56.20 $\pm$ 0.09	78.41 $\pm$ 0.12
<b>Indice de peroxide (mEq/Kg)</b>	3.65 $\pm$ 0.05	2.14 $\pm$ 0.01	2.31 $\pm$ 0.23
<b>Indice d'iode (g pour 100g d'huile)</b>	46.60 $\pm$ 2.94	62.63 $\pm$ 0.32	61.09 $\pm$ 0.01

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles extraite des branches/feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) présentent quelques différences (**Tab.10**).

#### ✚ La densité

La densité d'une huile nous renseigne sur sa pureté. Elle est fonction de la composition chimique des huiles (**Karleskind, 1992**). Les résultats de notre étude, révèlent que les valeurs de densités sont de **0.8600 $\pm$ 0.0004**, **0.854 $\pm$ 0.001** et **0.856 $\pm$ 0.001** respectivement pour les huiles essentielles extraites des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). La densité de l'huile essentielle extraite des feuilles/branches est légèrement supérieure à celles de l'huile extraite des fruits rouges et fruits noirs. Nos résultats sont comparables à ceux rapportés dans la bibliographie (**Djenane et al., 2011 ; Beghlal et al., 2016**). La densité des huiles essentielles est inférieure à celle d'eau car elle constituée de monoterpènes (**Zabeirou et Hachimou, 2000**).

#### ✚ Indice de réfraction

Les indices de réfraction des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) ont été calculés et ramenés à 20°C à l'aide d'un réfractomètre. Les indices de réfraction des trois huiles possèdent des valeurs très proches les unes des autres. Ces valeurs sont de **1.469 $\pm$ 0.005** (feuilles/branches), **1.4590 $\pm$ 0.0009** pour les fruits rouges et **1.461 $\pm$ 0.004** pour les fruits noirs.

Elles sont toutes supérieures à l'indice de réfraction de l'eau qui est de 1.3356 mettant en évidence la richesse de nos huiles essentielles en composants qui dévient la lumière polarisée. L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Boukhatem et al., 2010**). Plus l'indice de réfraction est faible plus l'huile essentielle est de bonne qualité (**Gacem et al., 1995**).

#### ✚ L'indice d'acide

L'indice d'acide détermine la quantité d'acides libres présents dans une huile. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation. (**De Cliff et Harerimana, 2013**).

D'après nos résultats, l'huile essentielle des branches/feuilles présente un indice d'acide un peu plus élevé par rapport à celui de l'huile des fruits rouges et des fruits noirs avec une valeur de **2.036±0.05**, **1.30±0.04** et **1.91±0.05** respectivement.

Les valeurs de l'indice d'acide des huiles essentielles rapporté par la norme **AFNOR (2002)** sont inférieures à 5. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides gras libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters.

#### ✚ L'indice d'ester

L'indice d'ester des huiles essentielles extraites à partir des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) est de **21.19±0.09** ; celui des fruits rouges et des fruits noirs sont de **24.3±0.2** et **23.50±0.05** respectivement (**Tab.10**). Il est très inférieur à celui trouvé par **Taleb Toudert, (2015)** pour l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus* (L.), collectées dans la région de la Kabylie. Plus que la qualité d'une huile est élevée, et plus la quantité d'ester qu'elle referme l'est aussi. Cependant, l'indice d'ester peut aussi être influencé par d'autres facteurs, tels que les conditions dans lesquelles s'effectuent l'hydrolyse (type d'alambic utilisé, constituants de l'eau utilisés pour le chauffage...). De manière générale, les huiles de très bonnes qualités ont un indice ester très élevé (**Tahari et Saadou, 2015**).

#### ✚ Indice de saponification

L'huile essentielle de *P. lentiscus* (L.) présente des indices de saponification avec des valeurs différentes entre les différentes parties de la plante. Il est de **35.09±0.20** pour l'huile des feuilles/branches, **56.20±0.09** pour l'huile des fruits rouges et **78.41±0.12** pour celle des fruits noirs.

#### ✚ Indice de peroxyde

L'huile essentielle des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) a enregistré un indice de peroxyde de **3.65±0.05** (mEq/kg) alors que l'huile essentielles extraite des fruits rouges et fruits noirs présente un indice de peroxyde de **2.14±0.01** (mEq/kg) et de **2.31±0.23** (mEq/ kg), respectivement (**Tab.10**). L'indice de peroxyde d'une huile ou d'une graisse est utilisé pour mesurer l'étendue des réactions de rancissement. L'air, ou spécialement l'oxygène de l'air, peut réagir avec l'huile et former divers composants de peroxyde qui affectent l'odeur, la saveur et la qualité de l'huile. En général, des indices de peroxyde supérieurs à 10 indiquent que cette huile est moins stable avec une durée de conservation plus courte (**Nouros et al., 1999**).

#### ✚ L'indice d'iode

L'indice d'iode est lié à l'état d'insaturation des chaînes carbonées dans les huiles. L'indice d'iode de nos échantillons est de de **46.60±2.94**, **62.63±0.32** et **61.09±0.01** (**pour 100 g huile**), respectivement pour l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles varient avec l'espèce végétale, l'organe (branches, feuilles ou fruits), le stade de maturité, le lieu de culture, la méthode et les conditions d'extraction (Essien et al., 2008 ; Barkatullah et al., 2012 et Siddiqui et al., 2013).

La majorité des paramètres physico-chimiques de d'huile essentielle des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) se retrouvent dans les fourchettes des références établies par la norme AFNOR.

## II.7. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CG) et (CG/SM)

L'extraction et l'évaluation des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle obtenue à partir des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) ne sont pas suffisantes pour établir une identification de nos huiles ; il est nécessaire d'en faire une analyse chromatographique et spectroscopique pour identifier les différents constituants des huiles conformément aux exigences des normes internationales. Pour cette étude, nous avons eu recours à la chromatographie en phase gazeuse (CG) et à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM). Le but visé de ces analyses, en plus de l'identification des constituants des essences recueillies, est de faire une étude comparative de la composition chimique des trois huiles essentielles extraites des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) obtenus par hydrodistillation assistée par ultrasons. L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leur indice de rétention (IR) et sur leur spectre de masse obtenu par (CG/SM).

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle extraite des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) par chromatographe en phase gazeuse (GC) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier 63 composés qui représentent **99,21%**, **99,87%** et **99,96%** de la composition totale respectivement pour l'huile extraite des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs (Tab.11).

L'huile essentielle des **feuilles/branches** contient **46,31%** de **monoterpènes hydrocarbonés** avec le  $\gamma$ -Terpinene (**12,13%**) et le Terpinolène (**15,8%**) en tant que composés majoritaires et l' $\alpha$  pinène (**5,01%**), le sabinene (**2,07%**), le  $\beta$  pinène (**3,42%**) et le  $\beta$  Myrcène (**6,09%**) en tant que composés minoritaires et **42,54%** de **monoterpènes oxygénés** avec le 4-Terpineol (**25,14%**) et le  $\alpha$ -Terpineol (**16,24%**) en tant que composés majoritaires (Fig. 22).

Pour l'huile essentielle extraite des **fruits rouges**, les **monoterpènes hydrocarbonés** représentent un taux de **88,28%** de la totalité des composants avec le  $\beta$ -Myrcène (**77,16%**)

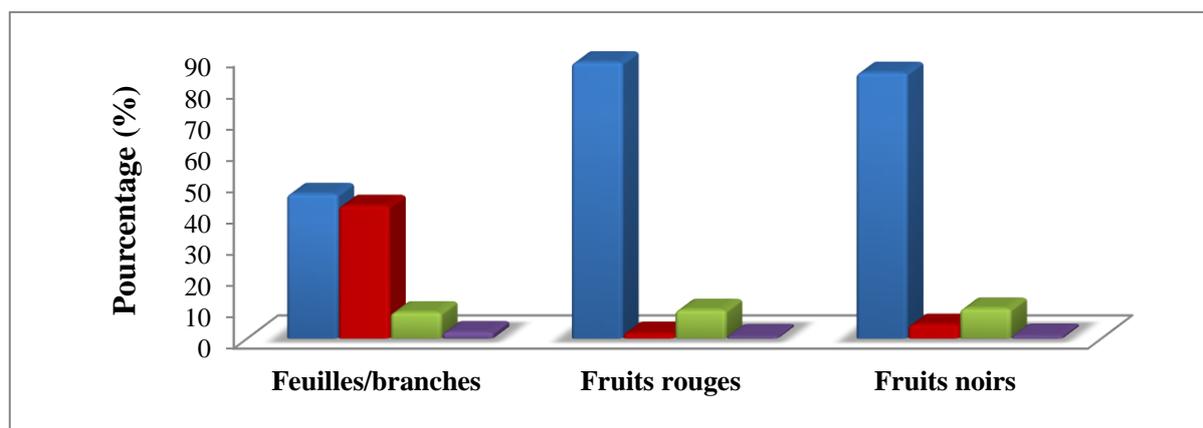
**Tableau n°11** : Composition chimique en (%) de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) de la région de Bouira.

N°	Les Composés	IR	Feuilles/ branches	Fruits rouges	Fruits noirs	Identification
1	Tricyclene	923	0,06	0,05	0,1	SM-IR
2	$\alpha$ -Thujene	927	0,05	0,06	0,09	SM-IR
3	$\alpha$ -Pinene	936	5,01	6,91	6,73	SM-IR- Et.
4	$\alpha$ -Fenchene	949	0,13	0,15	0,06	SM-IR
5	Camphene	950	0,5	0,52	0,54	SM-IR- Et.
6	Sabinene	973	2,07	0,46	0,19	SM-IR- Et.
7	$\beta$ -Pinene	977	3,42	0,21	1,21	SM-IR- Et.
8	$\beta$ -Myrcène	989	6,09	77,16	67,08	SM-IR- Et.
9	$\alpha$ -Phellandrene	1004	0,14	0,07	0,88	SM-IR
10	$\delta$ -3-Carene	1008	0,15	0,09	0,08	SM-IR
11	$\alpha$ -Terpinene	1010	0,17	0,08	0,37	SM-IR
12	p-cymene	1024	0,06	0,42	0,51	SM-IR
13	Limonène	1029	0,10	0,34	2,20	SM-IR
14	$\beta$ -Phellandrene	1030	0,07	0,25	0,35	SM-IR
15	-1-8-Cineole	1031	0,08	0,13	0,18	SM-IR- Et.
16	Trans-Ocimene	1033	0,09	0,22	0,73	SM-IR
17	$\beta$ -(Z)-Ocimene	1037	0,07	0,16	0,15	SM-IR
18	E-(Z)-Ocimene	1047	0,12	0,09	0,2	SM-IR
19	$\gamma$ -Terpinene	1060	12,13	0,76	0,68	SM-IR- Et.
20	Terpinolene	1087	15,8	0,15	2,61	SM-IR
21	Linalool	1099	0,18	0,26	1,2	SM-IR
22	Fenchol	1114	0,05	0,05	0,08	SM-IR
23	Camphor	1144	0,12	0,06	0,9	SM-IR-Et
24	Isoborneol	1158	0,10	0,05	0,06	SM-IR
25	Borneol	1167	0,71	0,14	0,34	SM-IR
26	4-Terpineol	1182	25,14	0,24	0,24	SM-IR
27	$\alpha$ -Terpineol	1194	16,24	0,11	0,48	SM-IR- Et
28	Bronyl acetate	1284	0,10	0,81	1,16	SM-IR- Et
29	Isoledene	1372	0,06	0,05	0,18	SM-IR
30	$\alpha$ -cubebene	1375	0,05	0,06	0,07	SM-IR
31	$\alpha$ -Ylangene	1378	0,08	0,1	0,19	SM-IR
32	$\alpha$ -Copaene	1383	0,07	0,11	0,27	SM-IR
33	$\beta$ -Bourbonene	1391	0,07	0,06	0,42	SM-IR
34	$\beta$ -Elemene	1394	1,72	0,05	1,77	SM-IR
35	Longifolene	1404	0,1	0,06	0,17	SM-IR
36	$\alpha$ gurjunene	1408	0,08	Tr.	Tr.	SM-IR
37	$\beta$ -caryophyllene	1420	2,5	5,1	3,04	SM-IR
38	Aromadendrene	1440	0,06	0,05	0,21	SM-IR
39	$\alpha$ -Amorphene	1443	0,07	0,06	0,11	SM-IR
40	$\alpha$ -Humulene	1449	0,05	0,31	0,12	SM-IR
41	$\alpha$ -Patchoulene	1451	0,1	0,12	0,13	SM-IR
42	Alloaromadendrene	1460	0,17	0,20	0,23	SM-IR
43	D Germacrene	1476	0,09	0,05	0,46	SM-IR
44	$\beta$ -Selinene	1480	0,15	0,05	0,07	SM-IR
45	$\beta$ -Gaiene	1489	0,25	1,2	0,08	SM-IR
46	Ledene	1494	0,05	0,05	0,07	SM-IR
47	$\alpha$ -Muurolene	1504	0,10	0,70	0,6	SM-IR
48	$\gamma$ -Cadinene	1513	2,04	0,13	0,20	SM-IR
49	$\delta$ -Cadinene	1523	0,41	0,37	1,02	SM-IR
50	$\alpha$ -Calacorene	1540	0,14	0,20	0,2	SM-IR
51	Ledol	1567	0,08	0,06	0,1	SM-IR
52	Caryophyllene oxide	1580	0,06	0,06	0,08	SM-IR
53	Globulol	1582	0,08	0,07	0,08	SM-IR
54	Epi-globulol	1584	0,1	0,05	0,11	SM-IR
55	Guaiol	1597	0,20	0,05	0,15	SM-IR
56	$\gamma$ -Eudesmol	1630	0,40	0,07	0,1	SM-IR
57	Cubenol	1632	0,05	0,06	0,06	SM-IR
58	Tau-cadinol	1638	0,06	0,05	0,07	SM-IR
59	Tau-muurolol	1640	0,31	0,06	0,05	SM-IR
60	$\alpha$ Eudesmol	1651	0,08	0,07	0,08	SM-IR
61	$\alpha$ cadinol	1652	0,41	0,06	0,05	SM-IR
62	Bulnesol	1665	0,05	0,08	TR	SM-IR
63	Eudesm-7 (11)-en-4-ol	1692	0,07	TR	TR	SM-IR
<b>Total identifié (%)</b>			<b>99,21</b>	<b>99,87</b>	<b>99,96</b>	
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>			46,31	88,28	84,94	
<b>Monoterpènes oxygénés</b>			42,54	1,71	4,46	
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>			8,41	9,20	9,63	
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>			1,95	0,68	0,93	

comme composant majoritaire, l' $\alpha$ -Pinene (6.91%), le camphene (0.52%) sabinene (0.46%),  $\beta$ -Pinene (0.21%), p-cymene (0.42%), $\gamma$ -Terpinene (0.76%) étant les composants minoritaires.

Les **sesquiterpènes hydrocarbonés** sont présents avec un taux de 9,20% dont les principaux constituants sont le  $\beta$ -caryophyllene (5,1%) et le  $\beta$ -Gaiene (1.2%). Le principal représentant des **monoterpènes oxygénés** (1.71%) est le Bronyl acetate (0.81%). Les **sesquiterpènes oxygénés** sont présents en faible teneur et ils ne représentent que 0,68 % de la totalité des constituants de l'huile essentielles des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) (Fig. 22).

En ce qui concerne l'huile essentielle extraite des **fruits noirs**, on note également une proportion importante de **monoterpènes hydrocarbonés** (84.94%) avec comme composant **majoritaire** le Myrcène (67.08%) ainsi que l' $\alpha$ - Pinene (6.73%),  $\beta$ -Pinene (1.21%), Limonene (2.20%), Terpinolene (2.61%) qui sont les composés minoritaires. Les **sesquiterpènes hydrocarbonés** représentent 9.63% de la totalité de la composition de l'huile essentielle et les principaux constituants sont B-Elemene (1.77%), le  $\beta$  caryophyllene (3.04%) et  $\delta$ -Cadinene (1.02%). Les **monoterpènes oxygénés** sont présents avec un taux de 4.46% et leurs principaux constituants sont Linalool (1.2%) et le Bornyl acetate (1.16%). On note une faible abondance en **sesquiterpènes oxygénés** (0,93%) (Fig. 22).



**Figure n°22 :** Principales familles chimiques rencontrées dans l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) de la région de Bouira (Monoterpènes hydrocarbonés ■, Monoterpènes oxygénés ■, Sesquiterpènes hydrocarbonés ■, Sesquiterpènes oxygénés ■).

La composition de l'huile essentielles du *Pistachier lentisque* varie en fonction des régions ; les feuilles provenant de kabylie sont riches en composés monoterpéniques (43,33%), suivis des sesquiterpènes (16,16%) (Taleb Toudert, 2015), celle des feuilles collectées à Oran est composée de monoterpènes oxygénés, essentiellement le terpinène-4-ol (41,24%) et de l' $\alpha$ -terpinéol (7,31%) (Hamiani et al., 2016) et l' $\alpha$ -Pinène (15.47%) et le limonène (14.7%) sont les composés majoritaires de l'huile des feuilles collecté à Boudarballa (Bouira) (Medjikane, 2017).

L'huile des fruits est constituée de monoterpènes, sesquiterpènes, esters aliphatique, cétones et des composés phénoliques (**Grant et al., 1990 ; Boelens et Jimenez, 1991 ; Congiu et al., 2002**). Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, peuvent être dues aux facteurs écologiques (le climat, l'altitude et la nature du sol).

La composition de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) a été établie à l'aide de la technique CG/SM. Cette technique a révélé que les HE des feuilles/branches est constitué principalement des **monoterpènes hydrocarbonés (46.31%)** et **oxygénés (42.54%)**. Quant à l'huile des fruits rouges et noirs est constituée essentiellement de **monoterpènes hydrocarbonés, 88,28%** pour les fruits rouges et **84.94%** pour les fruits noirs.

## **II.8. Caractéristiques et rendements des extraits phénoliques des différents organes de *P. lentiscus* (L.)**

### **II.8.1. Extraction et rendement**

L'extraction présente l'étape clé avant toute analyse quantitative ou qualitative (**Muanda, 2010**). Les composés phénoliques, substances actives, sont extraits par des solvants organiques. La solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé.

L'extraction des substances phénoliques a été effectuée en utilisant différents solvants, méthanol, éthanol, acétone, hexane et eau. Après extraction et récupération des extraits sous forme de poudre ou de pâte, le rendement, la couleur, l'aspect de chaque extrait sont déterminés (**Tab. 12**).

L'extrait méthanolique des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.) est de couleur vert foncé, celui des fruits rouges est de couleur marron clair alors que celui des fruits noirs est de couleur marron foncé ; ils présentent tous un aspect pâteux.

L'extrait éthanolique des branches est de couleur vert foncé, celui des feuilles, fruits rouges et fruits noirs est marron foncé et ils présentent également un aspect pâteux.

L'extrait aqueux des branches et des fruits rouges est de couleur marron clair, celui des feuilles et des fruits noirs marron foncé ; il se présente sous forme de poudre.

L'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de couleur vert clair et présente un aspect pâteux.

L'extrait hexanique des branches, feuilles et fruits rouges est de couleur vert foncé alors que l'extrait des fruits noirs est de couleur vert clair. Ils présentent tous un aspect huileux.

Tous les extraits obtenus sont caractérisés par une odeur aromatique, très puissante et pénétrante.

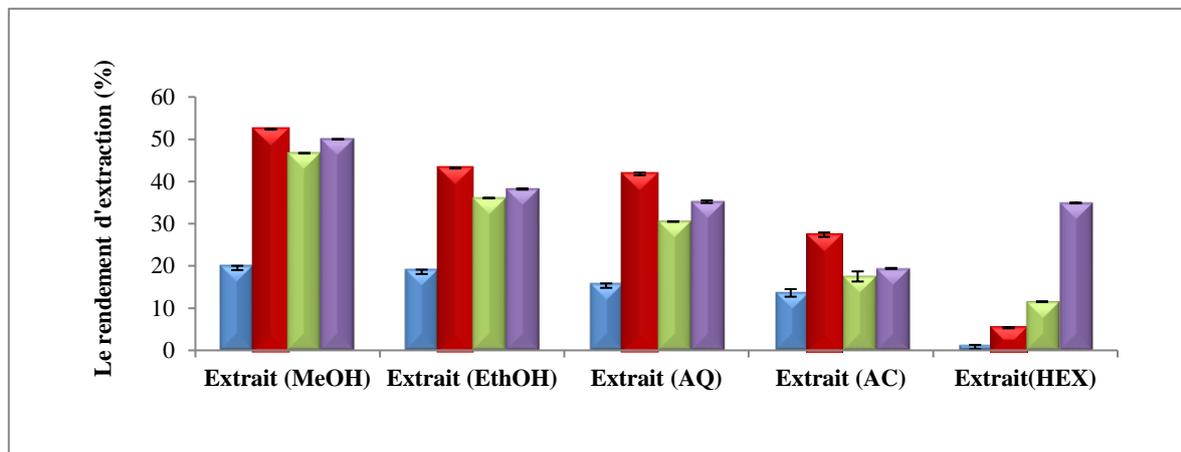
**Tableau n°12** : Caractéristiques des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.).

	Branches		Feuilles		Fruits						
	Aspect	Couleur	Rendement	Aspect	Couleur	Rouges		Noirs			
						Aspect	Couleur	Aspect	Couleur		
<b>Extrait Méthanolique (MeOH)</b>	Pâteux	Vert foncé	20.00±0.03	Pâteux	Vert foncé	52.39±0.06	Marron claire	46.70±0.02	marron foncé	Pâteux	50.00±0.01
<b>Extrait éthanolique (EthOH)</b>	Pâteux	Vert foncé	19.08±0.03	Pâteux	Marron foncé	43.2±0.02	Marron foncé	36.080±0.005	Marron foncé	Pâteux	38.21±0.15
<b>Extrait aqueux (AQ)</b>	Poudre	Marron clair	15.80±0.05	Poudre	Marron foncé	41.79±0.32	Marron clair	30.50±0.02	Marron foncé	Poudre	35.2±0.3
<b>Extrait acétonique (AC)</b>	Pâteux	Vert clair	13.7±0.8	Pâteux	Vert clair	27.40±0.52	Vert claire	17.5± 1.2	Pâteux	Vert clair	19.40±0.12
<b>Extrait hexanique (HEX)</b>	Huileux	Vert foncé	1.29±0.01	Huileux	Vert foncé	5.36±0.14	Huileux	11.53±0.05	Huileux	Vert claire	34.91±0.01

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

Les extraits sont riches en substances extractibles. Les rendements d'extraction les plus importants sont enregistrés avec les feuilles, les fruits noirs suivis des fruits rouges et des branches. Quelle que soit la partie de la plante utilisée, le rendement d'extraction obtenu avec le méthanol est toujours le plus élevé ; il varie de **20,00±0.03 % à 52.39±0.06%**, suivi de celui obtenu par l'éthanol, qui varie de **19.08 ±0.03 % à 43.20±0.02%**. Pour l'eau, le rendement d'extraction varie de **15.80±0.05%** à **41.79 ±0.32%**, celui obtenu avec l'acétone varie de **13.70 ±0.8%± 27.40±0.52%**. L'hexane donne le plus faible rendement d'extraction ; il varie de **1.29±0.01% à 34.91±0.01%**, sauf pour les fruits noirs où le rendement est relativement élevé (**34.91±0.01%**) (Fig.23).

Quel que soit la plante utilisée (*P. lentiscus*, *Euphorbia helioscopia*, *Marrubium peregrinum*), le rendement obtenu avec le méthanol est toujours plus important par rapport aux autres solvants : éthanol, acétone, acétate d'éthyle, éther de pétrole, eau (Stanković *et al.*, 2011 ; Belyagoubi *al.*, 2016 ; Benrokia et Aouar, 2015 ; Zitouni *et al.*, 2016 et Bourgou *et al.*, 2016).



**Figure n°23 :** Rendements d'extraction des branches (B) ■, feuilles (F) ■, fruits rouges (FR) ■ et (FN) ■ de *P. lentiscus* (L.).

Le rendement dépend des techniques d'extractions qui affectent le taux total en phénols et flavonoïdes (Lee *et al.*, 2003). Dans notre étude, le rendement de l'extrait méthanolique des feuilles de *P. lentiscus* (L.) obtenu par soxhlet est de  $52.39 \pm 0.06\%$  et celui de l'extrait aqueux obtenu par décoction est de  $41.79 \pm 0.32\%$ . Des rendements plus faibles sont obtenus lors d'une extraction par macération dans le méthanol et par infusion en faisant bouillir la matière végétale pendant 20 min (Bouriche *et al.*, 2016). D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, la taille des particules de l'échantillon, la nature chimique des composés phytochimiques ainsi que de la présence de substances interférentes affectent également le rendement d'extraction (Stalikas, 2007).

Le rendement d'extraction des feuilles du pistachier lentisque ( $52.39 \pm 0.06\%$ ), est plus élevé que celui des fruits noirs ( $50 \pm 0.01\%$ ), fruits rouges ( $46.7 \pm 0.02\%$ ) et des branches ( $20,00 \pm 0.03\%$ ). Cette différence est due à la composition chimique de chaque organe de la plante. La nature de l'organe utilisé dans l'extraction influence son rendement et sa composition chimique (Hafez, 2010). En effet, le rendement d'extraction varie d'un organe à un autre de la même plante (Mahmoudi, 2013 ; Beddou, 2015).

Les résultats des rendements d'extraction des différents organes de *P. lentiscus* (L.) indiquent la présence d'une teneur importante de composés extractibles dans les différents organes du pistachier lentisque.

L'utilisation des solvants à polarités différentes a permis de séparer les métabolites selon leurs degrés de solubilité (Kar, 2007).

## II.8.2. Etude de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

### II.8.2.1. Teneur en huile fixe des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

La teneur en huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de  $34.90 \pm 0.05\%$  et  $11.50 \pm 0.35\%$  respectivement (Tab. 12). Ces valeurs sont proches à celles trouvées par Charef et al., (2008). Des rendements allant de 17,45% à 35,37% sont rapporté dans la littérature (Bougherara Merzougui, 2014 ; Boukeloua et al., 2012 ; Dhifi et al., 2013 ; Boukeloua et al., 2016).

Ces différences du rendement en huile peuvent être attribuées aux différentes conditions bioclimatiques relatives à chaque population.

Il est aussi influencé par le stade de maturité et la région de récolte. De plus, le pourcentage d'huile augmente radicalement au début du stade de maturation et baisse légèrement quand le fruit dépasse la maturité (Salvador et al., 2001).

### II.8.2.2. Caractérisation de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

La recherche de la qualité devient plus que jamais la solution pour que les fruits du pistachier lentisque soit concurrentiel vis-à-vis des autres matières grasses. Or, la qualité est fondée sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile.

#### II.8.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés organoleptiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles. L'huile fixe obtenue à partir des fruits rouges et noirs du pistachier lentisque (L.) sont respectivement de couleur vert foncé et jaune-vert claire ; elles présentent un aspect huileux, et dégagent toute les deux une très forte odeur aromatique caractéristique de la plante fraîche (Tab.13).

**Tableau n°13** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

	Couleur	Odeur	Aspect
<b>Fruits rouge</b>	Vert foncé	Forte odeur caractéristique et fraîche	Huileux
<b>Fruits noirs</b>	Jaune-vert clair	Forte odeur caractéristique et fraîche	Huileux

### II.8.2.2.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques

✚ **La densité** ou masse volumique dépend de la température et de la composition chimique de l'huile. Elle nous renseigne sur la nature de la composante en acides gras, notamment de la longueur de la chaîne, de la présence d'insaturation et de fonction sur la chaîne carbonée (Maameri, 2016). La densité de l'huile de lentisque extraite des fruits rouges est de  $0.96 \pm 0.11$  et celle extraite des fruits noirs de  $0.94 \pm 0.03$ . L'huile de lentisque issue des fruits rouges est légèrement plus dense que l'huile issue des fruits noirs. La valeur de la densité trouvée pour l'huile de lentisque est supérieure à celle rapporté par Maameri et al. (2016) et Djerrou, (2014) et inférieure à celle trouvée par Bouamara et Haddad, (2016) et Boukeloua et al. (2012).

✚ **L'indice de réfraction** : L'indice de réfraction des huiles dépend de la structure des acides gras, du degré d'estérification (Gunstone, 2002) et de la température. Il augmente avec le nombre d'atomes de carbone, le degré d'insaturation et de conjugaison et prend des valeurs plus élevées pour les monoglycérides que pour les triglycérides. Toute variation de ce paramètre peut indiquer une modification de la composition en triglycérides de l'huile. L'indice de réfraction est de  $1,465 \pm 0,010$  pour l'huile *P. lentiscus* (L.) extraite des fruits rouges et de  $1,470 \pm 0,120$  pour celle extraite des fruits noirs. Ces valeurs sont proches de celles rapportées par Bougherara Merzougui, (2015) et Boukeloua et al. (2012).

✚ **L'indice d'acide** : L'acidité libre permet à la fois la classification des huiles, et d'avoir des renseignements sur leur état d'altération. Le contenu en acides gras libres d'une huile est un indicateur de l'activité des lipases, de la qualité, de la fraîcheur du fruit et de la stabilité de l'huile pendant le stockage. Ces acides jouent aussi un rôle important dans la caractérisation sensorielle de l'huile.

Les pourcentages d'acidité des huiles fixes du lentisque sont de  $1.12 \pm 0,10$  et  $2.24 \pm 0.03$  (mg de KOH/g d'huile) respectivement pour les fruits rouges et les fruits noirs (Tab.14). L'acidité des huiles est fonction de la maturité des fruits. Un indice d'acide de  $7,7 \pm 0,3$  et de  $24,0 \pm 0,5$  mg KOH/g est trouvé respectivement pour l'huile de lentisque, extraite des baies noire et rouge par Charef (2008). L'acidité est liée directement à l'état de conservation et aux techniques de récolte et d'extraction utilisées. Un taux élevé d'acidité serait probablement dû à l'hydrolyse des triglycérides sous l'action de lipases contenues dans le fruit, entraînant la libération des AG libres (Abaza et al., 2002).

✚ **L'indice de peroxyde** : L'indice de peroxyde mesure le degré de peroxydation des matières grasses après une exposition à l'air. Cette dernière va entraîner la formation de peroxydes à partir des acides gras insaturés (Kandji, 2001). L'indice de peroxyde est lié aux conditions de conservation et aux modes d'extraction. C'est un critère très utile et d'une sensibilité satisfaisante pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative.

L'oxydation d'une huile commence après la cueillette des fruits et continue pendant leur stockage et le traitement. Les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène et de facteurs physicochimiques (température élevée, eau, enzyme, trace de métaux, Cu, Fe...). Cet indice permet d'évaluer la teneur de l'huile en produits d'oxydation primaires (Tchiégang *et al.*, 2004 ; Marmesat *et al.*, 2009).

Les indices de peroxydes sont de  $8,390 \pm 0,012$  mEqO<sub>2</sub>/kg d'huile pour les huiles issues des fruits rouges et de  $5,90 \pm 0,02$  mEq O<sub>2</sub>/kg d'huile pour celles extraites des fruits noirs (Tab.14). Ces valeurs sont conformes aux normes du codex alimentaires (Codex Alimentarius, 1992). Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Boukeloua *et al.* (2012) et inférieurs à ceux obtenus par Djerroud, (2014). Ces différences d'indice de peroxyde sont probablement dues à l'oxydation de l'huile suite aux conditions d'extraction qui peuvent provoquer une oxydation des acides gras insaturés et à la présence de composés ayant de nombreuses doubles liaisons comme les caroténoïdes, les vitamines A et E, le squalène, qui peuvent subir des réactions d'oxydation analogues avec formation de peroxyde (Kandji, 2001).

**Tableau n° 14** : Indices physico-chimiques de l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

Indices physico-chimiques	FR	FN	Normes COI2011	Normes CEE2005	Codex, FAO 2001
Indice de réfraction	1,465 $\pm$ 0,010	1.470 $\pm$ 0.120	1,4677- 1,4705	/	/
Densité	0.96 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.03	/	/	/
Indice d'acide (mg KOH /g)	1.12 $\pm$ 0,10	2.24 $\pm$ 0.03	0,8 - 3,3	0,8 -2,0	<1
Indice d'ester (mg KOH /g)	189,53 $\pm$ 0.37	187.40 $\pm$ 0.56	/	/	/
Indice de saponification (mg de KOH /g)	194,21 $\pm$ 0,05	191,25 $\pm$ 0,12	184 – 196	184 - 196	/
Indice de peroxyde (m Eq/Kg)	8,39 $\pm$ 0,01	5.90 $\pm$ 0.02	$\leq$ 20	$\leq$ 20	<20
Indice d'iode (g / 100 g d'huile)	83,45 $\pm$ 0,25	80.01 $\pm$ 0.01	/	/	75-94
Extinction à 232 nm	0.123 $\pm$ 0.14	0.114 $\pm$ 0.100	2,50- 2,60	2,5- 2,60	/
Extinction à 270nm	0.289 $\pm$ 0.01	0.267 $\pm$ 0.130	0,22- 0,30	0,22- 0,25	0,25-0,30

✚ **Indice de saponification** : L'indice de saponification de l'huile issue des fruits rouges est de **194,21±0,05mg** de **KOH/g** d'huile et celle issue des fruits noirs de **191,25± 0,12 mg de KOH/g** d'huile pour (Tab. 14). Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par **Bougherara Merzougui, (2015)**.

✚ **Indice d'ester** : L'indice d'ester de l'huile extraite des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) sont respectivement de **189,53±0.37** et **187.40±0.56 mg de KOH/g** d'huile (Tab.14). Des indices d'ester se situent entre 178,45 et 209.87-mg de KOH/g d'huile sont rapporté dans la littérature (**Bouteldj et Kadjoudj, 2013 ; Bensalem, 2014**).

✚ **L'indice d'iode** : L'indice d'iode est un paramètre qui renseigne sur le nombre de doubles liaisons ; il est de **83,45±0,25 g de I<sub>2</sub>/100g** d'huile pour l'huile extraite des fruits rouges et de **80.01±0.01g de I<sub>2</sub>/100g** d'huile pour l'huile extraite des fruits noirs (Tab. 14). Ces valeurs sont situées dans l'intervalle des indices d'iode, signalée dans la littérature pour les huiles d'olive (75 à 94) (**Nichols, 2003**). Elles sont proches de celles trouvée par **Djerrou (2014)** pour l'huile des fruits de lentisque (85% pour les fruits noirs et 15% pour les fruits rouges) collecté dans la région de Tamalous (Skikda)

✚ **Extinction spécifique en UV** : L'oxydation d'un corps gras conduit à la formation d'hydroperoxyde linoléique qui absorbe la lumière au voisinage de 232 nm. Si l'oxydation se poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation, en particulier des dicétones et des cétones insaturées qui absorbent la lumière vers 270 nm. L'extinction spécifique à 232 nm et à 270 nm d'un corps gras peut donc être considérée comme une image de son état d'oxydation. Les deux huiles de lentisque ont des valeurs d'extinction faible ; l'huile de lentisque extraite des fruits rouges présente les extinctions les plus élevées à 232 et 270 nm qui sont respectivement de **0.123±0.140** et **0.289±0.010** suivis d'huile de lentisque extraite des fruits noirs qui a une extinction de **0.114±0.100** à 232 nm et de **0.267±0.130** à 270 nm (Tab.14). Nos résultats se trouvent dans les fourchettes des normes internationales (**Normes COI2011, Normes CEE2005 et Codex, FAO 2001**) confirmant la bonne qualité de l'huile de *Pistachier lentisque* et l'absence des produits d'oxydation secondaire. Des valeurs d'extinction de 0,093 à 232 nm et de 0,133 à 270 nm sont rapporté dans la littérature (**Bouamara et Haddad, 2016**). La variation de l'absorption à E270 peut être attribuée aux pratiques technologiques lors du processus d'extraction et à une exposition excessive des fruits et des huiles extraites à l'air et à la lumière (**Tanouti et al., 2011**).

Les caractéristiques physicochimiques (l'indice de réfraction, indice d'acide, indice d'iode, indice de peroxyde, indice d'ester, indice de saponification, Extinction à 232 nm et à 270nm) de l'huile de lentisque étudiée sont conformes aux normes internationales.

### II.8.2.2.3. Analyse de la composition chimique de l'huile fixe des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.)

#### II.8.2.2.3.1. Composition en acides gras de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) par Chromatographie en phase Gazeuse (CG)

Les huiles de *P. lentiscus* (L.) ont été extraites par un solvant organique (hexane). La composition en acides gras a été analysées par CPG.

L'huile fixe des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) se compose principalement de trois acides gras : les acides palmitique, oléique et linoléique représentant respectivement **22.74%**, **48.18%** et **25.20%** pour l'huile extraite des fruits rouges et **29.59%**, **49.70%** et **17.38%** respectivement pour l'huile extraite des fruits noirs (**Tab.15**).

**Tableau n°15** : Composition en acides gras (%) de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) par CPG.

Les acides gras	Dénomination	Fruits rouges	Fruits noirs
C16:0	<b>Acide palmitique<sup>1</sup></b>	<b>22.74%</b>	<b>29.59%</b>
C16:1 $\Delta^9$	<b>Acide Palmitoleique</b>	0.89%	0.82%
C17:0	<b>Acide margarique<sup>1</sup></b> (acide heptadécanoïque)	Traces	0.28%
C18:0	<b>Acide stéarique<sup>1</sup></b>	1.79%	1.41%
C18:1 $\Delta^9$	<b>Acide oléique<sup>2</sup></b>	<b>48.18%</b>	<b>49.70%</b>
C18:2 $\Delta^{9-12}$	<b>Acide linoléique<sup>3</sup></b>	<b>25.20%</b>	<b>17.38%</b>
C18:3 $\Delta^{9-12-15}$	<b>Acide linolénique<sup>3</sup></b>	0.27%	0.18%
C20:0	<b>Acide arachidique<sup>1</sup></b>	0.64%	0.44%
C20:1 $\Delta^9$	<b>Acide gondoïque<sup>2</sup></b>	0.27%	Traces
C22:0	<b>Acide béhénique<sup>1</sup> (acide docosanoïque)</b>	Traces	0.15%
$\Sigma$ AGS Acide gras saturés <sup>1</sup>		25.17%	31.87%
$\Sigma$ AGMI Acides gras monoinsaturés <sup>2</sup>		49.35%	50.52%
$\Sigma$ AGPI Acides gras polyinsaturés <sup>3</sup>		25.47%	17.56%
$\Sigma$ AGI		74.82%	68.08%
AGI/ AGS		2.97	2.13
<b>Indice de peroxydabilité</b>		<b>26.70%</b>	<b>18.82</b>

Acide gras saturés<sup>1</sup>  
Acides gras monoinsaturés<sup>2</sup>  
Acides gras polyinsaturés<sup>3</sup>

$\Sigma$  AGS : Somme des acides gras saturés.  
 $\Sigma$  AGMI : Somme des acides gras mono-insaturés.  
 $\Sigma$ AGPI : Somme des acides gras polyinsaturés.

L'huile des fruits de lentisque contient des acides gras saturés avec respectivement **25.17 %** et **31.87%** pour les fruits rouges et noirs. L'acide palmitique est le plus fréquemment rencontrés avec de **22.74 %** et **29.59%** respectivement pour les huiles extraites des fruits rouges et noirs suivi de l'acide stéarique (**1.79 %** et **1.41%** respectivement pour l'huile extraite des fruits rouges et noirs). Les autres AG saturés se trouvent en très faible proportion.

Les acides gras monoinsaturés (AGMI) représentent les composants les plus importants de nos huiles. Ils représentent un taux de **49.35%** pour les fruits rouges et **50.52%** pour les fruits noirs Parmi les acides gras mono-insaturés, figurent l'acide oléique (C18 :1 $\Delta$ 9) qui est le constituant majoritaire de l'huile du pistachier lentisque avec une teneur de **48.18%** pour celle extraite des fruit rouge et **49.70%** pour celle issue des fruits noirs.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) représentent **25,47%** des acide gras de l'huile de lentisque extraite des fruits rouges et seulement **17.56 %** pour celle issue des fruits noirs. Les deux principaux AGPI trouvés dans l'huile du pistachier lentisque sont les acides linoléique (C18 : 2 $\Delta^{9-12}$ ) avec une teneur de **25.20%** pour les fruits rouges et **17.38 %** pour les fruits noirs et linoléinique (C18:3 $\Delta^{9-12-15}$ ) avec une teneur de **0.27%** et **0.18%** respectivement pour l'huile extraite des fruits rouges et de fruits noirs.

L'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), possède une teneur importante en acide oléique comparable à certaines huiles alimentaires comme l'huile d'olive, conférant à cette huile une valeur alimentaire comparable à l'huile d'olive. L'acide oléique présent en grande proportion est réputé pour son rôle dans la préservation des maladies cardiovasculaires et pour sa valeur nutritive (**Corbett, 2003**). En effet, ils sont reconnus pour abaisser le mauvais cholestérol (Cholestérol LDL) et pour augmenter le bon cholestérol (Cholestérol HDL) (**Michihiro et al ; 1996 et Mata, 1992**). La teneur élevée de l'acide oléique confère aussi à l'huile de *P. lentiscus* (L.) une stabilité au cours du stockage.

L'huile fixe de *P. lentiscus* (L.) est également riche en acide linoléique (C18 :2 $\Delta^{9-12}$ ) un AG essentiels (AGE), qui a des incidences nutritionnelles favorables et des effets physiologiques bénéfiques dans la prévention des maladies coronariennes et le cancer (**Oomah et al., 2000**). C'est un acide gras essentiel indispensable à la structure des membranes de cellules et agit sur l'équilibre des réactions physiologiques dans l'organisme. Ce sont les précurseurs de certaines molécules qui alimentent les réactions inflammatoires ; leur présence en quantité suffisante s'avère capitale et ceci dans le cas où ils ne sont pas suffisamment équilibrés par une présence suffisante d'acides gras oméga-6.

La qualité des huiles peut être déterminée par le rapport  $\Sigma$  Acides Gras Insaturé /  $\Sigma$  Acides

Gras Saturé (**Ramadan et Mörsel, 2006**). Les rapports de l'huile du pistachier lentisque sont de l'ordre de **2.97** pour les fruits rouges et **2.13** pour les fruits noirs. Un rapport élevé confère à l'huile une plus grande stabilité à l'auto-oxydation et une valeur nutritionnelle importante (**Ryan et al, 1998 ; Abaza et al, 2003**).

Les fruits de *P. lentiscus* (L.) sont riches en huile ; ils peuvent être utilisés comme source d'huile végétale (**Karlenskind, 1992**). Cette huile possède une composition chimique riche acide gras et qui est proche à celle d'autre huile végétale comme l'huile d'olive (**Codex Alimentarius, 2003**), l'huile de Tournesol (**Chekroun, 2013**) et l'huile de soja (**Khiari, 2017**).

Cette huile peut être utilisée pour des fins nutritionnelles comme une source intéressante d'oméga 6 et oméga 9.

#### ➤ **Indice de peroxydabilité**

L'indice de peroxydabilité ou de peroxydation a été calculé en se basant sur la composition en acides gras de l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) (**Tab. 15**). Cet indice est de **26.70%** et **18.82%** respectivement pour l'huile extraite des fruits rouges et des fruits noirs. Une valeur de 36,21% est trouvée pour l'huile issue des fruits rouges collectés dans la région de Bainem, contre 26,42% pour l'huile issue des fruits rouges et 22,3% pour l'huile issue des fruits noirs de Médéa par **Arabi, (2017)**. Les résultats de notre étude relèvent que l'huile de *P. lentiscus* (L.) est stable. Un fruit a un indice de peroxydabilité d'autant plus faible que sa maturation est achevée. Donc, l'huile des fruits mûrs est de meilleure qualité que celle des fruits non murs.

#### **II.8.1.2.3.2. Teneur en phosphatides**

La teneur en phosphatides est faible ; elle est respectivement de **0.52±0.007 %** et **0.68±0.001%** pour l'huile fixe extraite des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) (**Tab. 16**). Ces valeurs sont comparables à celles trouvées pour l'huile de sésame et l'huile d'olive (**Tir, 2005 ; Aberkan, 1992**). Elles sont relativement faibles comparée à l'huile des graines de (1.3%) et de *Pinus pinea* 2,4% (**Louni, 2009 ; Benseghier et Khamed, 2014**). Une teneur élevée en phosphatides n'est pas souhaitable, car elle confère à l'huile un goût désagréable. De plus, les phosphatides sont souvent liés à des métaux ( $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ) catalyseurs d'oxydation provoquant ainsi l'acidification de l'huile (**Louni, 2009**).

#### **II.8.1.2.3.3. Teneur en insaponifiables**

Les matières insaponifiables d'un corps gras représentent l'ensemble des produits présents après saponification par un hydroxyde alcalin. Cet ensemble est formé par des constituants naturels extraits des matières grasses tels que les stérols, tocophérols, alcools aliphatiques supérieurs, pigments et hydrocarbures naturels (**Bereau, 2001**).

La teneur en matières insaponifiables de l'huile fixe des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de respectivement de **1.54±0.03%** et **1.46±0.01%** (**Tab.16.**) Malgré sa faible teneur, la fraction insaponifiable revêt une importance capitale à cause des composés nobles (tocophérols, stérols et composés phénoliques) qu'elle contient (**Rahmani, 2007**). Nos résultats restent dans les normes, qui sont généralement comprises entre 0.3 et 1.5% (**Karleskind, 1992**).

**Tableau n°16** : Teneur en phosphatides et en insaponifiables de l'huile fixe extraite des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) après extraction par l'hexane. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

	Phosphatides en %	Insaponifiables en %
<b>Fruits rouges</b>	0.520±0.007	1.54±0.03
<b>Fruits noirs</b>	0.680±0.001	1.46±0.01

Le taux d'insaponifiable se rapproche de celui trouvé pour les fruits murs de *P. lentiscus* collecté dans la région de Skikda (**Boukeloua et al., 2012**) et de celui de l'huile de lentisque de la région de Mila (**Belfadel, 2009**). La baisse en taux d'insaponifiables peut s'expliquer soit par une dégradation partielle des composés insaponifiables au cours de l'extraction, soit par une augmentation des composés non glycéridiques extraits (pigments, chlorophylle) (**Bereau, 2001**).

#### **II.8.1.2.3.4. Teneurs en pigments de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs *P. lentiscus* (L.)**

Les colorants naturels ou pigments d'origine végétale, forment une gamme très étendue de nuances (du jaune au bleu, en passant par le vert et même le noir). La chlorophylle, le lycopène et le β-carotène sont parmi les colorants les plus rencontrés et les plus utilisés dans les industries agroalimentaires. A des doses réglementées, ils sont bénéfiques pour la santé. Certains d'entre eux sont connus pour leurs activités antioxydantes, antimutagènes, voire anticarcinogènes (**Kamat et al., 2000 ; Bouchet et al., 2005 ; Ben Mansour et Tlemcani, 2009**).

#### **✚ Teneur en chlorophylle**

L'évolution de la teneur en chlorophylles renseigne sur les substances colorantes contenues dans l'huile. L'huile de lentisque extraite des fruits rouges non murs renferme une teneur plus importante en chlorophylle (**8.52±0.04mg/Kg**) par rapport à celle extraite à partir des fruits murs noirs (**4,32±1.02mg/Kg**) (**Tab.17**).

Ces différences, sont liées au degré de maturité des fruits du lentisque. En effet, la concentration en chlorophylles est élevée au début de la maturité des fruits puis se dégradent rapidement. Cette diminution est due à la dégradation de la chlorophylle en phéophytines qui confèrent à l'huile sa couleur jaune (Psoiadou et *al.*, 2001 ; Ait Yacine, 2001). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés dans la littérature (Bougherara Merzougui et *al.*, 2014 ; Bouamara et Haddad, 2016).

La chlorophylle est liée aux phénomènes oxydatifs par leurs actions catalytiques, pro-oxydantes en présence de la lumière et antioxydantes à l'obscurité (Grati Kammoun, 1999).

Des faibles teneurs sont souhaitées pour éviter l'action pro-oxydante des pigments chlorophylliens pour assurer ainsi une bonne conservation des huiles (Kiritsakis et *al.*, 1987).

**Tableau n°17** : Teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes de l'huile fixe extraite des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

	Chlorophylles (mg/Kg)	Caroténoïdes (mg/kg)
Fruits rouges	8.52 $\pm$ 0.04	5.06 $\pm$ 0.11
Fruits noirs	4,32 $\pm$ 1.02	24,910 $\pm$ 0.001

#### Teneur en caroténoïdes

La concentration en caroténoïdes varie non seulement avec les espèces mais aussi avec les variétés de plantes, les facteurs environnementaux (la lumière, le sol, le degré de maturation, le climat, l'origine géographique et les conditions de culture) et les conditions de conservation et de stockage. En effet, l'exposition à la lumière et à des températures élevées favorise la dégradation des caroténoïdes (Rodriguez-Amaya, 2001 ; Dias et *al.*, 2009). La teneur en ce pigment dépend du stade de maturité du fruit, du processus d'extraction, des conditions du stockage, de la méthode de cueillette, et de l'âge de l'huile (Fedeli, 1977 ; Kiritsakis et Dugan, 1985 ; Ramdan et Mörsel, 2003).

L'huile de lentisque extraite à partir des fruits noirs a une teneur en caroténoïdes de **24,91 $\pm$ 0.001mg/Kg**. Cette teneur est plus importante que celle de l'huile extraite à partir des fruits rouges (**5.06 $\pm$ 0.11mg/Kg**) (Tab.17). Les caroténoïdes sont impliqués dans les mécanismes d'auto-oxydation et de photo-oxydation. En effet, le  $\beta$ -carotène, les xanthophylles (zeaxanthine et violaxanthine) agissent comme protecteur en désactivant l'oxygène singulier produit par les chlorophylles, et de ce fait c'est un inhibiteur de la photo-oxydation (Rahmani M., 1989). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés dans la littérature (Bouamara et Haddad, 2016 ; Meznia et *al.*, 2014 ; Bougherara Merzougui, 2014).

Nos résultats ont montré que les huiles étudiées ont une valeur nutritionnelle importante

puisqu'elles renferment des acides gras essentiels comme l'acide oléique et l'acide linoléique, une faible teneur en phosphatides ce qui confère une odeur agréable à nos huiles et une faible quantité de matières insaponifiables qui revêt une importance grâce à ces composés nobles (tocophérols, stérols et composés phénoliques).

## II.9. Détermination de la teneur en composés phénoliques des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.) par spectrophotométrie

Les différents extraits bruts, obtenus par extraction solide-liquide, ont été analysés par spectrophotométrie UV-visible. Les quantités de polyphénols et de flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'étalon utilisé par milligramme d'extrait (mg EE/mg d'extrait) et déterminés par l'équation de type :  $y = a x + b$ .

### II.9.1. Teneur en polyphénols totaux

Les concentrations totales en polyphénols sont estimées à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (**Fig.1, Annexe**). Une grande variabilité du taux des polyphénols a été observée non seulement dans les différents extraits issus d'un même organe en utilisant différents solvants, mais aussi entre les différents organes. Les teneurs les plus importantes en polyphénols sont trouvées dans les fruits noirs suivi des fruits rouges, des feuilles et enfin des branches (**Tab. 18**). La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a déjà été rapportée (**Gehin et al., 2006 ; Falleh et al., 2007 ; N'Guessan et al., 2011 ; El-Haci et al., 2012 ; Kanoun et al., 2014 ; Beddou, 2015**).

L'essentiel de ces métabolites sont accumulés dans les feuilles et les fruits du pistachier. La teneur en phénols totaux des fruits noirs est plus importante que celle des fruits rouges, en raison de l'accumulation maximale d'anthocyanes et de flavonols pendant le stade de maturation (**Gerasopoulos et Stavroulakis, 1997 ; Zadernowski et al., 2005**).

**Tableau n° 18 :** Teneur en polyphénols totaux (TPT) des extraits des différentes parties de *P. lentiscus* (L.), exprimé en mg EAG/g d'extrait. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

	Branches	Feuilles	Fruits	
			Rouges	Noirs
<b>Ext méthanolique</b>	231.98 $\pm$ 0.01	898.22 $\pm$ 1.52	1292.79 $\pm$ 0.95	1351.00 $\pm$ 0.69
<b>Ext éthanolique</b>	196.69 $\pm$ 0.02	571.57 $\pm$ 0.58	955.280 $\pm$ 0.125	1171.17 $\pm$ 0.14
<b>Ext aqueux</b>	170.26 $\pm$ 0.78	450.04 $\pm$ 0.05	640.23 $\pm$ 1.12	736.78 $\pm$ 0.11
<b>Ext acétonique</b>	91.17 $\pm$ 0.04	266.66 $\pm$ 0.02	272.52 $\pm$ 0.05	544.140 $\pm$ 0.080
<b>Ext hexanique</b>	30.03 $\pm$ 0.14	60.81 $\pm$ 0.25	82.70 $\pm$ 0.03	185.58 $\pm$ 0.09

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Le réactif de Folin – Ciocalteu n'étant pas spécifique aux polyphénols mais aux composés aromatiques, de nombreux composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux de phénol apparent plus élevé (**Tawaha et al., 2007**).

Le taux de polyphénols obtenu au niveau des extraits méthanoliques des différents organes de *P. lentiscus* (L.) est plus élevé que celui des extraits éthanoliques, aqueux, acétoniques et hexaniques des mêmes organes. Le méthanol est le solvant le plus performant pour l'extraction des polyphénols avec des valeurs allant de **231.98±0.01mgEAG/g** jusqu'à **351±0.69 mg EAG/g d'extrait**.

Les extraits éthanoliques sont également riches en polyphénols mais à un degré moindre (**Tab. 18**). L'éthanol est aussi un solvant efficace pour l'extraction des polyphénols et c'est le solvant le moins nocif pour l'homme (**Dai et al., 2010**).

En règle générale, la solubilité des composés phénoliques dépend principalement de la polarité du solvant d'extraction, du degré de polymérisation des molécules à extraire, de la longueur des chaînes carbonés et du nombre et de la position des groupements hydroxyles (**Naczki et Shahidi, 2004 ; Iloki-Assanga et al., 2015**). L'interaction possible de ses molécules de base avec d'autres constituants et la formation probable de complexes insolubles peuvent aussi influencer la solubilisation de ces composés (**Djeridane et al., 2006**).

Ces résultats ont clairement montré l'influence du solvant sur l'extractibilité des composés phénoliques ; le méthanol peut être considéré comme le solvant le plus efficace pour l'extraction des molécules polaires. Pour les extraits hexaniques, de faibles teneurs en composés phénoliques ont été enregistrées. La faible teneur en polyphénols de ces extraits est probablement due, aux propriétés des polyphénols qui sont généralement solubles dans les solvants polaires (méthanol, éthanol) et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (chloroforme et hexane) (**Macheix et al., 2005**). En outre, les solvants polaires peuvent être plus appropriés pour inhiber l'oxydation des lipides par rapport aux solvants moins polaires.

La richesse du *P. lentiscus* (L.) en polyphénols a été également confirmée par d'autres travaux, des rendements plus faibles que nos résultats sont rapportés (**Gardeli et al., 2015 ; Missoun et al., 2017 ; Haggani, 2017**). Ce qui peut être attribuée à la technique d'extraction utilisée dans ces études (macération) contrairement à la méthode de Soxhlet utilisée dans notre étude. La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés phytochimiques existants dans le matériel végétal (**Quy Diem Do et al., 2014**). Le solvant d'extraction utilisé (l'éthanol) ainsi que d'autres facteurs tels que le climat (la Grèce).

La teneur en composés phénoliques de l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs

(extraits hexaniques) de *P. lentiscus* (L.), est faible ; elle est de **82.70±0.03** et **185.58±0.09 mg EAG/g** d'huile respectivement pour les fruits rouges et fruits noirs (**Tab. 18**). En général, l'huile du pistachier lentisque est pauvre en composés phénoliques (**Bensaci et Hadj Mokhnache, 2015 ; Bouamara et Haddad, 2016**).

Lors de l'extraction de l'huile, les polyphénols passent du fruit vers l'huile et sont considérés comme des antioxydants naturels qui protègent l'huile contre l'oxydation ; ils lui confèrent une meilleure stabilité lors du stockage, une saveur amère et une sensation de piquant (**Tanouti et al., 2011 ; Ollivier et al., 2004**).

Les extraits de branches, feuilles et des fruits de *P. lentiscus* (L.) sont riches en composés phénoliques : des différences quantitatives ont été enregistrées comparativement à ceux rapportés dans la littérature (**Arab et al, 2014 ; Zitouni, 2017**). Ces différences peuvent être attribuées à l'origine géographique de la plante et/ou bien aux méthodes d'extraction utilisées (**Apak et al., 2007**).

### II.9.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalent quercétine à l'aide d'une courbe étalon (**Fig.2, Annexe**).

Nos résultats montrent que les flavonoides sont présents dans tous les extraits avec des concentrations différentes (de **3.82±0.14** à **± 47.701±0.02mg Eq Q/g d'extrait**) selon l'organe de la plante utilisée et le solvant utilisé pour l'extraction (**Tab. 19**).

**Tableau n°19.** Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *P. lentiscus* (L.), exprimé mg EQ/g d'extrait. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

	Branches	Feuilles	Fruits	
			Rouges	Noirs
<b>Extraits méthanolique</b>	28.840±0.082	15.48±0.30	16.18±0.48	18,6±0.72
<b>Extrait éthanolique</b>	23.352±0.110	15.47±0.05	13.40±0.35	16.89±0.38
<b>Extrait aqueux</b>	20.43±0.02	5.87±0.11	6.16±0.10	12.84±0.07
<b>Extrait acétonique</b>	47.701±0.020	19.04±0.25	23.38±0.03	31.40±0.40
<b>Extrait hexanique</b>	19.24±0.22	3.82±0.14	4.86±0.23	5.20±0.11

Quel que soit la partie de la plante utilisée, l'acétone et le méthanol restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes suivis de l'éthanol, de l'eau puis de l'hexane. Pour l'extrait acétonique, les branches enregistrent un maximum de flavonoïdes (**47.701±0.02 mg Eq Q/g d'extrait**) suivi des fruits noirs (**31.40±0.4 mg Eq Q/g d'extrait**) et des fruits rouges (**23.38±0.03 mg Eq Q/g d'extrait**) tandis que les feuilles renferment la teneur la plus faible en

flavonoïdes (**19.04±0.25 mg Eq Q/g d'extrait**).

Les teneurs en flavonoïdes sont toujours plus faibles que celles des composés phénoliques totaux; nos extraits contiennent donc des composés phénoliques autres que les flavonoïdes (acides phénoliques, tanins...). Dans notre étude, une teneur en flavonoïdes de **28.840±0.082, 15.48±0.30 et 18,6±0.72 mg EQ/g** d'extrait méthanolique, est trouvée respectivement pour les branches, feuilles et fruits de Pistachier lentisque. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par différents chercheurs (**Cherbal et al., 2012 ; Cheurfa, 2015 ; Bouriche et al., 2016**), mais ils sont différents de ceux rapportés par **Zitouni et al. (2016)**. Cette différence trouve son explication dans la technique d'extraction (macération) et probablement dans la différence en standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

L'huile de lentisque a une faible teneur en flavonoïdes avec une teneur de **4.86±0.23 et 5.20±0.11 mg Eq Q/g** d'extrait respectivement pour l'huile extraite des fruits rouges et celle extraite des fruits noirs (**Tab.19**). Des différences quantitatives ont été trouvées comparativement à ceux trouvés dans la littérature (**Bouamara et Haddad, 2016 ; Bensaci et Hadj Mokhnache, 2015**). Ces différences peuvent être dues aux méthodes et aux solvants d'extraction utilisées, à la qualité des standards utilisés pour le dosage des flavonoïdes. La méthode de conservation des plantes et d'exposition à la lumière peuvent aussi affecter la teneur en flavonoïdes car ils sont sensibles à l'oxydation ; en effet, ils ont tendance à former des polymères donnant ainsi des tannins condensés (**Manach et al., 2004**).

La méthode de dosage des flavonoïdes totaux par spectrophotométrie sous-estime la teneur réelle des flavonoïdes totaux car tous les certains flavonoïdes ne réagissent pas avec le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) (**M'hiri, 2015**).

Des teneurs élevées en phénols ne sont pas toujours accompagnées par des teneurs élevées en flavonoïdes (**Lizcano et al., 2010**).

Les résultats de notre étude montrent que les différents organes de *P. lentiscus* (L.) sont très riches en polyphénols et en flavonoïdes.

## **II.10. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.)**

Différentes méthodes permettent de déterminer « in vitro » le pouvoir antiradicalaire dans les composés purs ou dans les extraits de plantes. Dans ce travail, trois méthodes différentes, tests au DPPH et à l'ABTS et la mesure du pouvoir réducteur, ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.).

### II.10.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

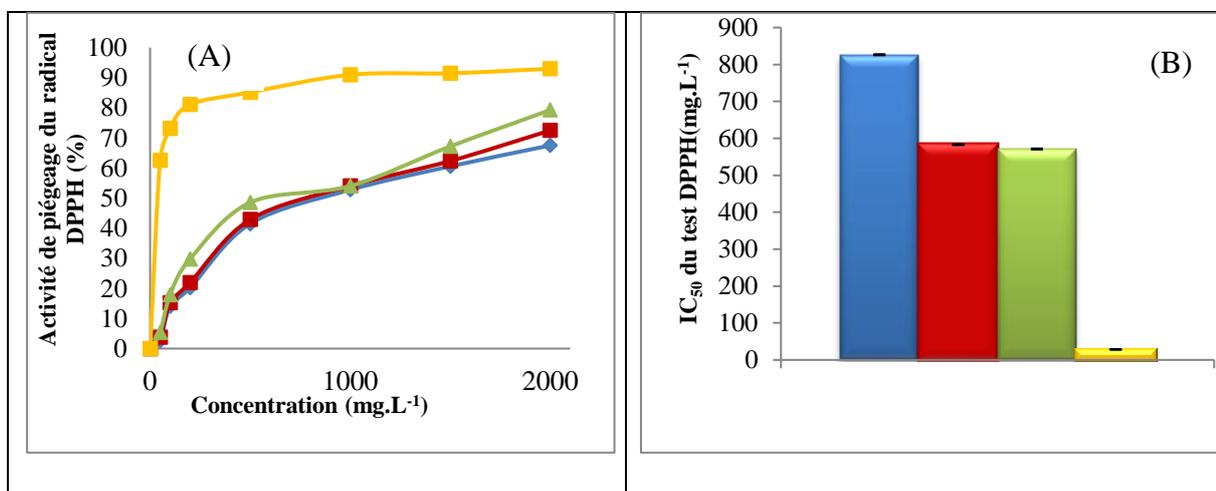
Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité et de sa simplicité d'analyse (Bozinet *al.*, 2008). Cette méthode est largement utilisée pour sa fiabilité et répétabilité (Siddhuraju, 2007)

Le radical DPPH est en condition normale violet foncé. Sa couleur passe au jaune pâle lorsqu'il est réduit par les composés antioxydants qui lui donnent un proton ou un électron diminuant son absorbance à 517nm (Guessan *et al.*, 2007). Un antioxydant standard, le BHT, a été utilisé afin de pouvoir comparer nos résultats.

#### II.10.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

L'activité de piégeage est dépendante des concentrations pour les trois huiles essentielles étudiées ainsi que pour le BHT. L'augmentation du pourcentage d'inhibition est proportionnelle à la concentration de la solution. Pour une concentration de  $100 \text{ mg. L}^{-1}$ , les valeurs enregistrées sont de  $14.060 \pm 0.046\%$ ,  $15.19 \pm 0.25\%$ ,  $17.88 \pm 0.46\%$  et  $73,15 \pm 0.85\%$  respectivement, pour l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges, fruits noirs et le BHT. Les huiles essentielles des fruits rouges et des fruits noirs ont montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH supérieur à celui de l'huile essentielle des feuilles/branches (Fig.24).

L'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées et du BHT a aussi été exprimée en  $IC_{50}$ . L' $IC_{50}$  est défini comme étant la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH. L' $IC_{50}$  est déterminée graphiquement par régression linéaire du graphe tracé (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des trois huiles essentielles testées et du BHT).



**Figure n°24 :** Activité de piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle des feuilles/ branches (FB) ■, fruits rouges (FR) ■ et fruits noirs (FN) ■ de *P. lentiscus* (L.) et le BHT ■ (A) et Valeurs de l' $IC_{50}$  du test de DPPH de l'huile essentielle des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) et du BHT (B).

Comparé au BHT utilisé comme antioxydants standard, les huiles essentielles testées possèdent une faible activité antioxydante. Le contrôle positif BHT est le plus fort antioxydant avec une valeur  $IC_{50}$  de **28.24±0.20 mg. L<sup>-1</sup>**. L'huile essentielle des fruits rouges et de fruits noirs ont les activités antioxydantes les plus fortes avec des valeurs  $IC_{50}$  de **583,19±1.50** et **571.22±1.40 mg. L<sup>-1</sup>** respectivement et l'huile des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) a l'activité antioxydante la plus basse avec une valeur d' $IC_{50}$  de **826,13±1.71 mg.L<sup>-1</sup>**. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Atoui et al., 2005). Oke et al. (2009), attribuent les différences d'intensité de piégeage des radicaux libres par les huiles essentielles à leur composition chimique. Les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables d'une forte activité antioxydante. Toutefois, les composés minoritaires peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Lu et al., 2001 ; Sing et al., 2006). L'activité de piégeage du radical DPPH de l'huile essentielle extraite des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) peut être expliquée par sa forte teneur en monoterpènes.

Les huiles essentielles riches en composés non phénoliques ont également des potentiels antioxydants (El-Massry et al., 2002). Les activités antioxydantes des huiles essentielles impliquent plusieurs classes de terpènes. Les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés fournissent des propriétés redox aux huiles essentielles et par conséquent des potentialités antioxydantes (Ruberto et Baratta, 2000 ; Wang et al., 2008 ; Moghaddam et al., 2015).

Les huiles essentielles des feuilles de *P. lentiscus* (L.), possèdent une activité radicalaire importante avec des  $IC_{50}$  qui se situent entre de 0.39 mg/ml à 270.65 mg/ml (Benhammou, et al. 2008 ; Gourine et al., 2010 ; Barchouch et al., 2013 ; Aouitni et al., 2014 ; Aissi et al., 2016 ; Hamiani et al., 2016 ; Medjiken, 2017).

Les huiles essentielles du *Pistachier lentisque* étudiées possèdent une activité antioxydante très faible en comparaison avec celle du BHT qui est un antioxydant puissant mais elles peuvent être utilisées comme conservateur dans les produits alimentaires et comme agents préventifs contre diverses maladies, dont les maladies liées au stress oxydatif, les risques d'utilisation étant beaucoup plus faibles que ceux des antioxydants de synthèse.

Les activités des huiles essentielles comme les antioxydants ne dépendent pas seulement de leurs caractéristiques structurales, mais aussi d'autres facteurs tels que la concentration, la température, la lumière, le type de substrat et l'état physique du système, ainsi que sur des microcomposants agissant comme des pro-oxydants ou des synergistes (Yanishlieva et al., 2001).

### II.10.1.2. Activité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> des extraits non volatils de *P. lentiscus* (L.)

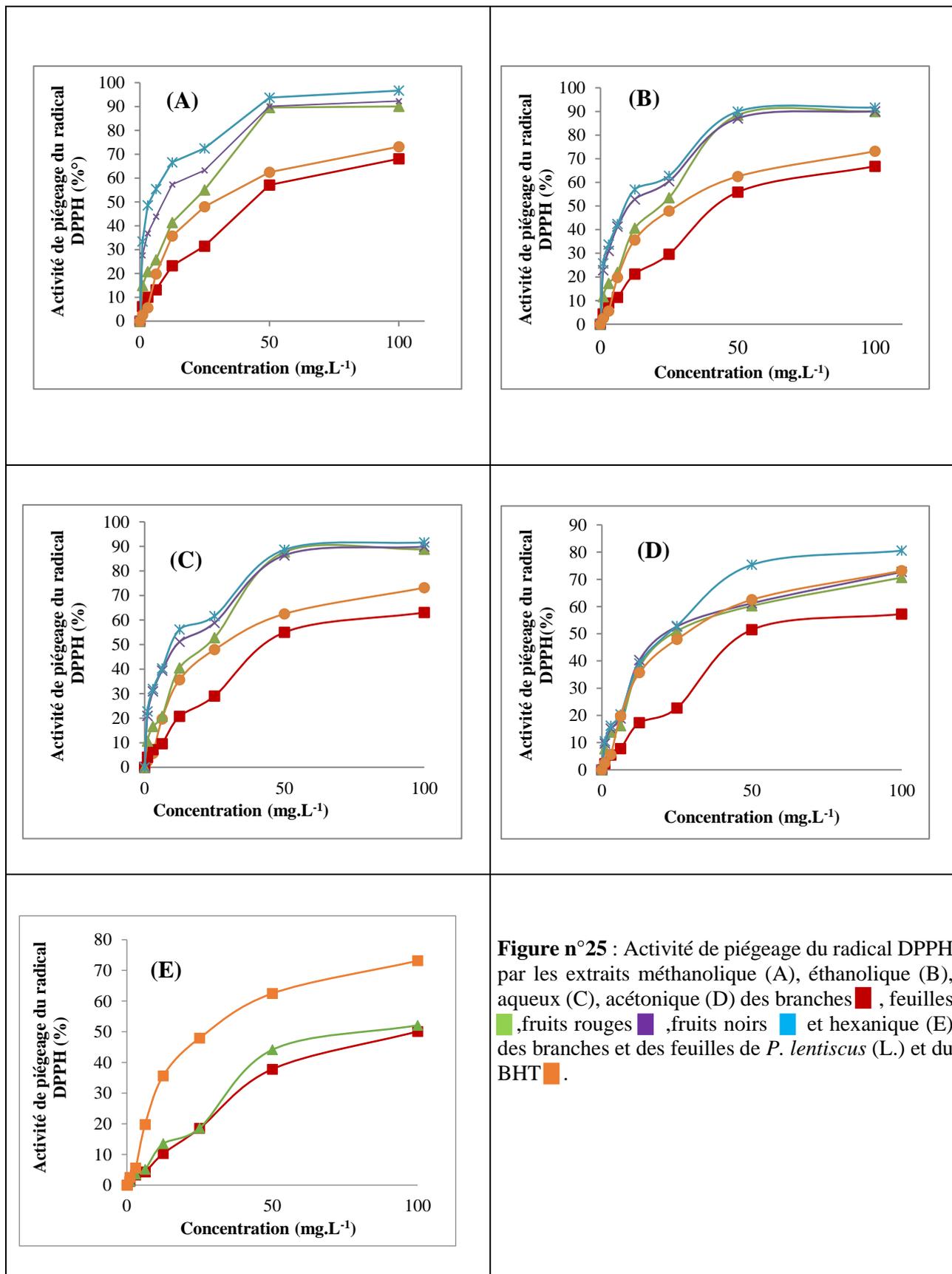
Tous les extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.) présentent une très bonne efficacité de piégeage du radical libre DPPH (Fig. 25). En effet, même à de faibles doses, les extraits non volatils obtenus ont un pouvoir antioxydant. Ainsi, à des concentrations de 100 mg.L<sup>-1</sup>, l'extrait méthanolique des feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) présente une activité supérieure à celle du BHT avec un pourcentage de **90.02±0.84%**, **92.28±0.18%**, **96.75±0.22%** et **73.15±0.85%** respectivement pour les feuilles, fruits rouges, fruits noirs et le BHT. L'extrait méthanolique des branches présente une activité antioxydante la plus faible avec un pourcentage d'inhibition de **68.06±0.58%** (Fig. 25A).

L'IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé ou d'une HE, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50% (Tab.26). Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante est grande (Benabdelkader, 2012).

L'extrait méthanolique des feuilles, fruits rouge et des fruits noirs révèlent la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux autres extraits, avec des IC<sub>50</sub> de **12.850 ±0.008**, **6.56±0.06** et **3.95±0.59 (mg.L<sup>-1</sup>)** respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celle du BHT (**28.24 ±0.20mg.L<sup>-1</sup>**). La plus faible capacité antioxydante a été enregistrée dans l'extrait hexanique des branches avec une IC<sub>50</sub> de **43.79±0.39 mg.L<sup>-1</sup>**.

De même, pour une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup>, l'extrait éthanolique des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) a une activité supérieure à celle du BHT avec un pourcentage de **89.78±0.43%**, **90.05±0.43%** et **91.69±0.62%**, l'extrait éthanolique des branches a le pourcentage d'inhibition le plus faible avec **66.83±0.15%** (Fig.25B). Des faibles valeurs d'IC<sub>50</sub> sont enregistrés, **7.16±0.04 mg. L<sup>-1</sup>** pour les fruits noirs, **9.12±0.06mg.L<sup>-1</sup>** pour les fruits rouges, **14.16±0.01mg.L<sup>-1</sup>** pour les feuilles et **44.73±0.04mg.L<sup>-1</sup>** pour les branches ; ces valeurs sont proches de celles des extraits méthanoliques.

L'extrait aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) à **100 mg. L<sup>-1</sup>** a lui aussi une activité supérieure à celle du BHT avec un pourcentage d'inhibition de **88.83±0.78%**, **89.88±0.43%** et **91.65±0.24%** alors que celui des branches présente un pourcentage plus ou moins faible de **63.04±0.63%** (Fig.25C). Les extraits aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs ont également une forte activité de piégeage du radical DPPH avec des IC<sub>50</sub> de **14.71±0.28mg.L<sup>-1</sup>**, **9.12±0.06 mg. L<sup>-1</sup>** et **7.93±0.07mg.L<sup>-1</sup>**, respectivement ; Ces valeurs sont inférieures à celle du BHT. L'extrait des branches présente une faible activité par rapport aux autres parties étudiées avec une IC<sub>50</sub> de **45.48±0.19 mg. L<sup>-1</sup>** (Tab.20).



**Figure n°25 :** Activité de piégeage du radical DPPH par les extraits méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) des branches ■, feuilles ■, fruits rouges ■, fruits noirs ■ et hexanique (E) des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.) et du BHT ■.

Des pourcentages d'inhibition supérieurs à celui de BHT ont été enregistrés pour l'extrait acétonique des fruits noirs, alors que celui des branches, des feuilles et des fruits rouges ont un

pourcentage d'inhibition respectivement de **80.53 ± 0.21%**, **57.25±0.1%** et **70.65±0.16%** inférieur à celui du BHT, pour une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup> (**Fig.25D**). Les extraits des fruits noirs (**18.5±0.026 mg. L<sup>-1</sup>**), des fruits rouges (**24.94±0.08 mg. L<sup>-1</sup>**) et des feuilles (**24.35±0.13 mg. L<sup>-1</sup>**) ont la capacité la plus importante à piéger le radical libre DPPH, Cependant, l'extrait acétonique des branches révèle la plus faible capacité de piégeage du radical libre DPPH avec **48.55±0.25mg.L<sup>-1</sup>** d'IC<sub>50</sub>.

L'extrait hexanique des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.) présente également un pourcentage d'inhibition inférieur à celui du BHT respectivement de **50.11±0.14%** et **52.11±0.08%**(**Fig.25E**). Ces extraits présentent le plus faible pouvoir de piégeage du radical DPPH par rapport à tous les extraits des autres parties avec des IC<sub>50</sub> de **99.78±0.28 mg. L<sup>-1</sup>** et **84.18±0.065 mg. L<sup>-1</sup>** respectivement (**Tab. 20**).

Les extraits des fruits noirs possèdent l'activité anti-radicalaire la plus élevée, suivie de ceux des fruits rouges, des feuilles et en dernier viennent les extraits des branches avec une activité antioxydante la plus faible quelque que soit le solvant utilisé. Selon nos résultats, l'effet de piégeage augmente avec la concentration des polyphénols dans l'extrait.

Les extraits méthanoliques présentent la capacité antioxydante la plus élevée suivie des extraits éthanoliques, aqueux, acétoniques et en dernier viennent les extraits hexaniques. La nature du solvant affecte de façon significative l'activité anti-radicalaire. L'activité antioxydante d'un extrait peut être attribuée à la structure de ses composés actifs qui déterminent leur capacité à céder un proton (**Guelcin et al., 2004**), ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés.

**Tableau n°20** : Valeurs de l'IC<sub>50</sub> des différents extraits et du BHT dans le test du DPPH. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

	<b>Branches</b>	<b>Feuilles</b>	<b>Fruits rouges</b>	<b>Fruits noirs</b>
<b>Ext. Méthanolique</b>	43.79±0.39	12.850 ±0.008	6.56±0.06	3.95±0.59
<b>Ext. Ethanolique</b>	44.73±0.04	14.16±0.01	8.60±0.07	7.16±0.04
<b>Ext. Aqueux</b>	45.4 8±0.19	14.71±0.28	9.12±0.06	7.93±0.07
<b>Ext. Acétonique</b>	48.55±0.25	24.35±0.13	24.94±0.08	18.5±0.026
<b>Ext. Hexanique</b>	99.78±0.28	84.18±0.065	951.32±2.82	624.49±2.274
<b>BHT</b>	28.24 ± 0.20			

La différence du potentiel antioxydant entre les extraits testés peut être expliquée par la nature physico-chimique des composés présents dans les extraits et par la différence de sélectivité du solvant pour extraire certains groupes d'antioxydants (**Djeridane et al., 2006**).

De fortes activités des extraits de *P. lentiscus* avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> qui se situent entre 0.166 ±0.001 et 13,19±1,485 mg/ml ont déjà été signalés (**Ferradji, 2011 ; Admam et Boumendjel, 2017 ; Zitouni, 2017**).

Cette activité n'est pas une propriété d'un composé phénolique, mais elle est largement répartie entre les différentes familles des polyphénols, en particulier, flavonoïdes et les acides phénoliques, qui semblent être responsables de la capacité antioxydante. La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques qui comportent un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxyles, des noyaux phényles capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (**Calliste et al., 2001 ; Torres de Pinedo et al., 2007 ; Wojdyło et al., 2007**).

Une forte corrélation est observée entre la teneur en polyphénols totaux contenu dans l'extrait méthanolique, éthanolique, acétonique des différents organes (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test de DPPH, avec des coefficients de corrélation **R<sup>2</sup> = 0.9596, R<sup>2</sup> =0.8141 et R<sup>2</sup> =0.7307**. La corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux est plus faible (**R<sup>2</sup> = 0,6436**); par contre, il n'y a pas de corrélation avec l'extrait hexanique (**R<sup>2</sup> =0.2723**). Les composés phénoliques sont donc les principaux métabolites responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) sauf pour l'extrait hexanique ou cette activité peut être attribuée à d'autre constituants.

De même, une forte corrélation est observée entre la teneur en flavonoïdes totaux contenu dans l'extrait méthanolique, éthanolique, aqueux des différents organes (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test de DPPH, avec des coefficients de corrélation **R<sup>2</sup>=0.8436, R<sup>2</sup>=0.8532 et R<sup>2</sup>=0.9033**. La corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux est plus faible (**R<sup>2</sup> = 0,6589**) ; par contre il n'y a pas de corrélation pour l'extrait hexanique (**R<sup>2</sup> =0.2293**). Les flavonoïdes sont également responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) sauf pour l'extrait hexanique ou cette activité peut être attribuée à d'autre constituants.

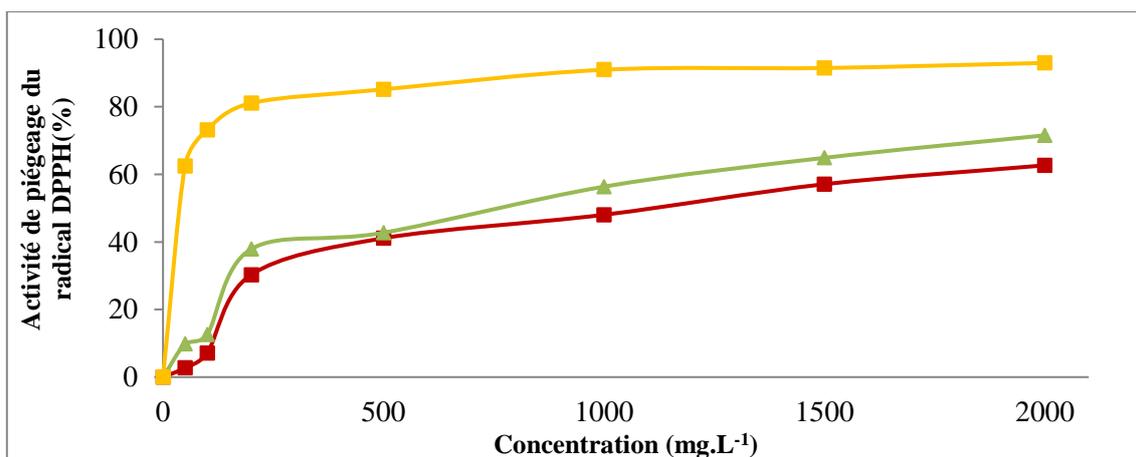
Le pouvoir de piégeage des HE et des extraits du pistachier lentisque augmente proportionnellement avec la concentration ; Cependant l'effet antiradicalaire des extraits non volatils est nettement supérieur à celui des huiles essentielles.

### II.10.1.3. Activité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

L'huile fixe des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) possèdent une activité antioxydante concentration dépendante ; le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente au fur et à mesure que les concentrations de l'huile de lentisque et du BHT augmentent.

L'extrait hexanique (huile fixe) des fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) présente une activité nettement inférieure à celle du BHT avec un pourcentage d'inhibition de **7.13±0.01 %**, **12.56±0.24%** et **73.15±0.85%** respectivement pour une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup> (**Fig. 26**).

Les huiles fixes du pistachier lentisque ont des différences significatives dans leur capacité de piégeage du radical libre par rapport au BHT (**Fig. 26**). L'huile extraite des fruits noirs étant plus active que l'huile fixe issue des fruits rouges avec une IC<sub>50</sub> de **624.490±2.274 %** et **951.32±2.82%**, respectivement. L'activité antioxydante des deux huiles fixes de *P. lentiscus* (L.) sont moins efficaces que celle de la substance de référence (BHT).



**Figure n°26** : Activité de piégeage du radical DPPH par l'huile fixe des fruits rouges ■, fruits noirs ▲ de *P. lentiscus* (L.) et du BHT ■.

Les huiles fixes de *P. lentiscus* (L.) possèdent une bonne activité antioxydante vis-à-vis le radical DPPH à concentration de (1000 mg.L<sup>-1</sup>) avec un pourcentage d'inhibition de **48.03±0.15%** et **56.35±0.31%** respectivement pour l'huile des fruits rouges et des fruits noirs mais cette activité est faible par rapport à celle de BHT dont le pourcentage d'inhibition est de **90.96±0.35%**. Cette activité peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs qui possèdent un pouvoir antioxydant puissant comme les polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes. La différence enregistrée entre les activités antioxydantes des huiles étudiées suggère une différence dans leur composition et leur concentration en composés phénoliques

qui est de  $82.70 \pm 0.03$  et  $185.58 \pm 0.09$  mg EAG/ g d'ext respectivement pour les fruits rouges et les fruits noirs. La variation de l'activité antioxydante des huiles dépend de la nature des phénols qui varient au cours de la maturation des fruits (Grati-Kammoun et al.,1999). Les travaux antérieurs rapportent une activité antioxydante vis-à-vis le DPPH• avec un pourcentage d'inhibition de 55 à 77.67% (Bensaci et Hadj Mokhnache, 2015 ; Bouamara et Haddad,2016). Les différences observées peuvent être due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique ou bien des procédés d'extraction de l'huile. Les différences dans l'activité anti-radicalaire sont certainement liées à la nature et aux taux des composés bioactifs (Zitouni, 2017).

## II.10.2. Activité de piégeage du radical ABTS

Le radical cation (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique) (ABTS•+), de couleur bleu vert (absorbant à 734 nm), est formé par perte d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS en présence de persulfate de potassium (Re, 1999).

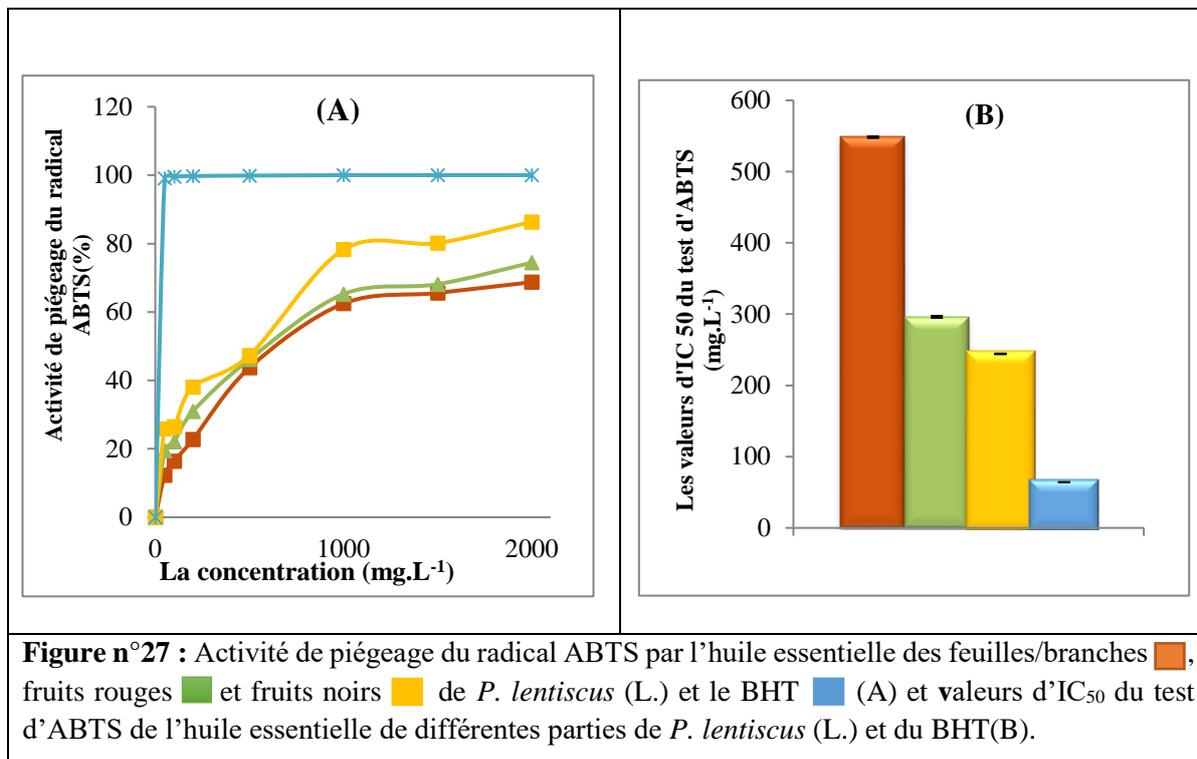
L'addition d'un antioxydant (donneur de H•) à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction, l'atome d'azote concerné piège un H•, conduisant à la formation de l'ABTS+, ce qui provoque la décoloration du mélange et une diminution de l'absorbance (Lien et al., 1999). L'un des avantages de l'ABTS est qu'il peut être solubilisé en milieu aqueux ou organique. Par conséquent, l'activité antioxydante de l'échantillon étudié pourra donc être due à des molécules hydrophiles ou lipophiles en fonction du solvant utilisé (Arnao, 2001).

### II.10.2.1. Activité de piégeage du radical ABTS de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

L'activité antioxydante de l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) étudiée par le test d'ABTS est exprimée par le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en huile essentielle et à travers la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> du radical ABTS.

L'activité de piégeage du radical ABTS par l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) ainsi que celle du standard (BHT) augmente proportionnellement avec l'augmentation des concentrations utilisées (Fig. 27 A).

Le BHT, antioxydant de synthèse a une forte activité même à de faibles concentrations par rapport aux huiles testées. Pour une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup>, les valeurs enregistrées sont de  $16.40 \pm 0.06\%$ ,  $22.04 \pm 0.1\%$ ,  $26.45 \pm 0.36\%$  et  $99.56 \pm 0.05\%$  respectivement pour l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges, fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) et le BHT.



L'huile essentielle des fruits noirs et rouges de *P. lentiscus* (L.) enregistre la plus forte activité de piégeage du radical ABTS mais elle est beaucoup plus faible par rapport à celle du BHT, avec des IC<sub>50</sub> de  $528.54 \pm 1.65 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $541.430 \pm 0.542 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $5.81 \pm 0.01 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivement alors que l'huile essentielle des feuilles/branches présente la plus faible activité antioxydante avec une IC<sub>50</sub> plus grande, qui est de  $642.63 \pm 2.86 \text{ mg.L}^{-1}$  (Fig. 27B). Cette activité est attribuée à la fois à la richesse de nos huiles essentielles en différents composés phénoliques, en monoterpènes oxygénés et en sesquiterpènes oxygénés qui fournissent des propriétés redox aux huiles essentielles et par conséquent des potentialités anti-oxydantes (Ruberto et Baratta, 2000 ; Wang *et al.*, 2008 ; Moghaddam *et al.*, 2015).

#### II.10.2.2. Activité de piégeage du radical ABTS des extraits non volatils de *P. lentiscus* (L.)

L'activité piégeage du radical ABTS est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits non volatils. Tous les extraits testés présentent une très bonne efficacité de piégeage du radical libre ABTS. En effet, même à de faibles doses, les extraits non volatils obtenus ont manifesté un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre ABTS. Ainsi, pour des concentrations de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , l'extrait méthanolique des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) présente une activité proche de celle du BHT avec un pourcentage de  $91.09 \pm 0.49\%$ ,  $93.94 \pm 0.21\%$ ,  $96.16 \pm 0.11\%$  et  $99.56 \pm 0.05\%$  respectivement pour les feuilles, fruits rouges, fruits noirs et le BHT.

L'extrait méthanolique des branches présente une activité antioxydante plus faible avec un pourcentage d'inhibition de **65.06±0.60%** (Fig.28A).

De même, pour une concentration de **100 mg. L<sup>-1</sup>** l'extrait éthanolique des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) présente une activité proche à celle du BHT avec un pourcentage de **88.47±0.08%**, **91.45±0.14%** et **92.53±0.061%**, l'extrait éthanolique des branches présente un pourcentage d'inhibition de **63.13±0.14%** (Fig.28B).

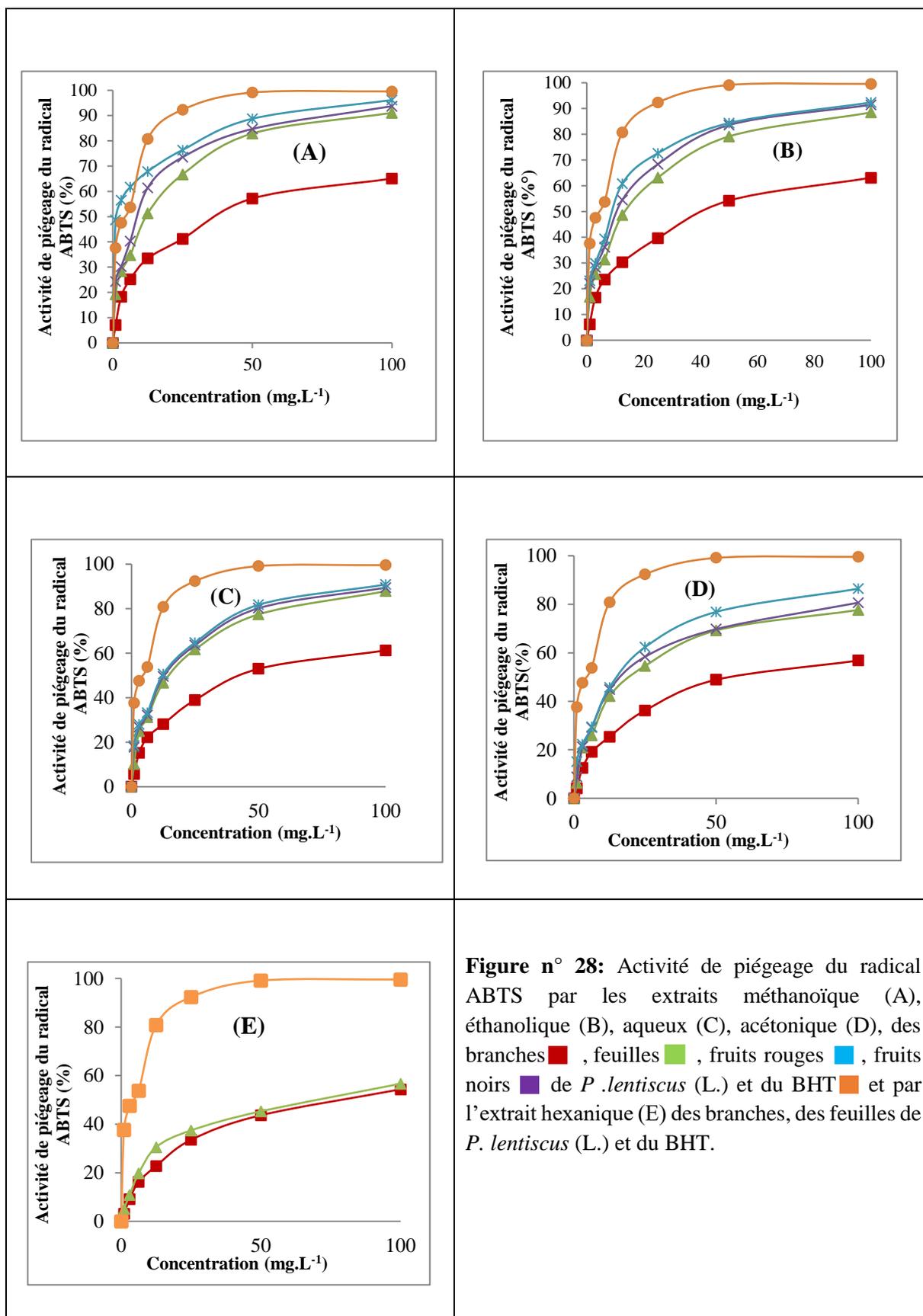
L'extrait aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) présente également une activité proche à celle du BHT avec un pourcentage de **87.83±0.14%**, **89.43±0.09%** et **90.85±0.1%** alors que les branches présentent un pourcentage plus faible de **61.25±0.12%** à une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup> (Fig.28C). Pour l'extrait acétonique, les pourcentages d'inhibition enregistrés sont inférieurs à celui de BHT pour les branches, les fruits les feuilles, les fruits rouges et les fruits noirs qui sont respectivement de **56.79±0.01%**, **77.64±.15%**, **80.64±0.18%** et **86.41±0.06%** à une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup> (Fig. 92 D). L'extrait hexanique des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.) présente également un pourcentage d'inhibition inférieur à celui du BHT avec respectivement **54.33.11±0.05%** et **56.65±0.21%** (Fig. 28E).

L'ABTS peut être solubilisé en milieu aqueux ou organique. Par conséquent, l'activité antioxydante de l'échantillon étudié pourra donc être due à des molécules hydrophiles ou lipophiles (Arnao, 2001). L'activité anti-ABTS<sup>+</sup> des échantillons dépend de leurs polarités ; ce sont les échantillons les plus polaires qui ont présentés les meilleures capacités antioxydantes, grâce à la présence de composés polaires doués d'un grand potentiel antioxydant, qui agissent comme des donneurs d'hydrogène ou d'électron. Elle dépend aussi de la structure chimique des composés phénoliques de nombre de OH ainsi que leur position (Montoro et al., 2004 ; Jayaprakaska et al., 2008).

La réduction en ABTS<sup>+</sup> est favorisée par la présence des composés électro-donneurs, possédant un potentiel rédox plus faible que celui du radical (Prior et al., 2005). L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur potentiel d'oxydo-réduction élevé, qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, et des désactivateurs d'oxygène singulet (Miguel, 2010).

Les extraits des fruits noirs possèdent l'activité anti-radicalaire la plus élevée, suivie de ceux des fruits rouges, des feuilles et en dernier viennent les extraits des branches quelque que soit le solvant utilisé. D'une façon générale, les extraits méthanoliques présentent la capacité antioxydante la plus élevée suivie des extraits éthanoliques, aqueux, acétoniques et en dernier

viennent les extraits hexaniques (**Fig.28 E**). Les extraits ayant montré des teneurs élevées en composés phénoliques se sont avérés les plus actifs avec des  $IC_{50}$  les plus faibles (**Tab. 21**).



L'extrait méthanolique des fruits noirs, des fruits rouges et des feuilles a une activité de piégeage du radical ABTS la plus élevée par rapport aux autres extraits, avec des  $IC_{50}$  de **1.600±0.017**, **7.075±0.067**, **9.480±0.091mg.L<sup>-1</sup>** respectivement. L'extrait méthanolique des fruits noir présente l'activité antioxydante la plus élevée avec une faible valeur d' $IC_{50}$  par rapport à celle du BHT (**5.81± 0.01 mg. L<sup>-1</sup>**) signe d'une très bonne activité antioxydante. La plus faible capacité antioxydante a été enregistrée dans l'extrait des branches ( **$IC_{50}$ = 36.80± 0.36 (mg.L<sup>-1</sup>)**).

**Tableau n°21** : Valeurs d' $IC_{50}$  dans le test d'ABTS des extraits étudiés et du BHT. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

	<b>Branches</b>	<b>Feuilles</b>	<b>Fruits rouges</b>	<b>Fruits noirs</b>
<b>Extrait méthanolique</b>	36.80± 0.36	9.480±0.091	7.075±0.067	1.600±0.017
<b>Extrait éthanolique</b>	46.09±0.18	11.320±0.075	8.650±0.051	7.57±0.31
<b>Extrait aqueux</b>	47.17±0.04	12.64±0.06	12.620±0.045	12.33±0.04
<b>Extrait acétonique</b>	71.39±0.11	18.69±0.07	16.18±0.01	12.82±0.11
<b>Extrait hexanique</b>	92.03±0.90	69.37±0.70	797.79±2.19	101.006±0.140
<b>BHT</b>		5.81± 0.01		

Pour les extraits éthanoliques de faibles valeurs d' $IC_{50}$  ont été également enregistrées pour l'extrait de fruits noirs (**7.57±0.31 mg. L<sup>-1</sup>**), **8.650±0.051 mg. L<sup>-1</sup>** pour les fruits rouges, **11.320±0.075 mg. L<sup>-1</sup>** pour les feuilles et enfin une valeur de **46.09±0.18 mg. L<sup>-1</sup>**, pour les branches.

Les extraits aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs présentent également une forte activité de piégeage du radical ABTS avec des valeurs d' $IC_{50}$  très proches entre elles qui sont respectivement de **12.64±0.06 mg. L<sup>-1</sup>**, **12.620±0.045 mg. L<sup>-1</sup>** et **12.33±0.04 mg. L<sup>-1</sup>**. L'extrait des branches présente la plus faible activité avec une  $IC_{50}$  de **47.17±0.04 mg. L<sup>-1</sup>**. Les résultats des valeurs des  $IC_{50}$  des extraits aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) ne présentent pas de différences notables.

De même, les extraits acétoniques ont une bonne capacité à piéger le radical ABTS. Les  $IC_{50}$  des extraits de fruits noirs (**12.82±0.11mg/ml**), de fruits rouges (**16.18±0.01mg/l**) et des feuilles (**18.69±0.07 mg/ml**) sont relativement faible et donc les extraits acétoniques ont une activité antioxydante importante, Cependant, l'extrait acétonique des branches (**71.39±0.11 mg.L<sup>-1</sup>**) révèle la plus faible activité à piéger le radical ABTS.

L'extrait hexanique des feuilles ( **$IC_{50}$ =69.37±0. 7mg.L<sup>-1</sup>**) et des branches (**92.03±0. 9mg.mL<sup>-1</sup>**) présentent la plus faible activité de piégeage du radical ABTS.

Une corrélation très significative est trouvée entre la teneur en polyphénols totaux contenu dans l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux des différents organes (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test de l'ABTS, avec des coefficients de corrélation  $R^2 = 0.9341$ ,  $R^2 = 0.7447$  et  $R^2 = 0.7777$ . La corrélation entre la teneur en polyphénol et l'activité anti-radicalaire de l'extrait, acétonique est plus moins faible ( $R^2 = 0,5984$ ) ; par contre il n'y a pas de corrélation entre la teneur en polyphénols l'extrait hexanique ( $R^2 = 0.0023$ ). Les composés phénoliques sont les principaux métabolites responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) sauf pour l'extrait hexanique ou cette activité peut être attribuée à d'autre constituants.

De même, une forte corrélation est observée entre la teneur en flavonoïdes totaux contenu dans l'extrait méthanolique, éthanolique, aqueux et acétonique des différentes partie (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test d'ABTS, avec des coefficients de corrélation  $R^2 = 0.8273$ ,  $R^2 = 0.8729$ ,  $R^2 = 0.7736$  et  $R^2 = 0.7672$ . Par contre il n'y a pas de corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire de l'extrait hexanique ( $R^2 = 0.0897$ ). Les flavonoïdes sont également responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) sauf pour l'extrait hexanique ou cette activité peut être attribuée à d'autre constituants.

Des différences significatives ont été observées entre l'activité antioxydante des extraits obtenus par l'utilisation des solvants à polarité différente. La variabilité de l'activité antioxydante des extraits ne peut être reliée qu'à la nature des molécules contenues dans chaque extrait. Une forte corrélation existe entre l'activité antioxydante des extraits obtenus en utilisant des solvants polaires (méthanol, éthanol, eau, acétone) et leurs composés phénoliques contrairement aux extraits hexaniques obtenus en utilisant un solvant apolaire l'hexane, ou il n'ya pas de corrélation entre cette activité et les composés phénoliques.

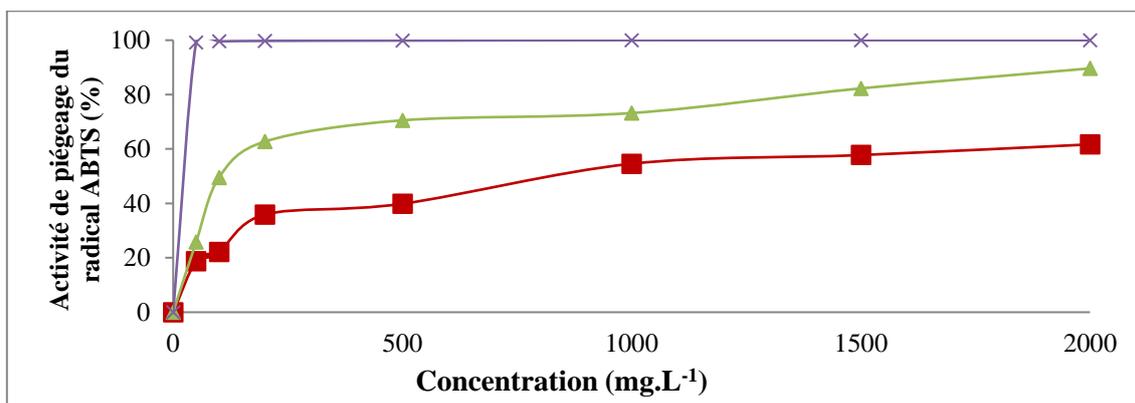
En effet, le pouvoir d'extraction des phytomolécules peut différer selon la nature du solvant. Selon **Cowan (1999)**, au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. Par conséquent, le changement de la nature du solvant modifie son efficacité pour extraire un groupe spécifique d'antioxydants, influençant ainsi les propriétés antioxydantes des extraits (**Chernane et al., 2014**).

Cependant, il faudra aussi tenir compte de la contribution à l'activité antioxydante par d'autres constituants mineurs présents dans les extraits, comme le montre l'activité antioxydante importante de l'extrait méthanolique des branches malgré sa faible teneur en polyphénols ( $231.98 \pm 0.01$  mg EAG/g) mais est riche en d'autres métabolites secondaires comme les tanins, saponins, flavonoïdes ect.

Les flavonoïdes ont une activité potentielle vis-à-vis du radical ABTS<sup>+</sup> en stabilisant les espèces réactives de l'oxygène qui réagissent avec le composé réactif du radical (**Bhouri et al., 2010**). En effet, les flavonoïdes stabilisent les radicaux libres grâce à la haute réactivité de leurs groupements hydroxyles (**Nijveldt et al., 2001**).

### II.10.2.3 Activité de piégeage du radical ABTS de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

L'activité antioxydante de l'huile fixe extraite des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) ainsi que celle du BHT est proportionnelle aux concentrations utilisées. Le BHT présente une capacité de piégeage du radical ABTS plus importante que celle des huiles fixes étudiées (**Fig.29**). Pour une concentration de **1000 mg.L<sup>-1</sup>**, le pourcentage d'inhibition enregistré est de **54.58±0.10%**, **73.22±0.18 %** et **100 %** pour l'huile fixe des fruits rouges, des fruits noirs et du BHT. L'huile fixe extraite des fruits noirs présente une activité antioxydante plus importante que celle des fruits rouges.



**Figure n°29** : Activité de piégeage du radical ABTS par l'huile fixe des fruits rouges ■ et des fruits noirs ▲ de *P. lentiscus* (L.) et du BHT ■.

L'activité du piégeage du radical ABTS, exprimée par l'IC<sub>50</sub>, est de **797.79± 2.19mg.L<sup>-1</sup>** pour l'huile des fruits rouges, **101.006±0. 140mg.L<sup>-1</sup>** pour l'huile des fruits noirs et **5.81±0. 01mg.L<sup>-1</sup>** pour BHT. Cette différence est attribuée à la teneur en composé phénolique qui est importante au niveau des fruits rouges par rapport au fruits noirs puisque cette dernière augmente au moment de la maturité des fruits.

### II.10.3. Mesure du pouvoir réducteur

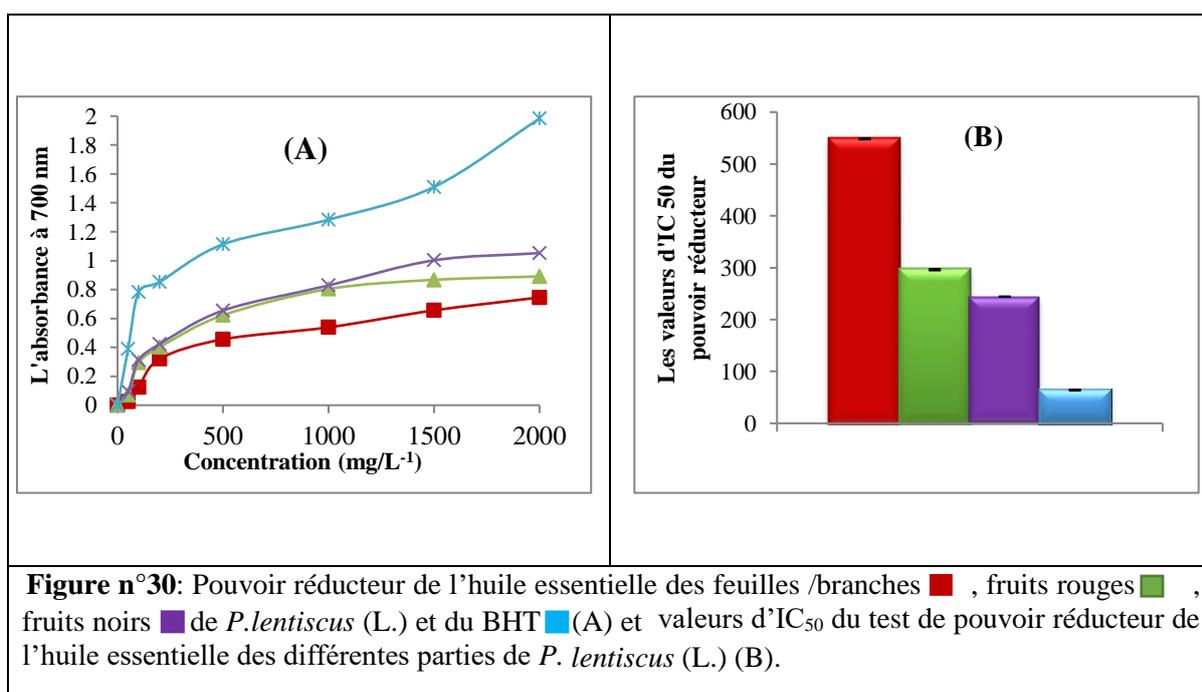
Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Il mesure de l'aptitude d'une huile essentielle ou d'un extrait à interagir avec les espèces chimiques réactives, telles que les radicaux libres en tant que donneur d'électrons. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables. Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**).

### II.10.3.1. Pouvoir réducteur de l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) se manifeste via le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu, changement due à la réduction de la forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ) à la forme fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Il est quantifié par la mesure de l'absorbance de la couleur bleu.

Le pouvoir réducteur des trois huiles essentielles (feuilles /branches, fruits rouges et fruits noirs) ainsi que celui du BHT augmente avec l'augmentation de la concentration (**Fig.30 A**). Pour une concentration de 1000 mg. L<sup>-1</sup>, les valeurs des absorbances enregistrées sont de **0.5380±0.0005**, **0.803±0.003**, **0.828±0.001** et **1.280±0.005** respectivement, pour les huiles essentielles des feuilles/branches, fruits rouges, fruits noirs et du BHT. La capacité réductrice la plus élevée est enregistrée pour le BHT, suivi par les huiles essentielles des fruits noirs, fruits rouges et en dernier par celle l'huile essentielle des feuilles/branches.

La capacité réductrice de l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) est inférieure à celle du BHT avec des IC<sub>50</sub> de **548,24±1.20 mg. L<sup>-1</sup>**, **296.15±1.34mg.L<sup>-1</sup>**, **244.24 ±0.415mg.L<sup>-1</sup>** et **64.14±0.14 mg. L<sup>-1</sup>** respectivement pour l'huile essentielle extraite des feuilles/ branches, fruits rouges, fruits noirs et BHT (**Fig. 30B**). Les différences enregistrées entre les trois huiles essentielles peuvent être attribuées à la différence de leur composition chimique.



L'huile essentielle des fruits noirs présente une teneur plus élevée en  $\alpha$  terpinène, 1-8-cineol, limonène, linalool par rapport à l'huile des feuilles/branches et fruits rouges ce qui

justifié son pouvoir réducteur important par rapport à ces huiles. Certains composés tels que les alcools (linalool et 1,8-cineol), les esters et les hydrocarbures ( $\alpha$ -terpinène) peuvent contribuer au pouvoir réducteur des huiles essentielles en agissant en synergie (Edris *et al.*, 2007). La capacité réductrice enregistrée pourrait être attribuée à certains composés appelés réductones (Duh, 1998). Ces dernières correspondent à l'ensemble des substances dont la structure chimique contient des fonctions énols issues de l'énolisation des composés cétoniques. Ces composés sont capables de réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), de céder des électrons et de transformer les radicaux libres actifs en produits stables (Singh *et al.*, 2006).

Pour les trois huiles essentielles testées, l'effet obtenu avec la méthode du DPPH n'est pas corrélé avec ceux obtenus par la méthode de l'ABTS et le pouvoir réducteur. Ces variations seraient dû aux mécanismes impliqués dans les réactions antioxydantes des radicaux différents selon la technique (Soares *et al.*, 2003). D'autres facteurs, tels que la stéréo-sélectivité des radicaux ou la solubilité des composés dans les systèmes de solvants différents peuvent aussi influencer sur la capacité de chaque huile à réagir et à réduire les différents radicaux (Yu *et al.*,

2002). Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Cao *et Prior*, 1998).

Enfin, le test du pouvoir réducteur révèle une activité antioxydante très prometteuse de l'huile essentielle de *P. lentiscus* (L.) comme source d'antioxydants naturels.

### II.10.3.2. Pouvoir réducteur des extraits non volatils de *P. lentiscus* (L.)

La capacité de réduction d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Meir *et al.*, 1995). Le pouvoir réducteur des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) augmente en fonction de la concentration (Fig. 31). Pour une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup>, l'extrait méthanolique des feuilles, fruits rouges et fruits noirs du *P. lentiscus* (L.) a une capacité réductrice supérieure à celle BHT, avec une absorbance de **0.803±0.005**, **0.90±0.02**, **0.910±0.005** et **0.7800±0.0064** respectivement. L'extrait méthanolique des branches a l'activité réductrice la plus faible avec une absorbance de **0.540±0.001** (Fig. 31A). De même, pour une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup>, l'extrait éthanolique des feuilles présente une capacité réductrice proche de celle du BHT avec une absorbance de **0.758±0.001**, les extraits éthanolique des fruits rouges (**0.870±0.001**) et des fruits noirs (**0.880±0.001**) ont une activité réductrice supérieure à celle du BHT ; l'extrait éthanolique des branches quant à lui présente une activité réductrice inférieure à celle du BHT (**0.520±0.001**) (Fig.31B).

L'extrait aqueux des feuilles (**0.7500±0.0005**) a une activité réductrice légèrement inférieure à celle du BHT, alors que les extraits aqueux des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) ont des activités réductrices proches de celle du BHT avec une absorbance de **0.7890±0.0005%** et **0.7940±0.0005%**. Celui des branches présente une activité réductrice modérée avec une absorbance de **0.513±0.001** et ceci à une concentration de 100 mg. L<sup>-1</sup> (**Fig.31C**). Pour l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), la capacité réductrice est inférieure à celle de BHT avec une absorbance de **0.508±0.005**, **0.600±0.005**, **0.6700±0.0005** et **0.7240±0.0005%** respectivement pour une concentration de 100 mg L<sup>-1</sup> (**Fig.31D**). L'extrait hexanique des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.) a également une capacité réductrice inférieure à celle du BHT respectivement de **0.5030±0.0005** et **0.5100±0.0005** (**Fig.31E**).

Les extraits des fruits noirs et fruits rouge présentent une capacité réductrice du fer la plus élevée par rapport aux extraits des autres organes de *P. lentiscus* (L.).

La capacité la plus élevée observée est par ordre d'importance celle des extraits méthanoliques, suivies de celles des extraits éthanoliques, aqueux, acétoniques des quatre organes de la plante et en dernier viennent les extraits hexaniques des feuilles et des branches.

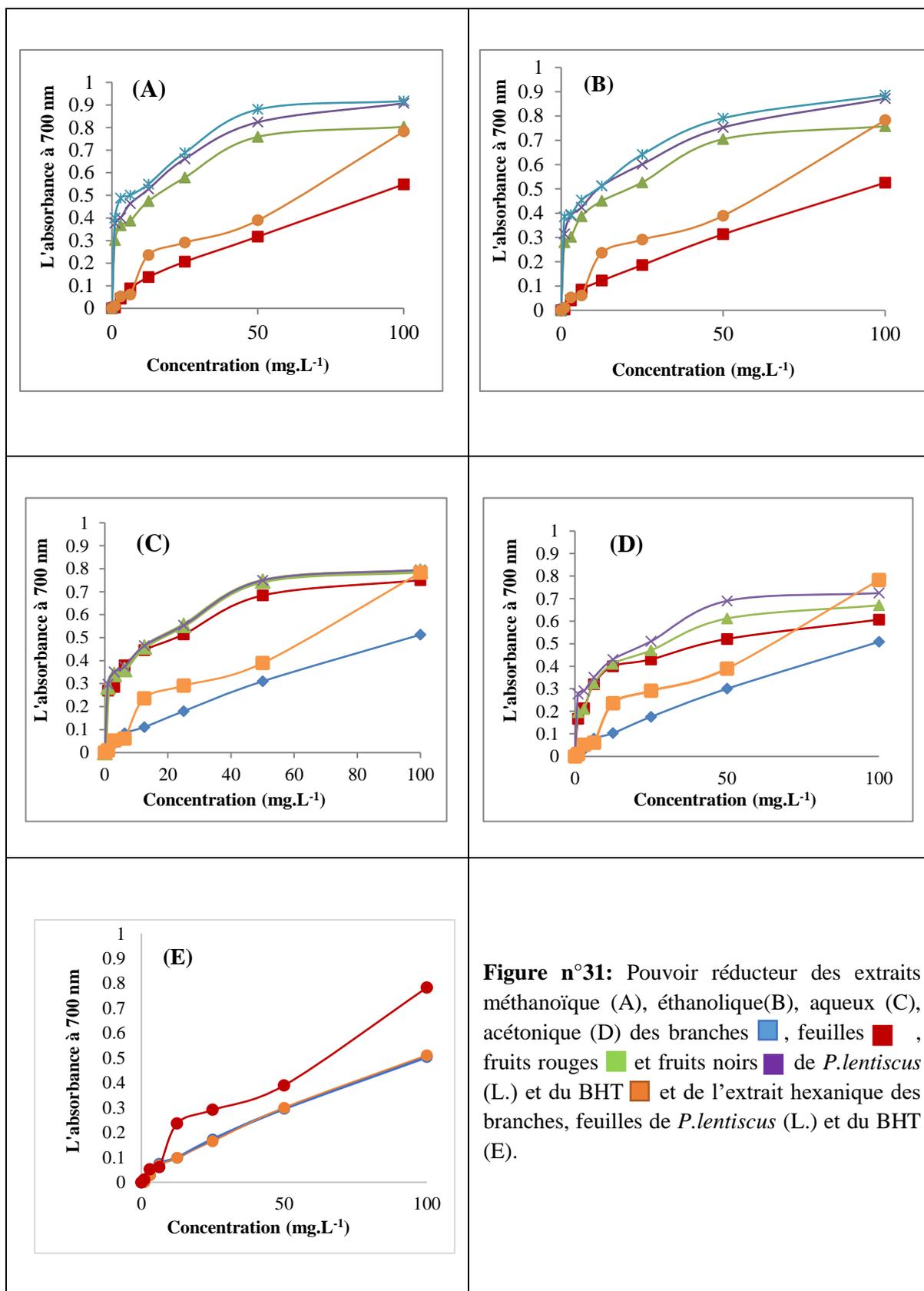
L'extrait méthanolique des fruits noirs, fruits rouges et des feuilles révèle le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport aux autres extraits avec des IC<sub>50</sub> de **6.240±0.011**, **11.840±0.055** et **13.16±0.07** (**mg. L<sup>-1</sup>**) respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celle du BHT (**64.14 ±0.14 mg. L<sup>-1</sup>**), signalant une très bonne activité antioxydante. La plus faible capacité antioxydante a été enregistrée dans l'extrait hexanique des branches (**91.13 ±0.46 mg. L<sup>-1</sup>**) (**Tab.22**).

Dans le cas des extraits éthanoliques, de faibles valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été enregistrées pour l'extrait des fruits noirs **12.190±0.051 mg. L<sup>-1</sup>** et des fruits rouges, **12.210±0.036 mg. L<sup>-1</sup>**; les valeurs sont plus élevées pour les extraits de feuilles **23.73±0.051 mg. L<sup>-1</sup>** et de branches **44.73±0.04mg.L<sup>-1</sup>** (**Tab.22**).

Les extraits aqueux des feuilles, fruits rouges et fruits noirs présentent également une forte capacité à réduire le fer avec des IC<sub>50</sub> de **13.44±0.01 mg. L<sup>-1</sup>**, **22.58±0.02 mg.L<sup>-1</sup>**, **24.27±0.02mg.L<sup>-1</sup>**, respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celle du BHT. L'extrait des branches présente un faible pouvoir réducteur par rapport aux autres parties avec une IC<sub>50</sub> de **45.48±0.19 mg. L<sup>-1</sup>**(**Tab.22**).

De même les extraits acétoniques étudiés ont une bonne capacité à réduire le fer, exprimée en concentrations IC<sub>50</sub>. Les extraits des fruits noirs (**24.48±0.02 mg. L<sup>-1</sup>**), fruits rouges (**25.26±0.35mg.L<sup>-1</sup>**) et des feuilles (**47.98±0.09 mg. L<sup>-1</sup>**) ont le pouvoir réducteur le plus important, Cependant, l'extrait acétonique des branches (**98.35±0.10 mg. L<sup>-1</sup>**) révèlent la plus

faible capacité à réduire le fer. L'extrait hexanique des feuilles ( $IC_{50}=94.91\pm 0.011\text{mg.L}^{-1}$ ) et des branches ( $99.26\pm 0.11\text{mg.mL}^{-1}$ ) présentent la plus faible capacité à réduire le fer par rapport à tous les extraits étudiés (Tab.22).



Cette importante activité antioxydante serait probablement dû à la présence de composés donneurs d'électrons qui entraîneraient la réduction de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Le pouvoir réducteur des extraits pourrait aussi être attribué à la richesse en composés phénoliques qui varie de **30.03±0.14** à **1351.00±0.69** mg EAG/ g d'extrait. Plus la teneur des extraits en composés phénoliques augmente, plus le pouvoir réducteur augmente (**Amessis, 2007**).

Une corrélation significative est trouvée entre la teneur en polyphénols totaux contenu dans l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux des différentes partie (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test du pouvoir réducteur avec des coefficients de corrélation  **$R^2 = 0.8823$** ,  **$R^2 = 0.7794$**  et  **$R^2 = 0.8491$** . La corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-radicalaire de l'extrait acétonique et hexanique est plus moins faible avec des coefficients de corrélation de  **$R^2=0,6445$**  et  **$R^2=0.5989$**  respectivement. Donc les composés phénoliques sont les principaux métabolites responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.).

De même, une forte corrélation est observée entre la teneur en flavonoïdes totaux contenu dans l'extrait méthanolique et éthanolique des différents organes (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.) et l'activité antioxydante mesurée par le test du pouvoir réducteur, avec des coefficients de corrélation  **$R^2=0,9172$**  et  **$R^2=0.8812$**  respectivement. La corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux et acétonique est plus faible avec  **$R^2 = 0.6723$**  et  **$R^2 = 0.5889$**  respectivement ; par contre il n'y a pas de corrélation avec l'extrait hexanique ( **$R^2 = 0.0481$** ). Donc les flavonoïdes sont également responsables de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. lentiscus* (L.) sauf pour l'extrait hexanique ou cette activité peut être attribuée à d'autre constituants.

**Tableau n°22** : Valeurs d'IC<sub>50</sub> du test du pouvoir réducteur des différents extraits testés et du BHT. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

	<b>Branches</b>	<b>Feuilles</b>	<b>Fruits rouges</b>	<b>Fruits noirs</b>
<b>Extrait méthanolique</b>	91.13 ±0.46	13.16±0.07	11.840±0.055	6.240±0.011
<b>Extrait éthanolique</b>	95.17±0.27	23.730±0.051	12.210±0.036	12.190±0.051
<b>Extrait aqueux</b>	97.46±0.19	24.27±0.02	22.58±0.02	13.44±0.01
<b>Extrait acétonique</b>	98.35±0.10	47.98±0.09	25.26±0.35	24.48±0.02
<b>Extrait hexanique</b>	99.26±0.11	94.91±0.011	106.300±0.132	81.14±0.17
<b>BHT</b>		64.14 ±0.14		

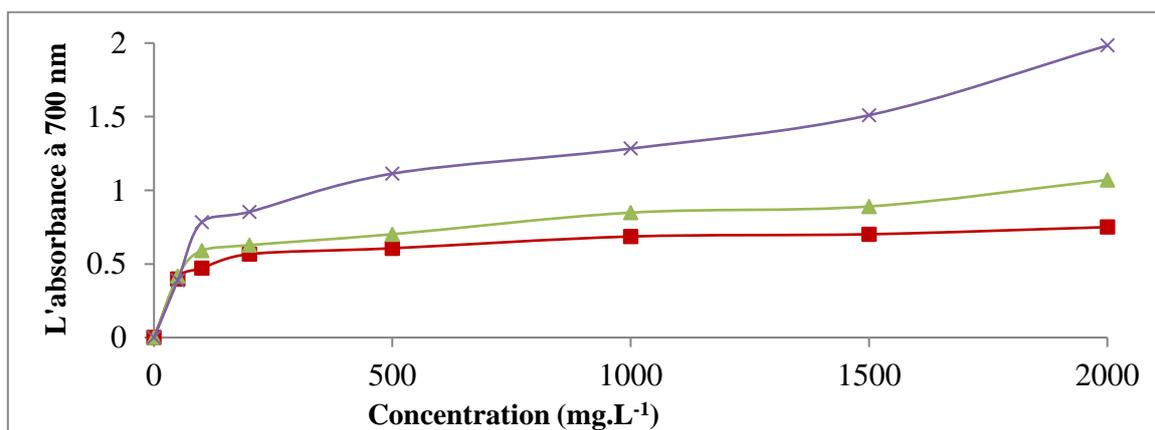
Les résultats des tests phytochimiques indiquent la présence des tannins dans les différents organes de *P. lentiscus* (L.) qui pourraient également contribuer au pouvoir réducteur des extraits.

Les extraits du *Pistachier lentisque* présentent un pouvoir réducteur important ; ils renferment donc des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort. Les composés phénoliques sont des antioxydants à propriétés redox qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet. Le rendement et l'activité antioxydante des extraits naturels dépendent du solvant utilisé pour l'extraction (**Boulekbache-Makhlouf et al., 2013**). Les plantes avec des niveaux élevés en composés phénoliques, peuvent présenter une bonne capacité antioxydante (**Razali et al., 2008**). En effet, dans notre étude, les extraits des fruits noirs qui présentent des teneurs élevées en composés phénoliques ont la meilleure activité antioxydante. Ceci est confirmé par la forte corrélation entre l'activité antioxydante de ces extraits et leurs teneurs en composés phénoliques.

En général, le pouvoir réducteur des extraits de plantes dépend de sa concentration, la capacité réductrice de l'extrait est significativement plus forte que celle de l'huile essentielle.

### II.10.3.3. Pouvoir réducteur de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Yang et coll., 2008**). La capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des huiles fixes et du BHT (**Fig. 32**).



**Figure n°32** : Pouvoir réducteur de l'huile fixe des fruits rouges ■ et fruits noirs ■ de *P. lentiscus* (L.) et du BHT ■.

Le BHT présente une capacité réductrice plus importante que celle des huiles fixes de *P. lentiscus* (L.). Pour une concentration de **1000 mg. L<sup>-1</sup>**, l'absorbance enregistré est respectivement de **0.6800±0.0005**, **0.8400±0.0005** et **1.280±0.005** pour l'huile fixe extraite des

fruits rouges, fruits noirs et du BHT. L'huile fixe extraite des fruits noirs présente un pouvoir réducteur plus important que celui de l'huile extraite des fruits rouges. Les deux huiles fixes ont un pouvoir réducteur, ( $IC_{50}$  fruits rouges =  $106.300 \pm 0.132 \text{ mg. L}^{-1}$  et  $IC_{50}$  fruits noirs =  $81.14 \pm 0.17 \text{ mg. L}^{-1}$ ) inférieure à celui du BHT ( $IC_{50} = 64.14 \pm 0.14 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Tab. 28). Cette activité pourrait être expliquée par la présence d'antioxydants lipophiles tels que les tocophérols qui, grâce à leur capacité à donner de l'hydrogène phénolique aux radicaux libres lipidiques, inhibent l'oxydation (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996 ; Maret et Jeffrey, 2007 ; Müller et al., 2010). Cet antioxydant qui se trouve sous quatre formes isomériques est responsable de la stabilité de l'huile de lentisque à l'oxydation (Dhifi et al., 2013).

L'étude de l'activité antioxydante des extraits révèle qu'ils possèdent une activité dose-dépendante.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits et huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) a été réalisée par différentes méthodes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH•, le pouvoir réducteur, le piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>, nous avons constaté que les différents extraits et huiles essentielles testés présentent des activités antioxydantes assez importantes, dépendantes la teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et une relation linéaire a été établie. La différence dans la capacité antioxydante mesurée avec les trois tests (DPPH, l'ABTS et que pouvoir réducteur), de notre étude s'expliquerait par les mécanismes différents impliqués dans chaque test.

## **II.11. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.)**

### **II.11.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits analysés**

La méthode de l'aromatogramme est la technique utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits. Dans ce travail, trois souches microbiennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *staphylococcus aureus* et une espèce de champignons (*Candida albicans*), à l'origine de plusieurs infections, ont été utilisées pour tester les activités antibactériennes des huiles essentielles et des extraits des différents organes (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) de *P. lentiscus* (L.).

La zone d'inhibition, mesurée en millimètres, y compris le diamètre du disque de papier, a été utilisée comme critère pour mesurer l'activité antibactérienne. L'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne émise par Ela et al. (1996), Meena et Sethi, (1994), répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 4 classes a été utilisée :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm ;
- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm ;
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.

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

### II.11.1.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées

Les huiles des trois échantillons possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées avec une légère différence de sensibilité entre les bactéries gram<sup>+</sup> et les bactéries gram<sup>-</sup>. Les diamètres d'inhibition sont compris entre **10.03 ± 0.05 mm** et **23,32 ± 0,82mm** (Tab. 23).

**Tableau n °23** : Sensibilité des souches étudiées vis-à-vis de l'huile essentielles des feuilles /branches, des fruits rouges et des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.). Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ± SD (n=3).

Souches	Feuilles/Branches	Fruits rouges	Fruits noirs
<i>Escherichia coli</i>	21.33±0.15	20,26 ± 0,25	21.06±0.11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22.30±0.14	18.88 ± 0.10	19.10±0.08
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,32 ± 0,82	16,13 ± 0,25	16.50±0.13
<i>Candida albicans</i>	10.03±0.05	10.60±0.17	11.25±0.25

L'huile essentielle extraite des différentes organes de *P. lentiscus* (L.) (feuilles /branches, fruits rouges et fruits noirs) ont une activité inhibitrice modérée vis-à-vis les trois souches bactériennes testées (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) avec des diamètres de zones d'inhibition allant de **16,13±0,25mm** à **23,32 ± 0,82mm**, alors qu'elles ont une légère activité inhibitrice vis-à-vis la souche fongique, *Candida albicans*, avec des diamètres de zones d'inhibition de **10.03±0.05mm**, **10.60±0.17mm** et **11.25±0.25 mm** respectivement pour les huiles essentielles des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) (Tab.23). Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus dans notre étude peuvent être expliqués par le faible volume des huiles essentielles utilisées (3µL). Il y a une relation proportionnelle entre le volume administré et l'effet antimicrobien. (Degryse et al, 2008 ; Touaibia, 2015).

L'activité antimicrobiennes des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) peut être attribuée

à ses composés majoritaires :  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -myrcène,  $\beta$ -pinène, limonène,  $\beta$ -caryophyllène,  $\gamma$ -linalool, terpinène, terpinène, 4-Terpinéol,  $\gamma$ -cadinène. L' $\alpha$ -pinène exerce son activité antimicrobienne en perturbant la structure de la membrane des bactéries (**Knobloch et al., 1989**).

Elle peut être aussi attribuée, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles (**Belaiche et al., 1995 ; Tzakou et al., 2007**). Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles sont difficiles à corréler à un composé spécifique en raison de la complexité de leur composition et de leur variabilité. Dans notre étude, les trois huiles sont caractérisées par la dominance de composés antibactériens divers (monoterpène et sesquiterpènes). L'activité antimicrobienne des monoterpènes est expliquée par la présence de groupes d'hydroxyles capables de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes de la cellule ciblée. Le mécanisme d'action de terpènes n'est pas entièrement élucidé, mais il impliquerait la rupture de la membrane plasmique par les composés lipophiles. En effet, l'augmentation du caractère hydrophile des diterpénoïdes par addition d'un groupe méthyle réduit considérablement leur activité antimicrobienne (**Medjken, 2017**). Les alcools tel que le linalol (**Imelouane et al., 2009**), les aldéhydes et les esters peuvent contribuer à l'effet antimicrobien global des huiles essentielles (**Derwich et al., 2010**). Le linalol présent dans nos huiles est en plus forte concentration dans l'huile essentielles extraites des fruits noirs (**1.2%**).

La force et le spectre de l'activité antimicrobienne varie entre le type de Gram des bactéries testées et les organes de la plante étudiée (**Djenane et al., 2011 ; Haloui et al., 2015**). Les bactéries Gram positives ont une plus forte sensibilité pour les huiles essentielles que les bactéries Gram négatives (**Lambert et al., 2001**). Cette plus forte sensibilité est dû à la différence de composition de la paroi cellulaire (**Ratledge et Wilkinson, 1988**). La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives les rend plus sensibles à l'action de ces huiles que celle des souches Gram négatives qui limite le passage des substances.

L'huile essentielle du lentisque présente une activité antifongique contre *Candida albicans* qui est attribuée à l' $\alpha$ -terpinéol et au terpinène-4-ol (**El Idrissi et al., 2016**).

Les résultats de notre étude montrent que l'huile essentielle de *P. lentiscus* (L.) de la région de Bouira est modéré, alors que des travaux antérieurs rapportent que l'huile essentielle du pistachier lentisque est inefficace contre *E. coli* (0-6.7 mm), peu active contre *P. aeruginosa* (0-9,3 mm) et *Candida albicans* (6.5- 8.6 mm) et elle est dotée d'une activité intermédiaire vis-à-vis de *S. aureus* (8-12,7 mm) (**Benhamou et al., 2009 ; Bammou et al., 2015 ; Debbabi et al., 2017**). Ces différences peuvent être dû à la différence de leurs compositions chimiques.

### II.11.1.2. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne des extraits testés

Tous les extraits ont des activités antimicrobiennes contre les souches des différents micro-organismes testés (**Tab. 24**). Les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une souche microbienne à une autre et d'un extrait à un autre, avec des diamètres variant de **10.16±0.76 mm** à **16.13±0.23mm** pour les extraits de branches, **11.26±0.25 mm** à **27.0.3 ±0.05mm** pour les extraits des feuilles, **11.41±0.38mm** à **24.1±0.1mm** pour les extraits des fruits rouges et de **12.16±0.28mm** à **25.26±0.25 mm** pour les extraits des fruits noirs.

✚ **Les extraits de branches :** Tous les extraits de branches (méthanoliques, éthanologiques, aqueux, acétoniques et hexaniques) ont une activité légèrement inhibitrice contre les 4 souches microbiennes utilisées.

#### ✚ **Les extraits de feuilles**

- L'extrait méthanolique des feuilles présente une activité modérément inhibitrice contre les trois souches bactériennes (*E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *staphylococcus aureus*) et une activité légèrement inhibitrice contre la souche de levure *Candida albicans*.
- L'extrait éthanologique des feuilles présente une activité légèrement inhibitrice contre les 4 souches microbiennes utilisées.
- L'extrait aqueux des feuilles présente une activité modérément inhibitrice contre les trois souches bactériennes (*E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*) et une activité légèrement inhibitrice contre la souche de levure *Candida albicans*.
- L'extrait acétonique des feuilles présente une activité modérément inhibitrice contre *E. coli* et *Candida albicans* et une activité légèrement inhibitrice contre *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*.
- L'extrait hexanique des feuilles possède une activité modérément inhibitrice contre les quatre souches microbiennes.

#### ✚ **Les extraits des fruits rouges**

- L'extrait méthanolique des fruits rouges présente une activité modérément inhibitrice contre les souches bactériennes (*E. coli* et *Pseudomonas aerogenosa*) et une activité légèrement inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.
- L'extrait éthanologique des fruits rouges présente une activité modérément inhibitrice contre *E. coli* et *Candida albicans* et une activité légèrement inhibitrice contre les souches bactériennes (*Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*).
- L'extrait aqueux et acétonique des fruits rouges présente une activité légèrement inhibitrice contre les 4 souches microbiennes utilisées.

- L'extrait hexanique des fruits rouges présente une activité légèrement inhibitrice contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* et une activité modérément inhibitrice contre *Pseudomonas aerogenosa* et *Candida albicans*.

#### ✚ Les extraits des fruits noirs

- L'extrait méthanolique des fruits noirs présente une activité modérément inhibitrice contre les trois souches bactériennes (*E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*) et une activité légèrement inhibitrice contre la levure *Candida albicans*.

- L'extrait éthanolique, aqueux, acétonique et hexanique des fruits noirs présente une activité modérément inhibitrice contre les quatre souches bactériennes testées (*E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*).

**Tableau n °24** : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des extraits de *P. lentiscus* (L.). Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures  $\pm$  standard de déviation  $\pm$  SD (n=3).

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Extrait méthanolique	Branches	12.83 $\pm$ 0,28	13.30 $\pm$ 0,20	12.20 $\pm$ 0.26	10.16 $\pm$ 0.76
	Feuilles	27,03 $\pm$ 0.05	18.66 $\pm$ 3.21	19.06 $\pm$ 0.11	11.33 $\pm$ 0.11
	Fruits rouges	20.33 $\pm$ 0.05	20.10 $\pm$ 0.10	15.15 $\pm$ 0.13	11.41 $\pm$ 0.38
	Fruits noirs	25.33 $\pm$ 0.20	21.08 $\pm$ 0.14	19.23 $\pm$ 0.25	12,16 $\pm$ 0,28
Extrait éthanolique	Branches	11.06 $\pm$ 0.11	12,060 $\pm$ 0,057	11.26 $\pm$ 0.25	10.66 $\pm$ 0.57
	Feuilles	15.26 $\pm$ 0.25	14.00 $\pm$ 1.73	13.33 $\pm$ 1.15	11.26 $\pm$ 0.25
	Fruits rouges	17.25 $\pm$ 0.25	15.13 $\pm$ 0.15	12.43 $\pm$ 0.51	24.1 $\pm$ 0.1
	Fruits noirs	16.40 $\pm$ 0.10	18.1 $\pm$ 0.1	17.06 $\pm$ 0.11	25.26 $\pm$ 0.25
Extrait aqueux	Branches	11,16 $\pm$ 0,28	12.16 $\pm$ 0.15	12.40 $\pm$ 0.52	15.1 $\pm$ 0.52
	Feuilles	21.06 $\pm$ 0.11	20.23 $\pm$ 0.20	21.06 $\pm$ 0.11	15.16 $\pm$ 0.28
	Fruits rouges	12.68 $\pm$ 0.16	12.44 $\pm$ 0.50	12.35 $\pm$ 0.13	16.23 $\pm$ 0.01
	Fruits noirs	21.25 $\pm$ 0.25	17.26 $\pm$ 0.37	15.45 $\pm$ 0.18	14.33 $\pm$ 0.38
Extrait acétonique	Branches	14.06 $\pm$ 0.11	12.25 $\pm$ 0.25	13.33 $\pm$ 0.05	14.48 $\pm$ 0.25
	Feuilles	17.27 $\pm$ 0.19	15.86 $\pm$ 0.32	15.42 $\pm$ 0.41	17.25 $\pm$ 0.05
	Fruits rouges	16.26 $\pm$ 0.25	13.66 $\pm$ 1.52	12.33 $\pm$ 1.54	15.33 $\pm$ 0.57
	Fruits noirs	24.20 $\pm$ 0.15	25.15 $\pm$ 0.03	23.36 $\pm$ 0.32	15.13 $\pm$ 0.23
Extrait hexanique	Branches	12.06 $\pm$ 0.11	13.13 $\pm$ 0.23	13.46 $\pm$ 0.47	16.13 $\pm$ 0.23
	Feuilles	21.16 $\pm$ 0.76	21.33 $\pm$ 1.15	23.16 $\pm$ 1.60	20.36 $\pm$ 0.55
	Fruits rouges	12.5 $\pm$ 0.5	17.1 $\pm$ 0.1	12.160 $\pm$ 0.208	21.50 $\pm$ 0.50
	Fruits noirs	22.16 $\pm$ 0.20	17.03 $\pm$ 0.50	15.26 $\pm$ 0.10	21.14 $\pm$ 0.15

L'activité antimicrobienne varie d'un organe à un autre, d'un extrait à un autre (en fonction du solvant utilisé) et d'une souche à une autre. Les extraits des fruits noirs, des feuilles et des fruits rouges sont plus actifs que les extraits des branches.

Le screening phytochimique révéla la présence des principales familles chimiques (saponines, tanins catéchiques, tanins galliques, composés phénoliques, flavonoïdes, protéines, terpénoïdes, composés réducteurs et huiles essentielles) dans les différents organes de *P. lentiscus* (L.) (branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs) ces derniers sont susceptibles de conférer des propriétés antimicrobiennes à une plante.

La teneur élevée en composés phénoliques des extraits est probablement responsable de leur efficacité. Il existe une corrélation positive entre le contenu en composés phénoliques et l'activité antimicrobienne (**Mezni et al., 2012**). Toutefois, le test de sensibilité réalisé avec les extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.) montre que la susceptibilité des souches microbienne varie d'une souche à une autre en fonction du type d'extrait. L'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires à effet antimicrobien et antifongique tels que les stéroïdes, les saponosides et des huiles essentielles (**Morris et al., 1997 ; Yousef et Tawil, 1980 ; Bajpai et al., 2007**). Bien que les extraits éthanoliques soient plus riches en composés phénoliques que les autres extraits (aqueux, acétonique, hexanique), ils demeurent moins actifs. L'activité antimicrobiennes ne serait probablement pas dû à l'action unique des polyphénols.

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes, les composés phénoliques agissant en perturbant les mécanismes enzymatiques impliqués dans la production d'énergie pour les bactéries et les levures (**Sikkema et al., 1995**). Les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (**Ohemeng et al., 1993**). Les modes d'actions antifongiques sont assez semblables à ceux décrits par les bactéries, concernant le dommage irréversible de la membrane cellulaire et la coagulation du contenu cellulaire. (**Djilani et Dicko, 2012**).

Les résultats des travaux antérieurs montrent que les extraits des parties aériennes de *P. lentiscus* (tiges, feuilles et fruits) ont un effet antibactérien remarquable contre *S. aureus*. Une forte activité est enregistrée contre *P. aeruginosa*. Cependant, un faible effet est enregistré contre *E. coli* (**Jalayer-Naderi et al, 2016 ; Benrokia et Aouar, 2015 ; Missoun et al., 2017**).

Les différences observées par rapport à nos résultats peuvent s'expliquer par la variation des concentrations en principes actifs différents dû aux méthodes d'extraction utilisée dans ces études (macération, percolation, infusion, décoction ainsi-qu'au volume de l'extrait utilisé (10-50 µL) contre un volume de (3µL) utilisé dans notre étude.

Les huiles fixes de *P. lentiscus* (L.) riche en acides gras ont une activité antimicrobienne important contre les quatre souches étudiées qui pourrait être attribué à l'effet inhibiteur des acides gras (AG) sur les microorganismes. En effet, les acides oléique et linoléique, qui sont les principaux constituants de l'huile fixe de *P. lentiscus* (L.), ont des propriétés antibactériennes attribuées aux longueurs de chaînes non saturées (**Zheng et al., 2005**). Le pouvoir antimicrobien de nos huiles fixes peut également être lié à la présence des composés phénoliques dans cette huile. D'autre étude ont rapporté que cette huile extraite traditionnellement à partir fruits de *P. lentiscus* collectés dans la région d'Annaba présente une activité contre *S. aureus* avec des diamètres des zones d'inhibitions variant de 14.5 à 18.5 mm pour des concentration allant de 0.04 à 0.4 g/mL d'huile (**Bensaci et Hadj Mokhnache, 2015**) et une absence d'activité contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albican* a été rapporté par **Mezni et al., (2014)** pour l'huile des fruits de *Pistachier lentisque* récoltés en Tunisie. Par contre **Benrokia et Aouar, (2015)**, ont signalé une activité très élevée de cette huile contre *P. aeruginosa* (70mm) alors qu'*E.coli* et *S. aureus* sont largement moins sensibles à cette huile. De même, **Bouamara et Haddad, (2016)**, ont trouvé que cette huile n'a aucun effet inhibiteur sur *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 et elle laisse voir une petite zone d'inhibition (1 mm) vis-à-vis *S. aureus*. Les différences observées par rapport à nos résultats peuvent s'expliquer par la variation des concentrations en principes actifs dû aux méthodes d'extraction traditionnelle utilisée dans certaines études, la différence dans leurs compositions chimiques ainsi-qu'au volume de l'huile utilisé.

*P. lentiscus* (L.) est douée propriétés antimicrobiennes dû à sa richesse en différents métabolites secondaires, justifiant son utilisation dans le traitement traditionnel de certaines maladies (l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (**Villar et coll, 1987 ; Ali-Shtayeh et coll, 1998 ; Ali-Shtayeh et coll, 2000 ; Lev et Amar, 2000 ; Lev et Amar, 2002 ; Said et coll, 2002**). La croissance de *S. aureus* a été inhibée par tous les extraits, justifiant l'utilisation de *P. lentiscus* (L.) en médecine traditionnelle pour traiter les maladies respiratoires et cutanées. En effet, cette bactérie se transmet par contact direct avec une personne infectée, par l'utilisation d'un objet contaminé, ou par inhalation de gouttelettes infectées dispersées dans l'air par les éternuements ou la toux. Cette bactérie est responsable d'un grand nombre d'infections chez l'Homme, notamment des infections cutanées (impétigos, folliculites, furoncles, panaris) et des infections des muqueuses (conjonctivites, otites, salpingites, endométrites, pneumonies) (**Lowy.1998**).

## II.10.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits analysés

### II.10.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Afin de compléter notre travail, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle des branches/ feuilles, fruits rouges et fruits noirs et des extraits de *P. lentiscus* (L.). Ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et de l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles (Tiwari *et al.*, 2009).

#### II.10.2.1.1. Les huiles essentielles

La CMI constitue l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique, que ce soit dans des laboratoires de diagnostic pour évaluer la résistance d'un germe ou dans le cadre de recherches visant à évaluer *in vitro* l'activité d'une substance antibiotique. L'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) possède des CMI faibles et présente donc une assez bonne activité antimicrobienne (Tab. 25).

**Tableau n°25:** Evaluation des CMI des huiles essentielles des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

HE	Concentration	Micro-organismes testés			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Huile essentielle des feuilles/ branches	0.030%	+	+	+	+
	0.060%	-	-	-	+
	0.125%	-	-	-	+
	0.250%	-	-	-	+
	0.500%	-	-	-	+
	1.000%	-	-	-	+
	2.000%	-	-	-	+
Huile essentielle des fruits rouges	0.030%	-	-	-	+
	0.060%	-	-	-	+
	0.125%	-	-	-	+
	0.250%	-	-	-	+
	0.500%	-	-	-	+
	1.000%	-	-	-	+
	2.000%	-	-	-	+
Huile essentielle des fruits noirs	0.030%	-	-	-	+
	0.060%	-	-	-	+
	0.125%	-	-	-	+
	0.250%	-	-	-	+
	0.500%	-	-	-	+
	1.000%	-	-	-	+
	2.000%	-	-	-	-

+ : Croissance microbienne, - : Absence de croissance, - : CMI.

Les valeurs de CMI enregistrées sont de **0,06%** pour l'huile essentielle des feuilles/branches et inférieure à **0.03%** pour l'huile essentielle des fruits rouges et noirs pour les trois souches bactériennes testées. Dans le cas de la souche fongique, *Candida albicans*, les huiles essentielles des feuilles/branches et fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) présentent des CMI > **2%** celle des fruits noirs est de **2**, la CMB n'a pas été déterminée (>**2%**).

L'analyse des résultats des CMI déterminées en utilisant la méthode de dilution dans un milieu gélosé confirme les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque (l'Aromatogramme).

Les valeurs des CMI des huiles essentielles vis-à-vis des souches microbiennes sensibles sont représentées dans le Tableau 26.

**Tableau n°26** : Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) des HE des feuilles/branches, fruits noirs et fruits rouges de *P. lentiscus* (L.).

Souches	CMI (v/v)		
	Feuilles /branches	Fruits rouges	Fruits noirs
<i>Escherichia. coli</i>	0.06	<0.03	<0.03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.06	< 0.03	<0.03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.06	< 0.03	< 0.03
<i>Candida albicans</i>	> 2	> 2	2

#### II.10.2.1.2. Les extraits

Tous les extraits exercent une activité inhibitrice contre les souches testées (**Tab. 27**). Les valeurs des CMI obtenues varient en fonction des souches et des échantillons utilisés.

##### Les branches

- La valeur de CMI enregistrées pour l'extrait méthanolique des branches de *P. lentiscus* (L.) est de **0,5%** pour l'ensemble des souches bactériennes sauf pour la souche fongique *Candida albicans* où la CMI est de **2%**.

- La valeur de CMI enregistrée pour l'extrait éthanolique, aqueux, acétonique des branches de *P. lentiscus* (L.) est de **2%** pour les trois souches bactériennes testées. Une CMI de **0.5%**, **0.06%** et **2%** est enregistrée respectivement pour ces trois extraits contre *Candida albicans*.

-La valeur de CMI enregistrée pour l'extrait hexanique des branches de *P. lentiscus* (L.) de **0,5%** pour l'ensemble des souches bactériennes testées sauf pour la souche fongique *Candida albicans* où la CMI est de **0.25%**.

##### Les feuilles

- La valeur de CMI enregistrée pour l'extrait méthanolique, acétonique et hexanique est de **0,5%**, elle est respectivement de **2 %** et **1 %** pour l'extrait éthanolique et aqueux des feuilles

de *P. lentiscus* (L.) est de pour les trois souches bactériennes testées, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est respectivement de **1%, 0.125% et 0.25%** pour l'extrait méthanolique, éthanolique et hexanique et **<0.03 %** pour l'extrait acétonique et aqueux.

#### Les fruits rouges

- La valeur de CMI enregistrées pour l'extrait méthanolique, éthanolique, acétonique des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** pour les trois souches bactériennes testées, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est de **0.25** pour l'extrait éthanolique et acétonique et de **0.5%** pour l'extrait méthanolique. Une CMI de **2%** et **0,5 %** est trouvée respectivement pour l'extrait aqueux et hexanique des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) pour les trois souches bactériennes testées et une très faible valeur enregistrée pour la souche fongique *Candida albicans* avec une CMI **<0.03 %** pour l'extrait aqueux et une CMI de **0.125 %** pour l'extrait hexanique.

#### Les fruits noirs

- La valeur de CMI enregistrées pour l'extrait méthanolique et aqueux des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** et une très faible valeur CMI **< 0.03%** est trouvée pour l'extrait acétonique pour les trois souches bactériennes testées, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est de **0.5%** pour l'extrait méthanolique, **0.125 %** pour l'extrait aqueux et de **0.5%** pour l'extrait acétonique.

- La valeur de CMI enregistrée pour l'extrait éthanolique des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **2%** pour les souches bactériennes *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, une CMI de **1** pour *Pseudomonas aeruginosa*, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est de **0.125%**.

- La valeur de CMI enregistrée pour l'extrait hexanique des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **0.5%** pour les souches bactériennes *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et **1%** pour *Staphylococcus aureus*, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est de **0.25%**.

Des valeurs de CMI allant de 62,5 à 125 (mg/mL) sont trouvées pour *S. aureus* ATCC; de 150-250 pour *P. aeruginosa* ATCC et *P. aeruginosa* et 250 pour *E. coli* pour l'extrait aqueux des feuilles de *P. lentiscus* (L.) (Debbabi et al., 2017). La force et le spectre d'activité varient entre le type Gram des bactéries cibles et le mode d'extraction de *P. lentiscus* (Benhammou et al., 2008 ; Djenane et al., 2011a). La CMI est susceptible d'être influencée par des facteurs tels que le milieu, la taille de l'inoculum, la température ou le temps d'incubation, ce qui explique la nécessité de méthodes de détermination standardisées afin d'obtenir des résultats comparables (Andrews, 2001).

**Tableau n° 27** : Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits étudiés.

	CMI (V/V)																			
	<i>Escherichia coli</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Candida albicans</i>				
	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX
<b>Branches</b>	0.5	2	2	2	0.5	0.5	2	2	2	0.5	0.5	2	2	2	0.5	2	0.5	0.06	2	0.25
<b>Feuilles</b>	0.5	2	1	0.5	0.5	0.5	2	1	0.5	0.5	0.5	2	1	0.5	0.5	1	0.125	0.03	<0.03	0.25
<b>Fruits rouges</b>	1	1	2	2	0.5	1	1	2	1	0.125	1	1	2	1	1	0.5	0.25	<0.03	0.25	0.125
<b>Fruits noirs</b>	1	2	1	<0.03	0.5	1	2	1	<0.03	0.5	1	2	1	<0.03	1	0.5	0.125	0.125	0.5	0.25

ME : Méthanol ; ET : Ethanol ; AQ : Aqueux ; AC : Acétone ; HEX : Hexane.

### II.11.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

#### II.11.2.2.1. Cas des huiles essentielles

Les CMB des huiles essentielles de *P.lentiscus* (L.) contre les souches microbiennes testées sont indiquées dans le Tableau 28. Pour définir le caractère bactériostatique ou bactéricide il est possible de calculer le rapport CMB/CMI. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieure à 4, l'extrait est qualifié de pouvoir bactériostatique (Guinoiseau, 2010 ; Joubert *et al.*, 1958).

**Tableau n°28:** Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.).

Souches	CMB (v/v)		
	Feuilles /branches	Fruits rouges	Fruits noirs
<i>E. coli</i>	0.125	0.06	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.125	0.06	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.125	0.06	0.06
<i>Candida albicans</i>	ND	ND	2

L'analyse des CMB obtenus fait apparaître que l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) a un effet bactéricide sur les trois souches bactériennes pour toutes concentrations testées. Une CMB de **0.125%** est enregistrée pour l'huile essentielle des feuilles/branches avec un rapport CMB/CMI=**2.08**. Un effet bactéricide et une CMB de **0.06%** ont été trouvés pour l'huile essentielle des fruits rouges et fruits noirs. Sur *Candida albicans*, l'huile essentielle des fruits noirs a donné une CMB de **2%**. Dans ce cas la CMB est égale à la CMI avec un rapport CMB/CMI=**1** mettant en évidence un effet fongicide contre cette levure. Dans le cas de la souche fongique *Candida albicans* les deux huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.) à savoir feuilles/branches et fruits rouges présentent des CMI>2%, la CMB n'a pas été déterminée (>2%) et donc ces deux huiles ne sont pas efficaces contre *Candida albicans* (Tab.29).

**Tableau n° 29 :** Rapports CMB/CMI des huiles essentielles étudiés.

Souches	CMB/CMI (v/v)		
	Feuilles /branches	Fruits rouges	Fruits noirs
<i>E.coli</i>	2.08	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.08	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.08	/	/
<i>Candida albicans</i>	/	/	1

#### II.10.2.2.2. Cas des extraits

##### ✚ Les branches

- La valeur de CMB enregistrées pour l'extrait méthanolique des branches de *P. lentiscus* (L.) est de **2 %** pour l'ensemble des souches microbiennes et pour l'extrait acétonique cela est enregistré pour *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* alors que pour la souche *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, la **CMB>2%**. Le rapport CMB/CMI est de **4** et **1** respectivement pour les trois souches bactériennes et la souche fongique *Candida albicans* cela signifie des effets bactéricides et fongicides de l'extrait méthanolique. Dans le cas de l'extrait acétonique, la CMB=CMI pour *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* donc cet extrait possède un effet bactéricide et fongicide avec un rapport CMB/CMI de **1**, alors que pour la souche *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, la **CMB>2%**, donc cet extrait présente un effet bactériostatique contre ces souches (CMB>CMI).

- Pour l'extrait éthanolique et aqueux des branches de *P. lentiscus* (L.), une CMB > **2%** est enregistrée pour les trois souches bactériennes, une CMB>CMI donc ces deux extraits possèdent un effet bactériostatique contre ces souches bactériennes, pour la souche fongique *Candida albicans* une CMB=**0.5%** et CMB = **0.06%** est trouvée respectivement pour l'extrait éthanolique et aqueux et donc ces derniers présentent un effet fongicide ce qui est confirmé par la valeur du rapport CMB/CMI qui est de **1**.

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait hexanique des branches de *P. lentiscus* (L.) de **0,5%** pour les souches microbiennes *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, la CMB=CMI donc cet extrait possède un effet bactéricide contre ces deux souches ceci est confirmé par le rapport CMB/CMI qui est de **1**. De même pour la souche fongique *Candida albicans* la CMB est de **0.5** donc l'effet est fongistatique (CMB/CMI=**2**), pour la souche *Staphylococcus aureus* où la CMB >**2%** donc l'effet est bactériostatique.

##### ✚ Les feuilles

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait méthanolique des feuilles de *P. lentiscus* (L.) est de **0,5%** pour les trois souches bactériennes testées (CMB=CMI) donc ce dernier présente un effet bactéricide ceci est confirmé par le rapport CMB/CMI=**1**, pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMI enregistrée est de **2%**, donc l'extrait possède un effet fongicide sur cette souche (CMB/CMI=**2**).

- Pour l'extrait éthanolique et aqueux des feuilles de *P. lentiscus* (L.), une CMB > **2%** est enregistrée pour les trois souches bactériennes la CMB>CMI donc l'effet est bactériostatique. Pour la souche fongique *Candida albicans* la CMB est de **1%** avec un rapport CMB/CMI=**8** donc l'effet cette souche est fongistatique pour l'extrait éthanolique. Une CMB de **0.06%** donc

CMB>CMI ce qui signifie que cet extrait possède un effet fongistatique contre cette souche.

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait acétonique des feuilles de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** pour les trois souches bactériennes avec un rapport CMB/CMI de **2**, ce qui signifie que cet extrait présente un effet bactéricide et une CMB de **0.06%** est enregistrée pour la souche fongique *Candida albicans* (le rapport CMB/CMI=ND, CMI≤**0.03%**).

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait hexanique des feuilles de *P. lentiscus* (L.) est de **2%** pour les souches bactériennes *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, avec un rapport CMB/CMI de **4** cela signifie que l'effet de cet extrait est bactériostatique, une CMB de **1%** est enregistré pour *Pseudomonas aeruginosa* avec un rapport CMB/CMI de **2** cela signifie que l'effet de cet extrait est bactéricide, pour la souche fongique *Candida albicans* une CMB de **0.5%** est trouvée, avec un rapport CMB/CMI de **2** cela signifie que l'effet de cet extrait est fongicide.

#### Les fruits rouges

- La valeur de CMB enregistrées pour l'extrait méthanolique des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** pour les trois souches bactériennes testées CMB=CMI ce qui signifie que cet extrait possède un effet bactéricide contre ces souches bactériennes et ceci est confirmé par le rapport CMB/CMI=1. Pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMB enregistrée est de **0.5%**, avec un rapport CMB/CMI=1 donc cet extrait possède un effet fongicide. De même la CMB=1 pour l'extrait hexanique des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** pour les souches microbiennes *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec un rapport CMB/CMI de **2**, **4** et **8** respectivement, donc l'effet de cet extrait est bactéricide en ce qui concerne les deux bactéries et pour la souche fongique *Candida albicans* l'effet de cet extrait est fongistatique. La valeur de CMB enregistrée pour Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* la CMB est **0.5%** avec un rapport CMB/CMI de **1** donc l'effet est bactéricide.

- Pour l'extrait éthanolique et aqueux des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.), une CMB > **2%** est enregistrée pour les trois souches bactériennes testées cela signifie que la CMB >CMI donc ces extraits possèdent un effet bactériostatique vis à vis les souches testées. Pour la souche fongique *Candida albicans* la CMB est de **0.25%** et **0.06 %** respectivement pour l'extrait éthanolique et aqueux avec un rapport CMB/CMI de **1** donc l'effet des deux extraits est fongicide.

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait acétonique des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) est de **2%** pour les trois souches bactériennes avec un rapport CMB/CMI de **2** donc l'effet de cet extrait est bactéricide. Pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMB enregistrée est de **0.5 %** avec un rapport CMB/CMI de **2** donc l'effet de cet extrait est fongicide.

### Les fruits noirs

- La valeur de CMB enregistrées pour l'extrait méthanolique des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **1%** pour les trois souches bactériennes testées avec un rapport CMB/CMI= **1** donc l'effet est bactéricide, de même pour la souche fongique *Candida albicans* la valeur de CMB enregistrée est de **0.5%**, CMB=CMI avec un rapport CMB/CMI=**1** donc cet extrait possède un effet fongicide.

- Pour l'extrait éthanolique et aqueux des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), une CMB > **2%** est enregistrée pour les trois souches bactériennes testées cela signifie que la CMB >CMI donc ces extraits possèdent un effet bactériostatique vis à vis les souches testées. Pour la souche fongique *Candida albicans* la CMB est de **0.125%** et **0.25%** avec un rapport CMB/CMI de **1** et **2** respectivement pour l'extrait éthanolique et aqueux donc l'effet de ces extraits est fongicide.

-La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait acétonique des des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **0.5%** pour *E. coli* ,**1%** *Pseudomonas aeruginosa* et une **CMB>2%** pour *Staphylococcus aureus* donc la CMB >CMI cela montre que cet extrait possède un effet bactériostatique vis à vis ces dernières, une CMB de **0.5%** est trouvé pour la souche fongique *Candida albicans* avec un rapport CMB/CMI de **2** donc l'effet est fongicide

- La valeur de CMB enregistrée pour l'extrait hexanique des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de **0.5%** pour les souches bactériennes *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et la souche fongique *Candida albicans*. Un rapport CMB/CMI de **1** est enregistré pour les deux souches bactériennes les donc l'effet est bactéricide et un rapport CMB/CMI de **2** pour la souche *Candida albicans* cela veut dire que l'effet est fongistatique. Une CMB de **1%** est trouvée dans le cas de *Staphylococcus aureus* avec un rapport CMB/CMI de **2** donc l'effet est également bactéricide.

**Tableau n° 30:** Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des extraits étudiés.

	CMB (V/V)																			
	<i>Escherichia coli</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Candida albicans</i>				
	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX
<b>Branches</b>	2	>2	>2	>2	05	2	>2	>2	>2	0.5	2	>2	>2	2	>2	2	0.5	0.06	2	0.5
<b>Feuilles</b>	0.5	>2	>2	1	2	0.5	>2	>2	1	1	0.5	>2	>2	1	2	2	1	0.06	0.06	0.5
<b>Fruits rouges</b>	1	>2	>2	2	1	1	>2	>2	2	0.5	1	>2	>2	2	1	0.5	0.25	0.06	0.5	1
<b>Fruits noirs</b>	1	>2	>2	>2	0.5	1	>2	>2	1	0.5	1	>2	>2	>2	1	0.5	0.125	0.25	0.5	0.5

ME : Méthanol ; ET : Ethanol ; AQ : Aqueux ; AC : Acétone ; HEX : Hexane.

**Tableau n °31:** Rapports CMB/CMI des extraits étudiés.

	CMB/CMI																			
	<i>Escherichia coli</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Candida albicans</i>				
	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX	ME	ET	AQ	AC	HEX
<b>Branches</b>	4	/	/	/	1	4	/	/	/	1	4	/	/	1	/	1	1	1	1	2
<b>Feuilles</b>	1	/	/	2	4	1	/	/	2	2	1	/	/	2	4	2	8	/	/	2
<b>Fruits rouges</b>	1	/	/	2	2	1	/	/	2	4	1	/	/	2	1	1	1	/	2	1
<b>Fruits noirs</b>	1	/	/	/	1	1	/	/	/	1	1	/	/	/	1	1	1	2	1	2

ME : Méthanol ; ET : Ethanol ; AQ : Aqueux ; AC : Acétone ; HEX : Hexane.

Dans l'ensemble, les résultats de la présente étude montrent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et extraits du pistachier lentisque est très importante sur l'ensemble des souches microbiennes étudiées.

## II.12. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle et des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.)

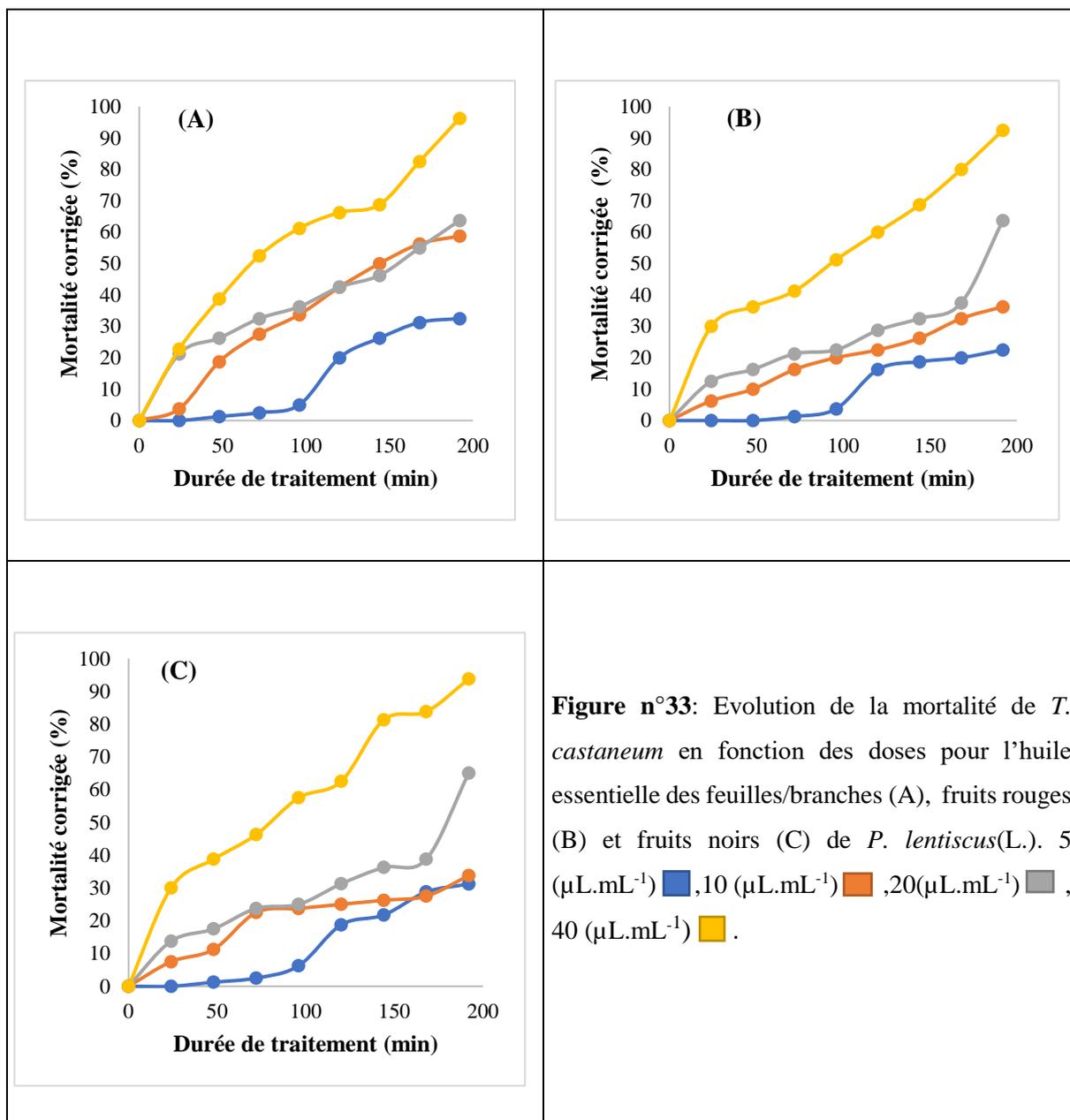
Dans le cadre de la recherche d'autres activités biologiques nous avons procédé à l'évaluation de du pouvoir insecticide de l'huile essentielle et des extraits par le test de contact et le test d'inhalation contre un des ravageurs des denrées stockées, *Tribolium castaneum*.

### II.12.1. Evaluation de l'activité insecticide par « Effet contact » sur *Tribolium castaneum*

#### II.12.1.1. Evaluation de la toxicité par contact de l'huile essentielle du pistachier lentisque

L'évaluation de la toxicité de l'huile essentielle du pistachier lentisque (feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs) est réalisée par le comptage des insectes morts et le calcul de la mortalité corrigé.

Les résultats montrent que l'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) provoque une mortalité importante, respectivement de  $0.0 \pm 0.0$  à  $96.25 \pm 2.16\%$ , de  $0.0 \pm 0.0$  à  $92.5 \pm 2.5\%$  et de  $0.0 \pm 0.0$  à  $93.75 \pm 2.16\%$  respectivement, après 8 jours d'exposition, de la plus faible ( $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) à la plus forte dose ( $40 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (**Fig. 33**). Les huiles essentielles testées manifestent une activité insecticide par contact vis-à-vis de *T. castaneum*. Les effets toxiques des huiles essentielles dépendent du ravageur, de l'essence testée et de la durée d'exposition (**Kim et al., 2003**). En effet, pour les trois huiles utilisées, l'efficacité augmente avec la dose d'huile utilisée et le temps de contact. Ces résultats sont conformes à ceux de nombreux travaux (**Shakarami et al., 2004 ; Bachrouch et al., 2010 ; Ouedraogo et al., 2016**).



**Figure n°33:** Evolution de la mortalité de *T. castaneum* en fonction des doses pour l'huile essentielle des feuilles/branches (A), fruits rouges (B) et fruits noirs (C) de *P. lentiscus*(L.). 5 ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) ■, 10 ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) ■, 20 ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) ■, 40 ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) ■.

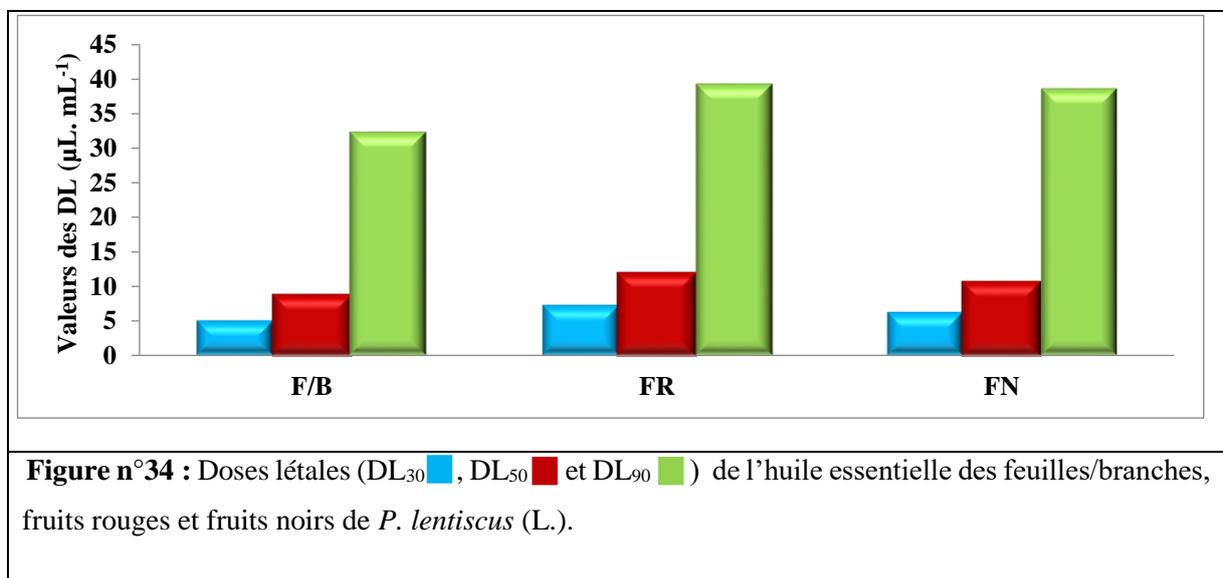
Pour évaluer plus précisément l'efficacité de la toxicité des huiles essentielles, nous avons calculé les  $DL_{30}$ ,  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$ , définies comme étant les doses qui provoquent respectivement 30%, 50 % et 90 % de mortalité dans la population de *T. castaneum*.

Ces valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe expérimentale donnant les variations du pourcentage de mortalité en fonction des doses croissantes d'huile essentielle.

L'huile essentielle des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) est la plus toxique vis-à-vis des adultes de *T. castaneum* avec les plus faibles valeurs de  $DL_{30}$ ,  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  qui sont respectivement de **5.01  $\mu\text{L.mL}^{-1}$**  (0.0638  $\mu\text{l/cm}^2$ ), **8.59  $\mu\text{l/ml}$**  (0.1094  $\mu\text{l/cm}^2$ ) et **32.31  $\mu\text{L.mL}^{-1}$**  (0.41159  $\mu\text{l/cm}^2$ ). Elle est suivie de celle des fruits noirs avec respectivement une  $DL_{30}$  de **6.23  $\mu\text{L.mL}^{-1}$**  (0.0793  $\mu\text{l/cm}^2$ ), une  $DL_{50}$  de **10.55  $\mu\text{L.mL}^{-1}$**  (0.1343  $\mu\text{l/cm}^2$ ) et une valeur de

DL<sub>90</sub> de **38.58  $\mu\text{L. mL}^{-1}$**  (0.4914  $\mu\text{l /cm}^2$ ). Celle des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) est la moins efficace vis-à-vis des adultes du ravageur étudié. Pour cette huile, la DL<sub>30</sub> est de **7.24  $\mu\text{L. mL}^{-1}$**  (0.0922  $\mu\text{l /cm}^2$ ), pour la DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub>, on a enregistré une valeur de **11.80  $\mu\text{L. mL}^{-1}$**  (0.1503  $\mu\text{l/cm}^2$ ) et **39.30  $\mu\text{L. mL}^{-1}$**  (0.5006  $\mu\text{l /cm}^2$ ) respectivement après huit jours de traitement (**Fig. 34**).

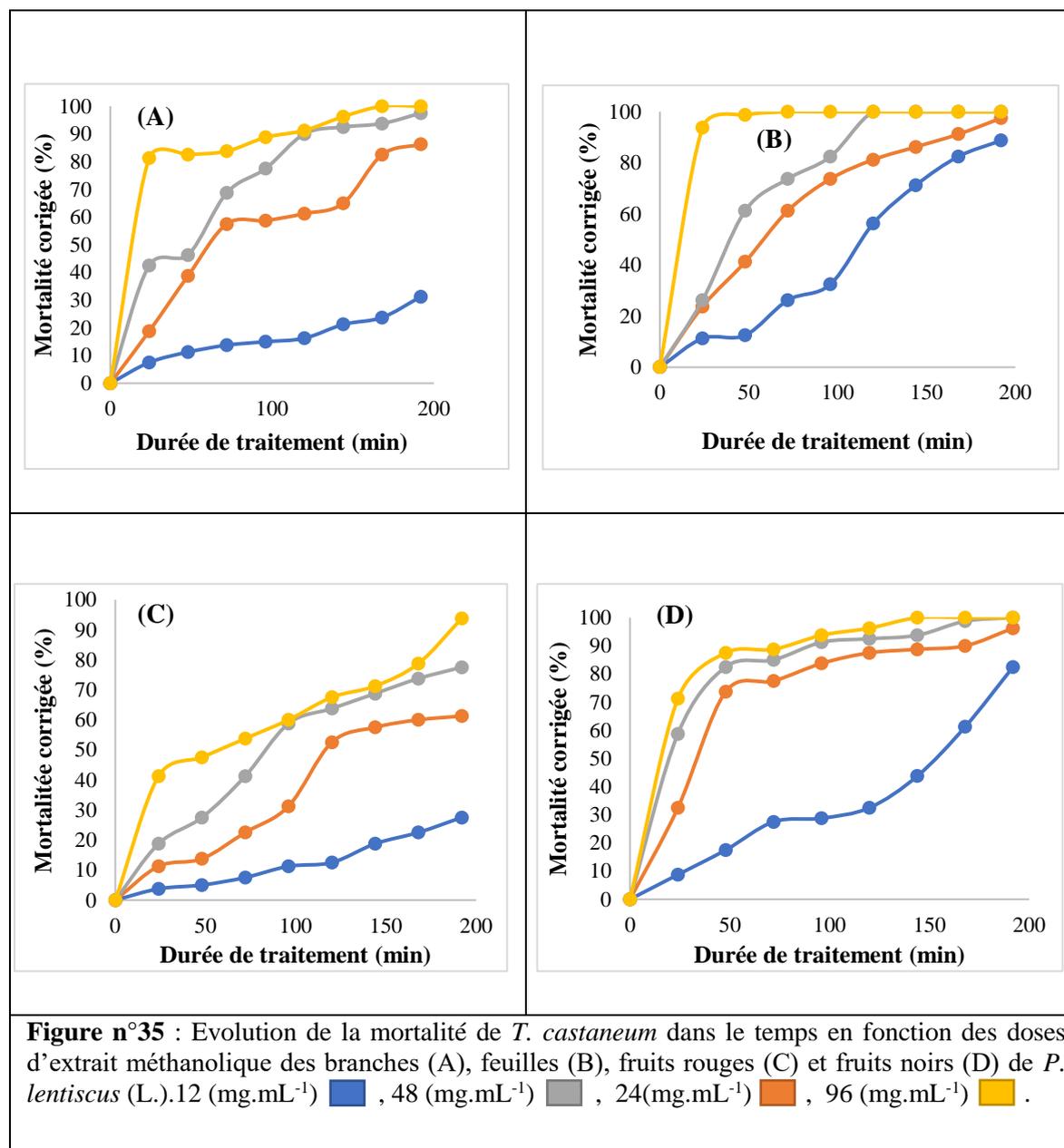
Les différences enregistrées entre les trois huiles étudiées seraient peut-être dû à leurs compositions chimiques. En effet, cette activité peut être expliquée par la teneur élevée en monoterpènes oxygénés tels que le 4-Terpineol et  $\alpha$ -Terpeneol dans l'huile essentielle des feuilles/branches (42,54%) par rapport à l'huile des fruits rouges (1,71%) et celle des fruits noirs (4,46%). Les huiles essentielles les plus efficaces sont celles qui contiennent majoritairement des composés oxygénés monoterpéniques à fonction alcool, cétone ou ester (**Nébié, 2006**). Les terpènes qui sont les principaux constituants des huiles essentielles sont responsables des activités insecticides. En effet, les monoterpènes inhibent le cholinestérase et les composés soufrés qui agissent sur les canaux potassium de certains insectes (**Garneau, 2001**). Les huiles essentielles ont généralement un large spectre d'activité, en raison de la présence de plusieurs composés actifs qui agissent par plusieurs modes d'actions (**Chiasson et al., 2004**).



Cette huile essentielle présente une activité insecticide contre le bruché du niébé *Callosobruchus maculatus* et *Ephestia kuehniella* Zeller (**Taleb-Toudert, 2015**). La combinaison de l'huile essentielle de *P. lentiscus* et de *Mentha microphylla* C. Kock et *P. lentiscus* et de *Myrtus communis* L présentent des effets significatifs contre le moustique *C. pipiens*, où la mortalité totale a été atteinte par un test de contact (**Traboulsi et al. 2002**).

### II.12.1.2. Evaluation de la toxicité par contact des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.)

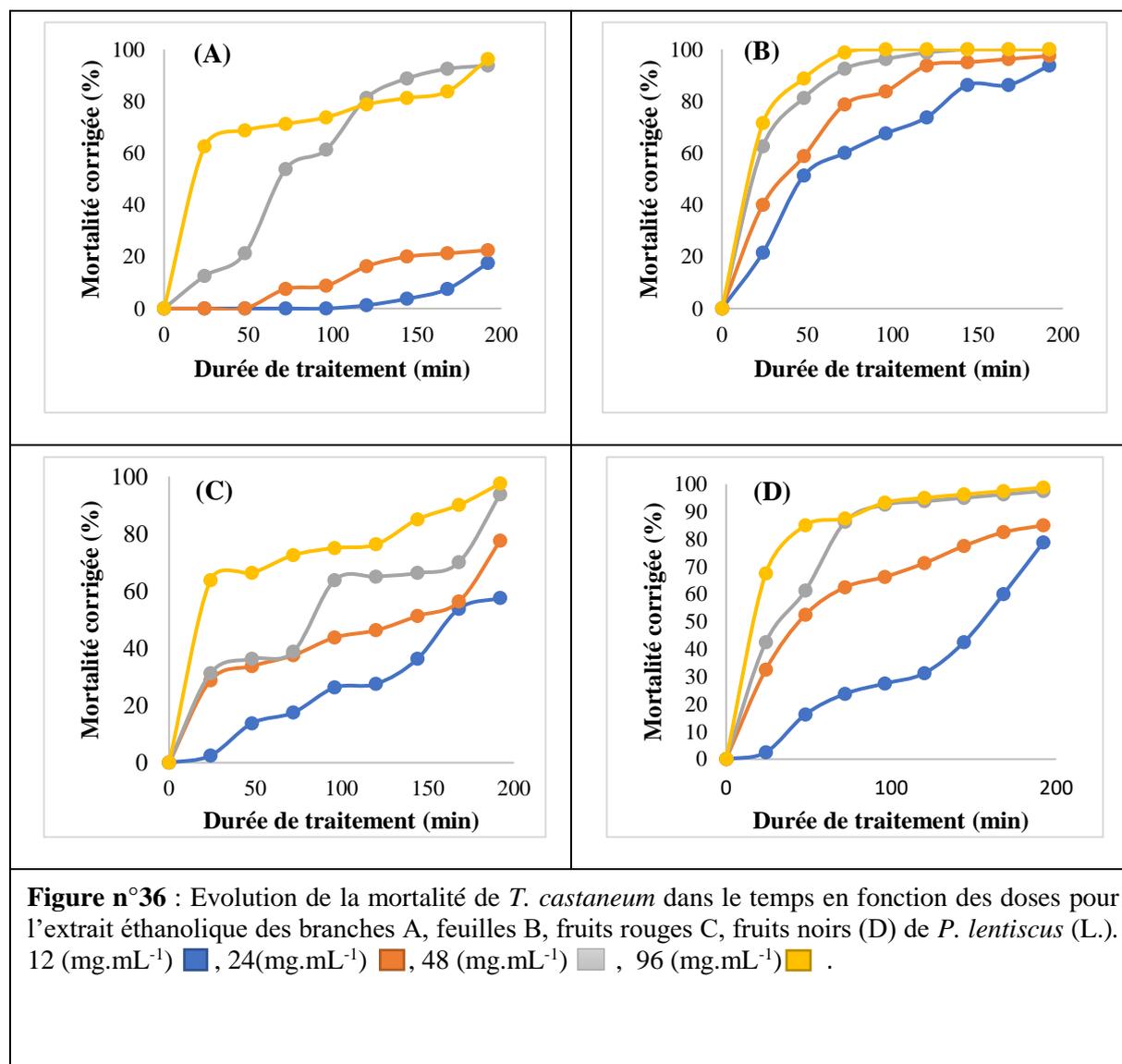
Les taux de mortalité des insectes observés en fonction du temps et des différentes doses des extraits des différents organes de *P. lentiscus* (L.) montrent qu'aux doses utilisées, les extraits sont efficaces à l'égard de *T. castaneum* (Fig. 34). Les mortalités enregistrées sont proportionnelles aux temps d'exposition et aux doses employées d'extraits. Au huitième jour d'exposition, des taux de  $93.75 \pm 100 \pm 0.0$  % de mortalité ont été obtenus par les différents extraits testés sur les adultes du ravageur pour la plus grande dose ( $96 \text{ mg. mL}^{-1}$ ).



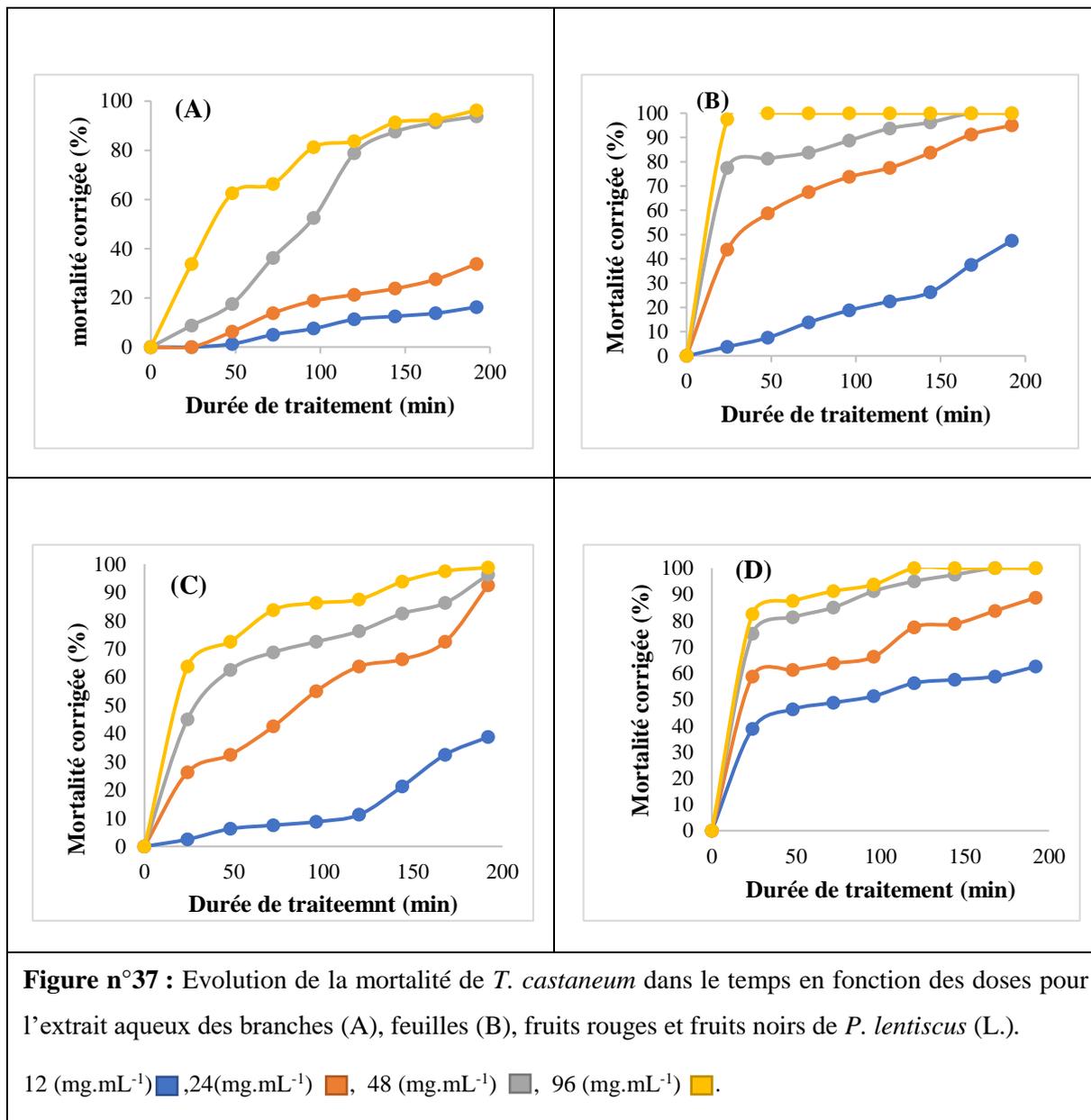
En effet, au bout de 8 jours, le taux de mortalité enregistré pour l'extrait méthanolique de la plus faible dose (12 mg) à la plus élevée (96mg) est respectivement de  $7.5 \pm 2.5$  % à

**100±0.0%** pour l'extrait des branches, de **11.25±2.16%** à **100±0.0%** pour les feuilles, de **3.75±4.14%** à **93.75±2.16%** pour les fruits rouges et **8.75± 2.16%** à **100±0.0%** pour les fruits noirs (Fig.34). Pour la dose la plus élevée (96mg), un taux de mortalité de **82.5±2.5%**, **98.75±2.16%**, **47.5±2.5%** et **87.5±2.5%** est atteint au bout de 48 h respectivement pour les branches, feuilles, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.).

De même pour l'extrait éthanolique, le taux de mortalité enregistré pour les ranches passe de la plus faible dose à la plus forte dose de **0±0.0%** à **96.25±2.16%**, de **21.25±4.14%** à **100±0.0%** pour les feuilles, pour les fruits rouges il passe de **2.5± 2.5%** à **97.5 ±2.5%**, un taux allant de **2.5±4.33%** à **98.75±2.16%** est trouvé pour les fruits noirs. En effet ces pourcentages de mortalité sont atteints au bout de 8 jours (Fig. 36). Pour la dose la plus élevée (96mg), un taux de mortalité de % **68.75±2.16**, **88.75±5.44%**, **66.25±6.49%** et **85±3.53%** est atteint au bout de 48 h respectivement pour les branches, feuilles, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.).

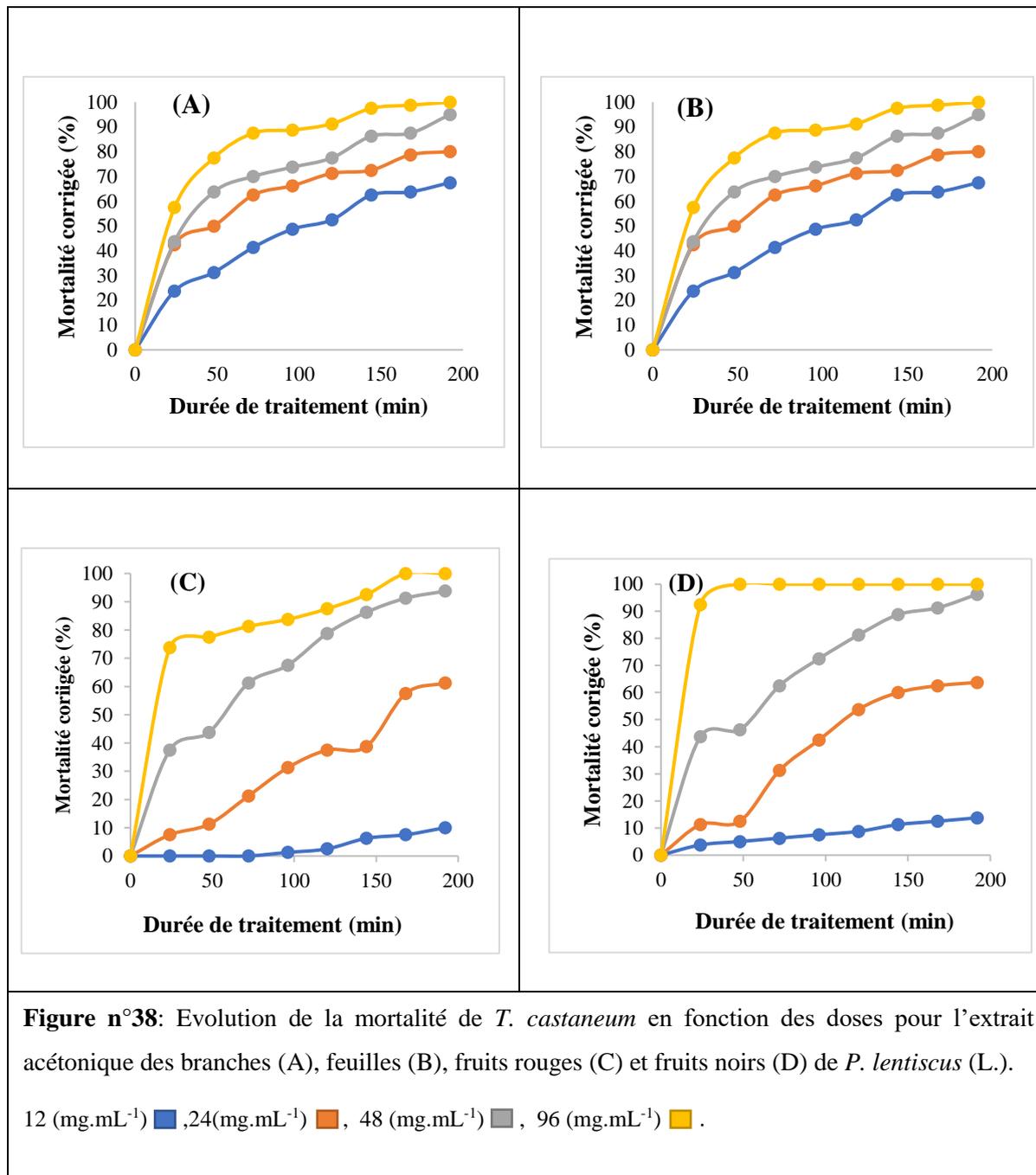


Dans le cas de l'**extrait aqueux** le taux de mortalité enregistré au bout de 8 jours pour les branches passe de la plus faible dose à la plus forte dose de  $0\pm 0.0\%$  à  $96.25\pm 2.16\%$ , de  $3.75\pm 4.14\%$  à  $100\pm 0.0\%$  pour les feuilles, de  $2.5\pm 2.5\%$  à  $98.75\pm 2.16\%$ , pour les fruits rouges et  $38.75\pm 2.13\%$  à  $100\pm 0.0\%$  pour les fruits noirs (Fig. 37). Pour la dose la plus élevée (96mg), un taux de mortalité de  $62.5\pm 2.5\%$ ,  $100\%\pm 0.0\%$ ,  $72.5\pm 2.5\%$  et  $87.5\pm 2.5\%$  est atteint au bout de 48 h respectivement pour les branches, feuilles, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.).

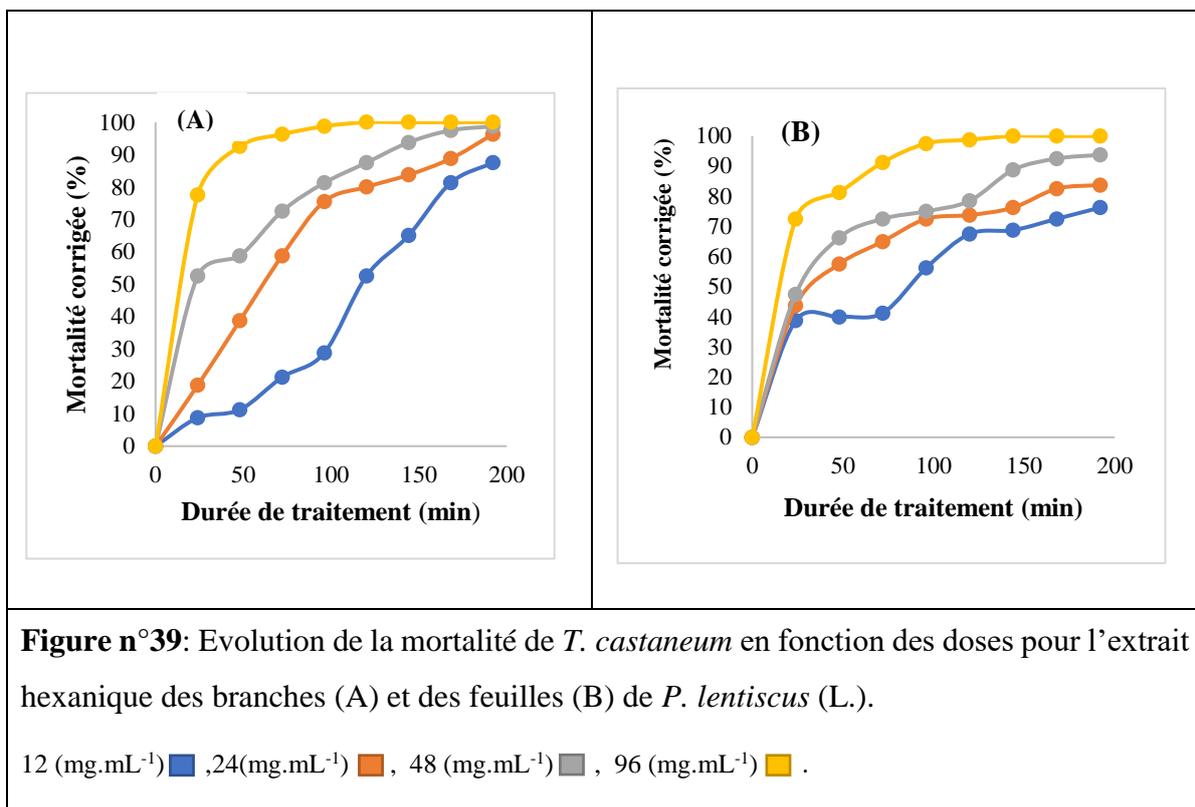


De même pour l'**extrait acétonique** des taux de mortalité, après 8 jours de contact, passe de  $0\pm 0.0\%$  à  $100\pm 0.0\%$  de la faible dose à la plus forte dose, sont enregistré pour les branches. Le taux de mortalité passe de  $23.75\pm 2.16$  à  $100\pm 0.0\%$ , les feuilles. Concernant les fruits rouges et les fruits noirs ce dernier passe de  $0\pm 0.0\%$  à  $100\pm 0.0\%$  et de  $3.75\pm 2.16\%$  à

**100±0.0%** (Fig. 38). Pour la dose la plus élevée (96mg), un taux de mortalité de **91.25±2.5%**, **77.5±2.5%**, **77.5±2.5 %** et **100±0.0%** est atteint au bout de 48 h respectivement pour les branches, feuilles, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.).



Comme pour les autres extraits, l'extrait hexanique des branches et des feuilles de *P. lentiscus* (L.), enregistre après 8 jours de traitement un taux de mortalité allant de **8.75±2.16%** à **100±0.0%** et de **38.75±2.16%** à **100±0.0 %** respectivement, de la plus faible à la plus forte dose (Fig.39). Pour la dose la plus élevée (96mg), un taux de mortalité de **92.5±2.5%** et **81.25±2.16%** est atteint au bout de 48 h respectivement pour les branches, feuilles, de *P. lentiscus* (L.).



Les différents extraits testés présentent un effet insecticide sur les adultes de *T. castaneum*. En effet, l'efficacité de ces extraits varie en fonction de l'organe étudiée, de la dose utilisée et de la durée de traitement. **Pour l'extrait méthanolique** un taux de mortalité de  $100\pm 0.00\%$  est atteint au bout de **7 jours** à la dose de **96 mg** pour les branches, alors que pour les feuilles ce taux est atteint après **5** et **2 jours** respectivement pour la dose **48** et **96mg**. Pour les fruits noirs ce taux est enregistré après **6** et **7 jours** respectivement pour une dose de **48** et **96 mg**. Pour les fruits rouges on est arrivé à un taux de  $93.75\pm 2.16\%$  après **8 jours** pour une dose de **96mg**.

**Pour l'extrait éthanolique**, un taux de mortalité de  $96.25\pm 2.16\%$  est atteint au bout de **8 jours** à la dose de **96 mg** pour les branches, alors que pour les feuilles un taux de  $100\pm 0.00\%$  est atteint après **6** et **4 jours** respectivement pour la dose **48** et **96mg**. Pour les fruits rouges et noirs un taux de  $97.5\pm 2.5\%$  et  $98.75\pm 2.16\%$  est atteint après **8 jours** pour une dose de **96 mg** respectivement.

**Pour l'extrait aqueux**, un taux de mortalité de  $96.25\pm 2.16\%$  est atteint au bout de **8 jours** à la dose de **96 mg** pour les branches, alors que pour les feuilles un taux de  $100\pm 0.00\%$  est atteint après **2** et **7 jours** respectivement pour la dose **48** et **96mg**. Pour les fruits rouges un taux de  $98.75\pm 2.16\%$  est atteint après **8 jours** pour une dose de **96 mg**. Pour les fruits noirs on est arrivé à un taux de mortalité de  $100\pm 0.00\%$  après **5** et **7 jours** respectivement pour une dose de **48** et **96mg**.

Pour l'**extrait acétonique**, un taux de mortalité de **100±0.00%** est atteint au bout de **8 jours** à la dose de **96 mg** pour les branches et les feuilles. Pour les fruits rouges et les fruits noirs ce taux est atteint après **7** et **2 jours** pour une dose de **96 mg** respectivement.

Pour **hexanique**, un taux de mortalité de **100±0.00%** est atteint au bout de **5** et **6 jours** à la dose de **96 mg** respectivement pour les branches et les feuilles.

La transformation des pourcentages de mortalité des adultes de *T. castaneum* après 8 jours de traitement en probits, et le tracé des courbes de régression de ces données en fonction du logarithme de la dose en extraits a permis d'obtenir les DL<sub>30</sub>, DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> (**Fig. 40**).

Les DL<sub>30</sub> trouvées pour l'extrait méthanolique varient de **1.41** à **12.18 mg. mL<sup>-1</sup>**. Les DL<sub>50</sub> varient de **2.59** à **20.40 mg. mL<sup>-1</sup>**, alors que pour les DL<sub>90</sub> des valeurs allant de **11.77** à **74.09 mg.mL<sup>-1</sup>** ont été enregistrées (**Fig. 40 A**).

Les DL<sub>30</sub> de l'extrait éthanolique des 04 organes varient de **1.04** à **18,15 mg. mL<sup>-1</sup>** Les DL<sub>50</sub> varient de **1.93** à **25,75 mg.mL<sup>-1</sup>**, alors que pour DL<sub>90</sub> les valeurs enregistrées varient de 8.75 à 60.94 mg/ml (**Fig.40B**).

Les DL<sub>30</sub> trouvées pour l'extrait aqueux des quatre parties varient de 6.42 à 17.36 mg/ml, les DL<sub>50</sub> de **9.14** à **24.80 mg/ml** et les DL<sub>90</sub> de **22.24** à **59.64 mg.mL<sup>-1</sup>** (**Fig.40 C**).

Les DL<sub>30</sub> trouvées pour l'extrait acétonique des quatre parties varient de 6.68 à 16.80 mg/ml, les DL<sub>50</sub> de **10.13** à **21.65 mg/ml**, et les DL<sub>90</sub> de **28.23** à **40.39 mg/ml** (**Fig. 39 D**).

Les DL<sub>30</sub> trouvées pour l'extrait hexanique des branches et des feuilles sont respectivement de **1.93** et **5.10 mg. mL<sup>-1</sup>**, les DL<sub>50</sub> de **3.42** pour les branches et **8.14 mg.mL<sup>-1</sup>** pour les feuilles et les DL<sub>90</sub> sont de **13.98** et **25.78 mg.mL<sup>-1</sup>** respectivement pour les branches et les feuilles (**Fig.40E**).

L'analyse globale des résultats en se basant sur la DL<sub>50</sub> de la plus petite valeur à la plus grande valeur révèle que l'effet induit par les différents extraits de branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) sur la survie de *T. castaneum* varie entre les extraits testés (**Tab. 31**). De plus, pour le même extrait les valeurs des DL<sub>50</sub> varient selon l'organe utilisé. Pour l'extrait au méthanol la DL<sub>50</sub> la plus faible (**2.59 mg. mL<sup>-1</sup>**) est obtenue pour les feuilles, suivi des fruits noir (**4.67 mg.mL<sup>-1</sup>**), branches (**16.19 mg.L<sup>-1</sup>**) puis les fruits rouges (**20.40 mg.mL<sup>-1</sup>**).

L'action insecticide de l'extrait éthanolique de *P. lentiscus* (L.) semble très importante. Une DL<sub>50</sub> de **25.75 mg. mL<sup>-1</sup>** et **1.93 mg.mL<sup>-1</sup>** sont respectivement notées pour les branches et les feuilles, une DL<sub>50</sub> de **9.71 mg.mL<sup>-1</sup>** pour les fruits rouges et **4.88 mg.mL<sup>-1</sup>** pour les fruits

noirs est obtenus. Ceci montre que les feuilles et les fruits noirs possèdent l'activité insecticide le plus important suivi des fruits rouges et des branches.

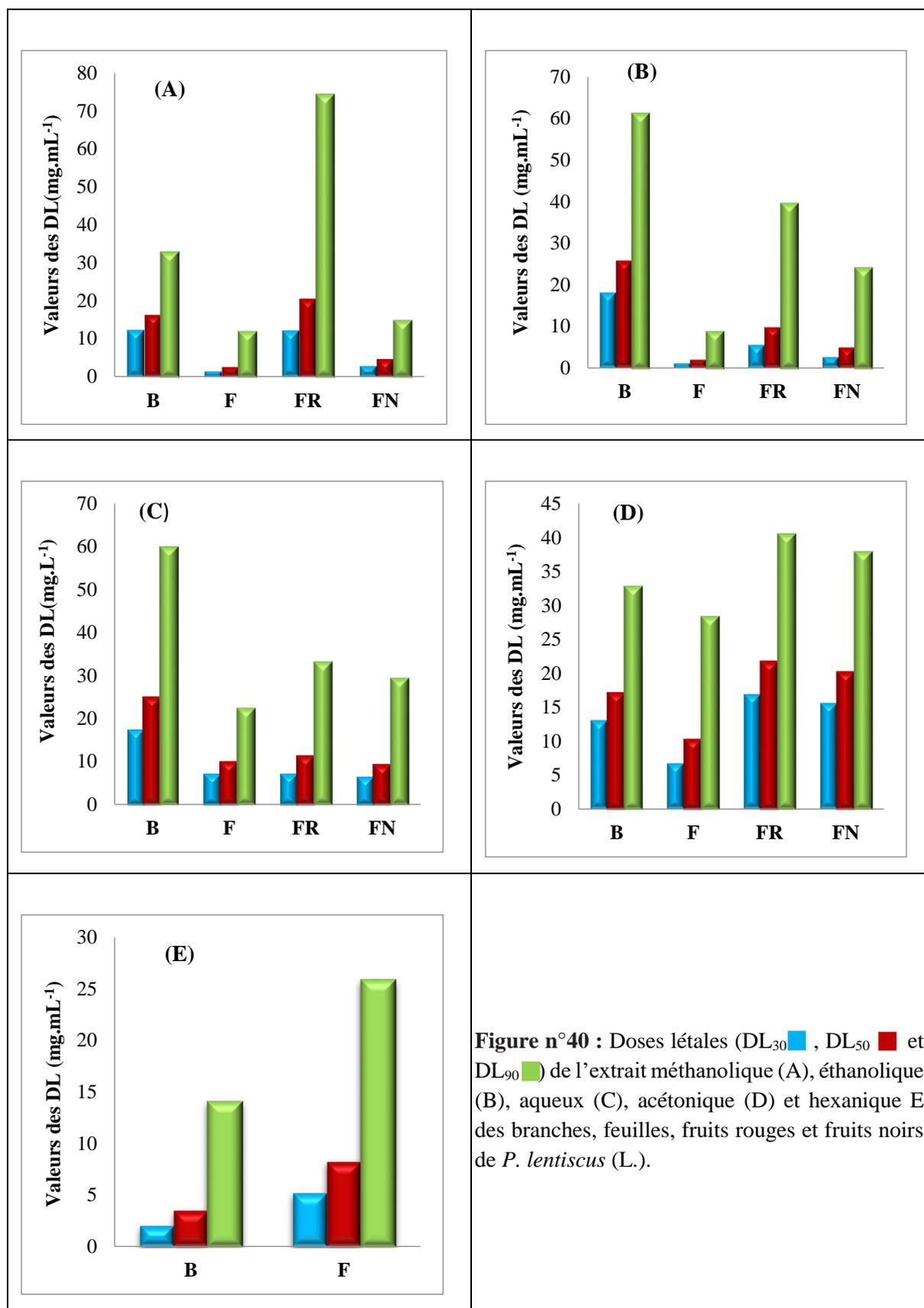


Figure n°40 : Doses létales (DL<sub>30</sub> ■, DL<sub>50</sub> ■ et DL<sub>90</sub> ■) de l'extrait méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) et hexanique (E) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

L'extrait aqueux provoque une mortalité de 50% avec une dose de **9.14 mg. mL<sup>-1</sup>** pour les fruits noirs suivi des feuilles **9.83 mg.mL<sup>-1</sup>**, **11.17 mg.mL<sup>-1</sup>** pour les fruits rouges et en dernier vient les branches avec une DL<sub>50</sub> de **24.80 mg.mL<sup>-1</sup>**.

Pour l'extrait acétonique, la dose la plus faibles qui provoque 50 % de mortalité est enregistrée pour les feuilles, elle est de **10.30 mg. mL<sup>-1</sup>**, par la suite vient les branches avec une DL<sub>50</sub> de **16,99 mg.mL<sup>-1</sup>**, les fruits noirs (**20.079mg.mL<sup>-1</sup>**), vient en dernier les fruits rouges (**21.64 mg.mL<sup>-1</sup>**).

L'extrait hexanique provoque une mortalité de 50% qui de **3.42 mg. mL<sup>-1</sup>** et **8.14 mg.mL<sup>-1</sup>** respectivement pour les branches et les feuilles respectivement.

**Tableaux n° 32 :** Valeurs des DL<sub>30</sub>, DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> (mg. mL<sup>-1</sup>) des extraits des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) dans le test de l'activité insecticide par contact.

		DL <sub>30</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	DL <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	DL <sub>90</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )
Extrait méthanolique	Branches	12.18	16.19	32.62
	Feuilles	1.40	2.59	11.75
	Fruits rouges	12.08	20.40	74.09
	Fruits noirs	2.79	4.67	14.65
Extrait éthanolique	Branches	18.15	25.75	60.94
	Feuilles	1.04	1.93	8.75
	Fruits rouges	5.49	9.71	39.46
	Fruits noirs	2.55	4.88	24.02
Extrait aqueux	Branches	17.36	24.80	59.64
	Feuilles	7.05	9.83	22.24
	Fruits rouges	7.19	11.77	33.01
	Fruits noirs	6.42	9.14	29.22
Extrait acétonique	Branches	13.03	16.99	32.66
	Feuilles	6.68	10.13	28.23
	Fruits rouges	16.80	21.64	40.39
	Fruits noirs	15.53	20.079	37.79
Extrait hexanique	Branches	1.93	3.42	13.98
	Feuilles	5.10	8.14	25.78
	Fruits rouges	2.65	4.12	12.20
	Fruits noirs	2.28	3.04	6.17

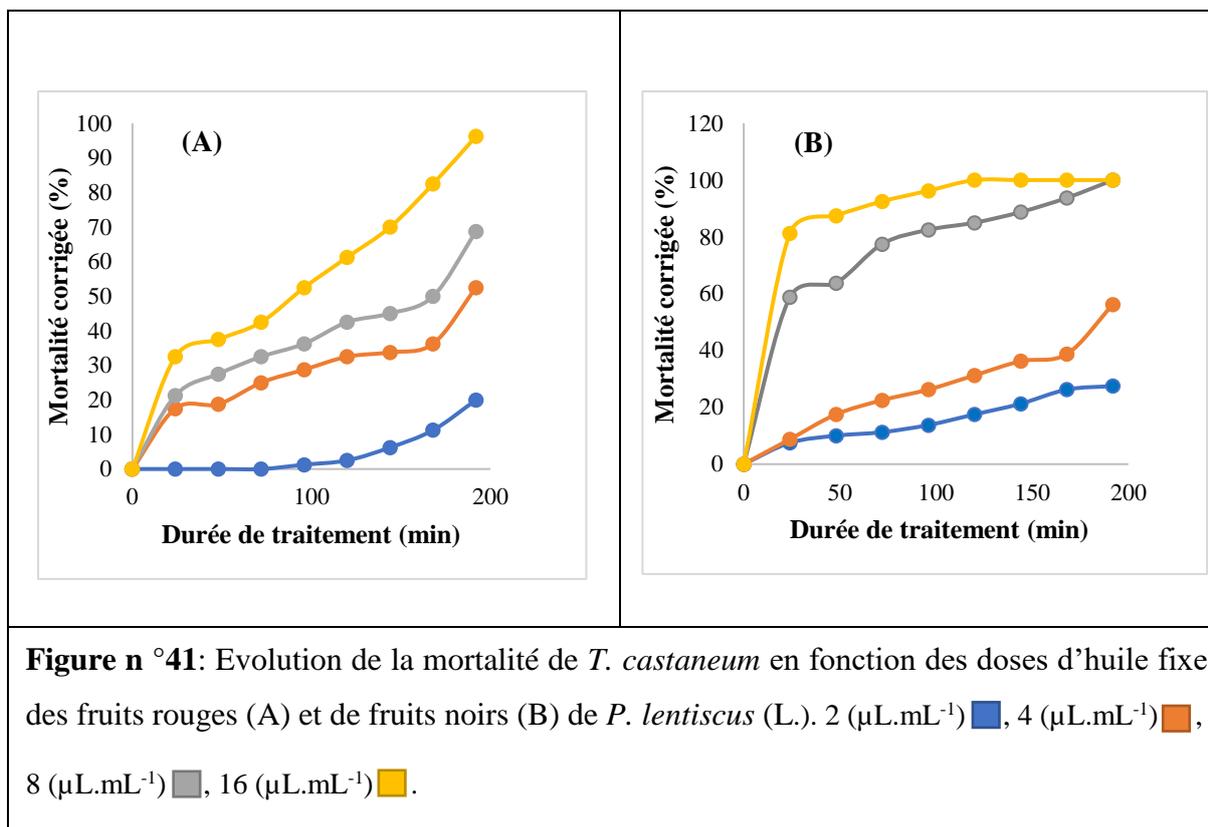
En effet, les DL<sub>50</sub> obtenus, pour les différents organes de *P. lentiscus* (L.), montre que tous les extraits testés présentent un effet insecticide très important mais les DL<sub>50</sub> les plus faible sont obtenus pour les extraits des fruits noirs suivi des feuilles par la suite viennent les extraits des fruits rouges et en dernier les extraits des branches. L'ensemble de ces résultats montre que les fruits noirs et les feuilles possèdent l'activité insecticide la plus importante suivi des fruits rouges et des branches quel que soit le type de solvant utilisé, sauf pour l'extrait méthanolique qui a la DL<sub>50</sub> la plus faible pour les feuilles, suivi des fruits noirs puis branches pour viennent en dernier les fruits rouges ainsi que l'extrait éthanolique des fruits rouges a la DL<sub>50</sub> la plus faible suivi des branches, fruits noirs puis les feuilles. Par ailleurs, les différences de mortalité entre les différents extraits en utilisant les cinq solvants ne sont pas importantes. L'eau qui ne pose pas problème lorsqu'il est en contact avec les produits traités peut être considéré comme le meilleur solvant pour l'extraction des substances actives pour lutter contre les insectes ravageurs contrairement aux autres solvants organiques qui peuvent poser des problèmes de toxicité et qui sont très nocifs pour la santé du consommateur.

Tous les extraits de *P. lentiscus* (L.) possèdent une très bonne activité insecticide vis-à-vis du *T. castaneum* qui pourrait être-attribuée à la richesse de ces extraits en différentes classes de composés bioactives.

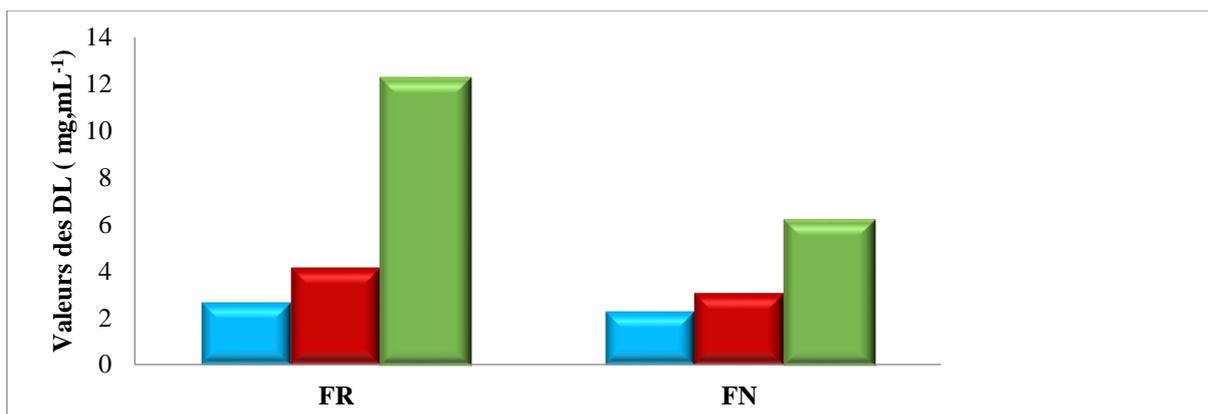
#### **II.12.1.3. Activité insecticide de l'huile fixe des fruits de *P. lentiscus* (L.)**

Les résultats du test de toxicité de l'huile fixe extraite des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) par contact contre les adultes de *Tribolium castaneum* sont représentés dans les figures ci-dessous.

L'huile fixe extraite des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) provoque une mortalité peu importante comparativement à celle de l'huile extraite des fruits noirs. De la plus faible à la plus forte dose, la mortalité corrigée passe de  $0 \pm 0.0$  % à  $96.25 \pm 2.16$  % pour les fruits rouges et de  $7.5 \pm 2.5$  % à  $100 \pm 0.0$  % dans le cas des fruits noirs. Les résultats de l'activité insecticide de l'huile fixe extraite des fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.) montrent un effet toxique sur des adultes de *T. castaneum*, proportionnel à la dose employée et à la durée de traitement. L'huile extraite des fruits noirs est plus efficace que l'huile extraite des fruits rouge en effet pour la dose la plus élevée (16 $\mu$ L) au **5<sup>ème</sup> jour** le taux de mortalité est de  $96.25 \pm 2.16\%$  et  $100 \pm 0.00\%$  respectivement pour les fruits rouges et les fruits noirs.



Les valeurs de  $DL_{30}$  enregistrées pour les fruits rouges et les fruits noirs sont respectivement de  $2.65 \mu\text{L.mL}^{-1}$  et  $2.28 \mu\text{L.mL}^{-1}$ . L'huile extraite des fruits noirs s'est avérée plus efficace que celle des fruits rouges avec une  $DL_{50}$  de  $4.12 \mu\text{L.mL}^{-1}$  ( $0.05248 \mu\text{l/cm}^2$ ) et  $3.0401 \mu\text{L.mL}^{-1}$  ( $0.03872 \mu\text{l/cm}^2$ ). Les valeurs de  $DL_{90}$  trouvées sont de  $12.20 \mu\text{L.mL}^{-1}$  et  $6.17 \mu\text{L.mL}^{-1}$  (Fig.41).



**Figure n°42:** Doses létales ( $DL_{30}$  ■,  $DL_{50}$  ■ et  $DL_{90}$  ■) de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.).

L'activité insecticide de l'extrait hexanique (huile fixe) des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) peut être attribuée à leur richesse en acide gras. Les huiles végétales riches en

acides gras saturés possèdent des propriétés bactéricides, fongicides et insecticides (**Baxendale et Johnson, 1990**). La toxicité des acides gras s'exerce par la rupture des membranes cellulaires et de la cuticule de l'insecte (**Weinzeirl, 1998**). Les huiles végétales sont utilisées très tôt dans la lutte contre les insectes sous forme d'émulsion. Ce sont à la fois des insecticides de contact qui agissent par leurs propriétés physiques et chimiques et des adjuvants pour leurs molécules liposolubles et leur action peut être synergique dans certains cas (**Regnault-roger et al., 2002**).

L'activité insecticide de certains acides gras tels que l'acide oléique en **C18 :1Δ9** qui est l'un des acides gras les plus abondants dans nos huiles fixes a été mis en évidence (**Regnault-Roger et al. 2002**). Les traitements de contact induisent la formation d'un film d'huile qui obture aussi les orifices respiratoires, ou stigmates, privant ainsi l'insecte d'oxygène et provoquant son asphyxie. La toxicité des acides gras s'exerce aussi par la rupture des membranes cellulaires (**Weinzeirl, 1998**).

Les huiles végétales ont une activité insecticide similaire et prometteuse à l'égard des insectes ravageurs des denrées entreposées (**Lienard et al., 1993 ; Ramzan, 1994 ; Pacheco et al., 1995 ; Ahmed et al., 1999 ; Kellouche et al., 2004 ; Nana et al., 2014**).

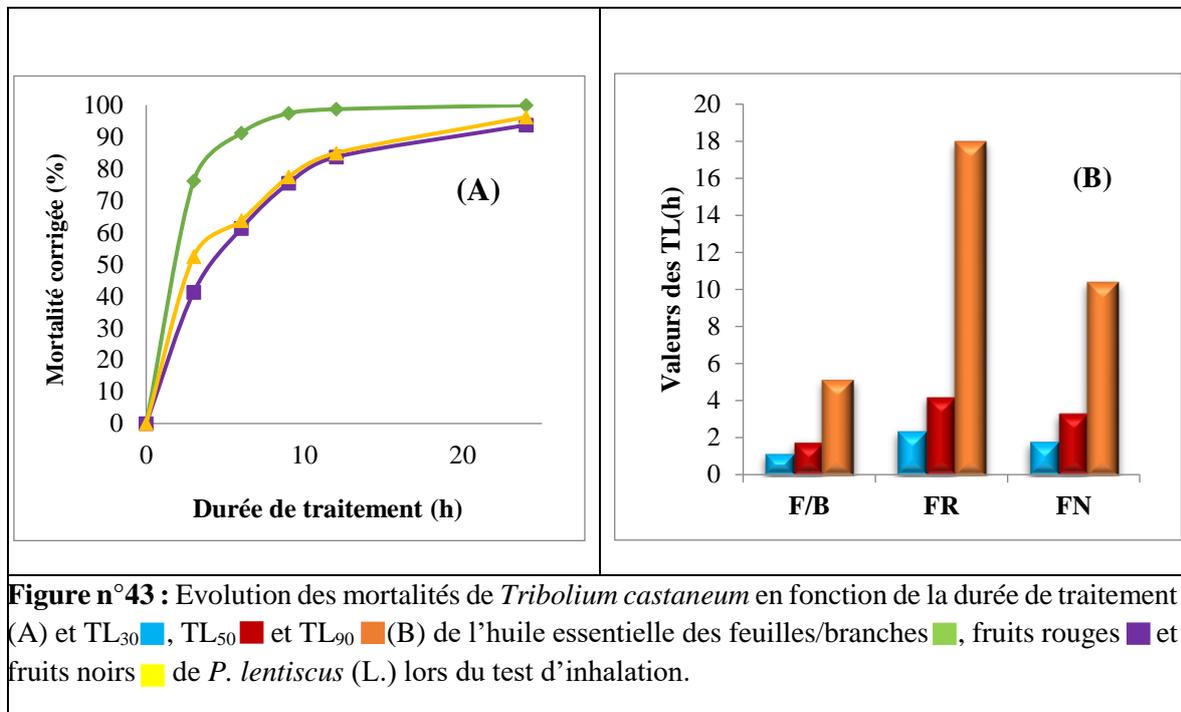
Seules les huiles non siccatives (qui ne subissent pas un séchage rapide à l'air) peuvent être utilisées comme insecticides pour protéger les denrées stockées. Dans ce cadre, les huiles d'arachide, de carthame, de moutarde, de ricin, de soja, de neem, d'olive et bien d'autres ont été testées et utilisées avec succès contre certains ravageurs. Leur application peut être préventive ou curative (**Degroot, 2004**).

## **II.12.2. Evaluation de l'activité insecticide par inhalation sur *Tribolium castaneum***

### **II.12.2.1. Evaluation de la toxicité par inhalation de l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.)**

Grâce à leurs récepteurs sensoriels olfactifs, les insectes des denrées stockées sont très sensibles aux spectres et à l'intensité des odeurs des huiles essentielles ; une inhalation à forte dose des huiles essentielles a une action répulsive voire mortelle dans la plupart des cas (**Regnault -Roger et al., 2008**). Lors du test d'inhalation, les huiles essentielles se volatilisent rapidement dans l'atmosphère confinée et atteignent les insectes pour exercer leur action. Le taux de mortalité de *Tribolium castaneum* augmente proportionnellement avec la durée d'exposition des huiles essentielles de *P. lentiscus* (L.). Le test par inhalation montre une forte toxicité de l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus* (L.) et une mortalité de **100±0.00%** est obtenue après 24 heures de traitement (**Fig. 43**).

En effet, au bout de 3h de traitement, le pourcentage de mortalité engendré par cette huile est de  $76.25 \pm 2.16$  %, il augmente avec la durée de traitement pour arriver à  $100 \pm 0.00$ % de mortalité après 24h d'exposition. L'huile essentielle des fruits rouges et fruits noirs agissent également au bout de 3 heures d'exposition donnant un taux de mortalité de  $41.25 \pm 2.16$  % et  $52.5 \pm 2.5$ % respectivement ; ces mortalités se sont échelonnées dans le temps pour atteindre un taux de  $93.75 \pm 2.16$  % et  $96.25 \pm 2.16$  après 24h heures d'exposition.



Les TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> enregistrés pour l'huile essentielle des feuilles/branches sont respectivement de **1.091h, 1.69 h et 5.04 h** et de **2.26h, 4.11 h et 17.89h** pour l'huile essentielle des fruits rouges. Concernant l'huile essentielle des fruits noirs, les valeurs de TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> obtenus sont respectivement de **1.72, 3.25 h et 10.33 h**, mettant en évidence un effet choc du au fort potentiel insecticide de l'huile essentielle de notre plante. La comparaison des trois huiles essentielles en fonction des taux de mortalité obtenus et de leurs TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub>, montre la forte toxicité de l'huile essentielle des feuilles/branches suivi par l'huile essentielle des fruits noirs pour vient en dernier l'huile fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) (**Fig.43**).

L'huile essentielle extraite des différentes parties du pistachier lentisque est dotée d'une activité insecticide par inhalation importante. L'efficacité insecticides des huiles essentielles dans les tests de toxicité par fumigation (inhalation) contre les ravageurs de denrées stockées serait vraisemblablement due à leur richesse en composés monoterpéniques (**Regnault-Roger et Hamraoui, 1995 ; Tapondjou et al., 2002**).

Un taux de mortalité de 0, 32.5 et 100% est atteint après 24 h d'exposition respectivement aux concentrations de 5, 30 et 45 $\mu$ L de l'huile des feuilles de *P. lentiscus* de la Tunisie par fumigation vis-à-vis du *T. castaneum* est rapporté par **Barchouch et al. (2010)**. Alors que dans notre étude, un taux de mortalité de 100% est atteint à la dose fixe 20 $\mu$ L après 24h. Cette différence peut être expliquée par la variation de leur composition chimique essentiellement les monoterpènes oxygénés qui sont de 19,38% dans l'huile essentielle des feuilles de la Tunisie et de (42.54%) dans l'huile essentielle des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) de Bouira.

Les différences enregistrées entre les trois huiles étudiées peuvent être expliquées par la variation de leurs compositions chimiques. En effet, cette activité peut être justifiée par la teneur élevée en monoterpènes oxygénés dans l'huile essentielle des feuilles/branches (42,54%) par rapport à l'huile des fruits rouges (1,71%) et celle des fruits noirs (4,46%), tels que le 4-Terpineol et  $\alpha$ -Terpineol. Les huiles essentielles les plus efficaces sont celles qui contiennent majoritairement des composés oxygénés monoterpéniques à fonction alcool, cétone ou ester (**Nébié, 2006**

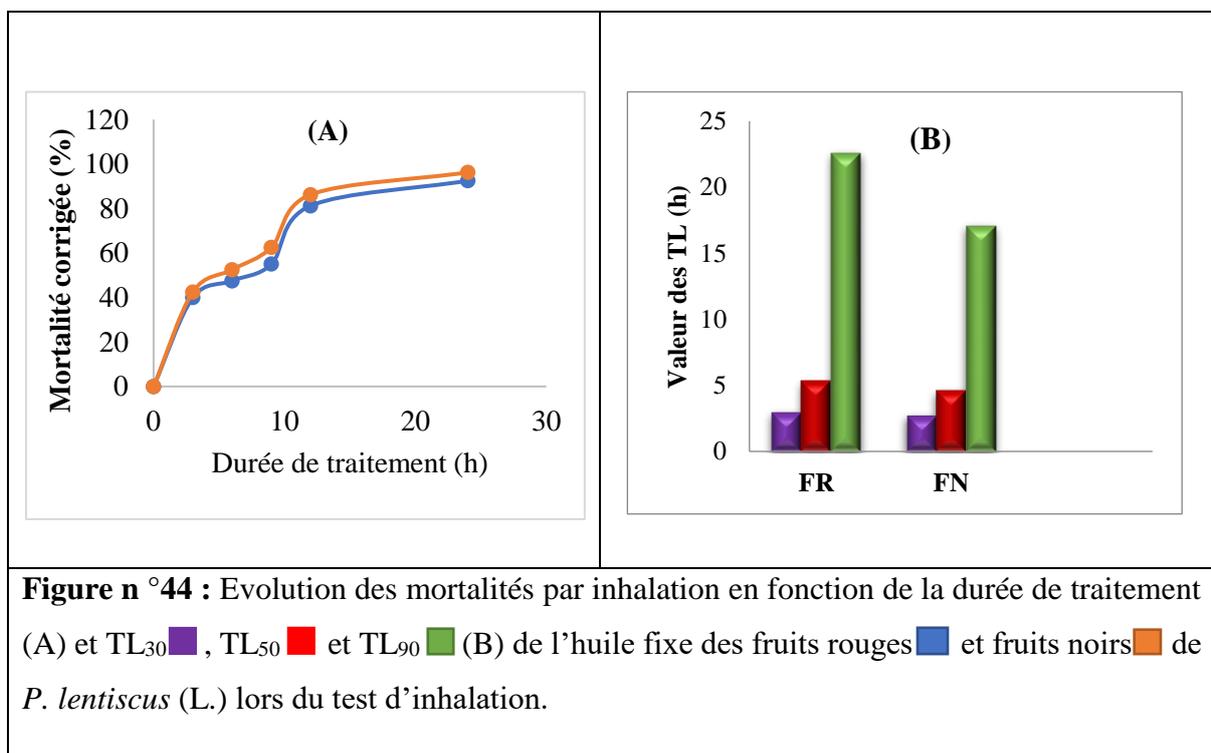
Les huiles essentielles testées sont constituées majoritairement de monoterpènes comme l' $\alpha$  pinène, le  $\beta$  pinène, le camphène, le limonène, le P. cymène et le terpinolène. Ces composés sont souvent caractérisés par leur activité biocide et répulsive contre de nombreux insectes ravageurs des denrées stockées (**Keita et al., 2000 ; Ketoh et al., 2002 ; Kellouche et al., 2004 ; Papachristos et Stamoupolos, 2002 et Kellouche et al., 2010**).

L'effet des huiles essentielles serait dû aux composés terpéniques qui agiraient comme des neurotoxines (**Enan, 2002**). L' $\alpha$  pinène a révélé un effet insecticide intéressant contre le *Tribolium brun* de la farine, (*Tribolium confusum*) (**Ojmelukwe et Adler, 1999**). Des effets similaires ont été également notés avec le  $\alpha$  terpinéol, le cinéole et le limonène, l'eugénol. Ils agissent sur le système nerveux, en affectant le transport ionique et la libération d'acétylcholine estérase chez les insectes (**Re et al., 2000 ; Ngamo et Hance, 2007**). La mort des adultes, des larves, l'inhibition de l'oviposition et du développement seraient dues à l'étouffement et à l'inhibition de différents processus du métabolisme des insectes (**Don-Perdo, 1989**). L'action rapide des huiles essentielles ou de leurs constituants contre les insectes nuisibles est révélatrice d'actions neurotoxiques (**Kostyukovsky et al., 2002, Priesley et al., 2003, Isman et al., 2007**) et serait provoqué par l'interférence des monoterpènes avec l'activité d'acétylcholinestérase chez les insectes (**Zapata et Snaghe, 2010**). Les huiles essentielles agiraient également en se fixant sur les récepteurs d'octopamine qui sont des cibles idéales pour les biopesticides. Elles peuvent également réduire l'appétit des insectes par altération des protéines disponibles (**Harborne, 1993**).

### I.12.2.2. Evaluation de la toxicité par inhalation de l'huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.)

Le taux de mortalité des adultes de *T. castaneum* augmente avec la durée de traitement. En effet, au bout de 3h d'exposition ce taux est de  $40 \pm 3.53\%$  pour atteindre  $92.5 \pm 2.5\%$  après 24h de traitement dans le cas de l'huile fixe des fruits rouges. Pour l'huile fixe extraite des fruits noirs, le taux de mortalité enregistré après 3h de traitement est de  $42.5 \pm 2.5\%$  ; il atteint  $96.25 \pm 2.16\%$  après 24 h de traitement. Le test par inhalation montre une toxicité importante des huiles fixes testées à l'égard de *T. castaneum* à la dose utilisée. En effet, les TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> calculés sont respectivement de **2.90**, **5.28 h** et de **22.56h**. Concernant l'huile fixe des fruits noirs les valeurs de TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> obtenus sont respectivement de **2.67**, **4.57 h** et **17.07 h**. Il existerait un effet choc du au fort potentiel insecticide de l'huile fixe du pistachier lentisque. La comparaison des deux huiles fixes en fonction des taux de mortalité obtenus et de leurs TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub>, montre la forte toxicité de l'huile fixe des fruits noirs suivi par l'huile fixe des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) (**Fig. 44**).

L'huile extraite des fruits noirs s'est avérée plus efficace que celle extraite des fruits rouges. Cette différence peut être attribuée à la différence de leur composition chimique en acide gras saturés (31.87% pour les fruits noirs et 25.17% pour les fruits rouges). Cette activité peut être attribuée aux effets toxiques des substances volatiles contenues dans les huiles fixes qui réduisent l'action des insectes ravageurs à travers des effets dissuasif (répulsif).



Le traitement des denrées alimentaires par les extrait et l'huile essentielle du *Pistachier lentisque* peut être très efficace pour lutter contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées. Les huiles essentielles du pistachier lentisque sont plus toxiques par inhalation que par contact sur *T. castaneum*.

# Conclusion générale et perspectives

## Conclusion générale et perspectives

L'Algérie, de par sa position géographique, possède une richesse botanique très diversifiée. De nombreuses plantes sont décrites comme étant une source inépuisable de molécules à valeurs ajoutées et elles ont longtemps été utilisées comme remèdes contre des maladies humaines. Elles peuvent aussi être la source de plusieurs produits pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et plus particulièrement pour la mise au point de nouveaux antioxydants, agent antimicrobien et insecticides.

L'utilisation des produits chimiques synthétiques dans différents secteurs peut causer des effets mutagènes, cancérogènes et toxiques sur la santé humaine et augmenter le taux de pollution dans la nature par l'application excessive des fongicides de synthèse. Ainsi que la résistance des bactéries aux antibiotiques ne cesse d'augmenter, elle est devenue une véritable préoccupation. De nos jours, la tendance de l'utilisation des produits naturels issus des plantes comme agents antioxydants et antimicrobiens est en pleine croissance face au souci des effets secondaires des composés synthétiques qui peuvent être nocifs à la santé humaine et à l'environnement. De ce fait, notre étude vise à la recherche de substances naturelles à activité antioxydante et antibactérienne afin de diminuer l'utilisation de ces produits synthétiques et résoudre de nombreux problèmes liés à leurs applications.

La difficulté à contrôler les populations des insectes ravageurs des grains stockés est renforcée par les limites et les conséquences liées à l'utilisation de pesticides de synthèse. Notre étude rentre dans le cadre de la recherche de solutions alternatives qui permettent de réduire les pertes occasionnées par ces insectes nuisibles, comme le *Tribolium castaneum*, par l'utilisation des huiles essentielles et des extraits pour limiter et réduire les inconvénients liés aux pesticides.

Le présent travail, tente de contribuer à la valorisation du pistachier lentisque, une plante utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques, en établissant une relation entre sa composition chimique (huile essentielle, extraits et huiles fixe des fruits) et différentes activités biologiques (activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide).

Le pistachier lentisque est riche en eau comme la plupart des végétaux. Un séchage préalable de la plante a été nécessaire afin d'assurer une meilleure conservation des poudres végétales à long terme diminuant ainsi les risques de contamination et d'altération des principes actifs et de mieux conserver les propriétés biologiques des poudres.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de nombreux métabolites secondaires (saponins, tanins catéchiques, tanins galliques, composés phénoliques dont les flavonoïdes, protéines, terpenoïdes, composés réducteurs et huiles essentielles) dans les quatre

organes étudiés du *pistachier lentisque* ; de plus des alcaloïdes ont été retrouvés au niveau des feuilles seulement. Les phlobotanins, stéroïdes, tritérpénoïdes et mucilage sont quant à eux présents dans les branches, les fruits rouges et les fruits noirs alors qu'ils sont absents dans les feuilles. L'amidon est présent dans les fruits rouges et noirs alors qu'il est absent dans les branches et les feuilles ; les caroténoïdes, les glycosides et les quinones sont absents dans les quatre organes du pistachier.

Une étude histologique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), nous a permis de localiser les structures sécrétrices. Des glandes sécrétrices (canaux) ont été observées dans les différentes parties de *P. lentiscus* (L.) contenant ces huiles essentielles.

L'industrie des extractions, s'intéresse depuis toujours au rendement et à la qualité des extraits ; ses efforts se sont focalisés dans la modification ou le développement de méthodes efficaces de production d'extraits à partir des plantes. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des effets du prétraitement par ultrasons sur le rendement d'extraction de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation.

Les objectifs de ce prétraitement aux ultrasons sont de pouvoir obtenir des rendements élevés d'huile essentielle tout en diminuant les durées d'extraction et la consommation d'énergie. Ce prétraitement a fait l'objet d'une optimisation en faisant varier trois paramètres : [le temps d'extraction (A), la puissance des ultrasons (B) et le ratio matériel végétal/eau (C)]. La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) a été utilisée pour évaluer les effets principaux des variables du processus de prétraitement sur le rendement en huiles essentielles de chaque organe et de déterminer ainsi les conditions optimales de l'extraction de l'huile essentielle.

Le prétraitement aux ultrasons ont permis d'augmenter le rendement. En effet un gain en rendement en huile essentielle des feuilles/branches de **0.227%** est obtenu pour une durée d'extraction de **90 min** en appliquant un prétraitement aux ultrasons d'une puissance de **60 W**, en utilisant un ratio matériel végétal/eau de **1/8 (g:mL)**. Un gain en rendement de **0.274 %** est obtenu pour l'huile des fruits rouges et fruits noirs pendant une durée d'extraction de **60 min** en appliquant un prétraitement avec ultrasons d'une puissance de **60W**, en utilisant un ratio matériel végétal/eau de **1/12 (g: mL)** et ceci par rapport à l'hydrodistillation standard.

Les huiles essentielles se présentent généralement sous forme de mélanges complexes dont il est nécessaire de connaître avec précision la composition avant toute étape d'étude de ses activités biologique et de valorisation.

L'étude des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice de peroxyde, indice d'iode, indice d'ester, indice de saponification) et organoleptiques

des huiles essentielles étudiées a fourni des valeurs conformes aux normes de commercialisation des huiles établies et proches des données de la littérature.

La composition chimique des huiles essentielles, a été établie à l'aide des méthodes chromatographiques et spectroscopiques CG et CG/SM : 63 composés représentant un taux de **99,21%**, **99,87%** et **99,96%** de la composition totale respectivement pour l'huile extraite des feuilles/branches, fruits rouges et fruits noirs ont été identifiés. La composition chimique de l'huile essentielle obtenue des trois organes est qualitativement identique et ne diffère que du point de vue quantitatif.

Dans l'huile essentielle des feuilles/branches les monoterpènes hydrocarbonés (**46,31%**) et les monoterpènes oxygénés (**42,54%**) sont les plus abondants ; Les sesquiterpènes hydrocarbonés (**8,41%**) et les sesquiterpènes oxygénés (**1,95%**) sont présents en faible proportion.

Pour l'huile essentielle extraite des fruits rouges, les monoterpènes hydrocarbonés représentent **88,28%** de la totalité de la composition, et les sesquiterpènes hydrocarbonés sont présents avec un taux de **9,20%**

L'huile essentielle extraite des fruits noirs est constituée principalement de monoterpènes **hydrocarbonés (84,94%)**. Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent **9,63%** de la totalité de la composition de l'huile essentielle ; signalons une faible abondance en sesquiterpènes oxygénés (**0,93%**).

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH et ABTS ainsi que le pouvoir réducteur des huiles essentielles des branches, feuilles, des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), augmente proportionnellement avec la concentration des huiles essentielles.

Celle des fruits rouges et fruits noirs présente une activité antioxydante supérieure à celle des feuilles/branches mais cette activité reste inférieure à celle du BHT.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle du *pistachier lentisque* est faible, mais cette huile peut être utilisée comme conservateur dans les produits alimentaires et comme agents préventifs contre diverses maladies, dont les maladies liées au stress oxydatif, les risques d'utilisation étant beaucoup plus faibles que ceux des antioxydants de synthèse.

Nous avons aussi observée que les huiles essentielles du pistachier lentisque étaient actives vis-à-vis les souches microbiennes et de levures testées avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre **11.20 ±0.21mm** et **23,32±0.82mm**.

La mise en évidence de la résistance des souches microbiennes testées à travers la détermination des CMI et CMB révèle un niveau de sensibilité très hétérogène d'une souche à

une autre vis-à-vis des HE. L'huile essentielle des feuilles/branches, fruits rouges et noirs de *Pistachier lentisque* s'est montrée active vis-à-vis les trois souches bactériennes avec des faibles valeurs de CMI. Cependant la souche de levure s'est avérée plus résistante à ces huiles essentielles ( $CMI \geq 2$ ).

L'analyse des CMB fait apparaître que l'huile essentielle des différents organes de *P. lentiscus* (L.) a un effet bactéricide sur les trois souches bactériennes. Cependant l'huile essentielles des feuilles/branches et fruits rouges n'est pas efficace contre *Candida albicans* alors que l'huile des fruits noirs présente un effet fongicide.

Les huiles essentielles testées manifestent une activité insecticide par contact relativement variable selon la partie de la plante utilisée ; l'efficacité augmente avec la dose d'huile essentielle utilisée et le temps d'exposition. Les doses létales obtenues pour cet essai montrent que l'huile essentielle des feuilles/branches est la plus toxique vis-à-vis des adultes de *T. castaneum* avec une  $DL_{50} = 5.01 \mu\text{l/ml}$  suivie par l'huile des fruits noirs ( $DL_{50} = 10.55 \mu\text{l/ml}$ ) et l'huile des fruits rouges qui est moins efficace ( $DL_{50} = 11.80 \mu\text{l/ml}$ ).

La toxicité par inhalation des huiles essentielles, est aussi variable en fonction du temps d'exposition. L'huile essentielle des feuilles/branches est la plus efficace car elle provoque plus de mortalité dans un temps plus court par rapport à l'huile essentielle des fruits rouges et fruits noirs.

L'huile essentielle extraite des différentes parties de *P. lentiscus* (L.) est plus toxique par inhalation que par contact.

Il est recommandé d'utiliser l'huile essentielle des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.) comme insecticide par inhalation contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées. Cette dernière pourrait constituer des solutions alternatives ou complémentaires à l'utilisation des pesticides organiques de synthèse pour la protection des grains stockés.

L'extraction des composés phénoliques totaux a été réalisée par extraction solide-liquide en utilisant différents solvants (méthanol, éthanol, eau, acétone et hexane) de manière à solubiliser un maximum de composés. Chaque extrait a été caractérisé par son aspect, sa couleur et son rendement par rapport à la poudre sèche.

Le rendement d'extraction le plus élevé est obtenu en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. La quantité des molécules extraites est importante dans les feuilles avec un taux de ( $52.39 \pm 0.06\%$ ) et a un degré moins dans les fruits noirs ( $50 \pm 0.01\%$ ) et les fruits rouges ( $46.7 \pm 0.02\%$ ), vient en dernier les branches avec un taux d'extraction de ( $20 \pm 0.03\%$ ).

Quel que soit le solvant utilisé pour l'extraction, les fruits noirs du pistachier lentisque sont les plus riches en polyphénols suivi des fruits rouges, des feuilles puis des branches. Le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols avec un taux de **231.98±0.01, 898.22±1.52, 1292.79±0.95 et 1351.00±0.69 mg EAG/g d'extrait** respectivement pour les branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs suivi de l'éthanol, de l'eau, de l'acétone puis de l'hexane.

Quel que soit la partie de la plante utilisée, l'acétone et le méthanol restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes suivis de l'éthanol, de l'eau puis de l'hexane. Pour l'extrait acétonique, les branches enregistrent un maximum de flavonoïdes (**47.701±0.02 mg Eq Q/g d'extrait**) suivi des fruits noirs (**31.40±0.4 mg Eq Q/g d'extrait**) et des fruits rouges (**23.38±0.03 mg Eq Q/g d'extrait**) tandis que les feuilles renferment la teneur la plus faible en flavonoïdes (**19.04±0.25 mg Eq Q/g d'extrait**).

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH et ABTS ainsi que le pouvoir réducteur extraits des branches, feuilles, des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.), augmente proportionnellement avec la concentration.

Les extraits des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) possèdent l'activité anti-radicalaire la plus élevée, suivie de celles des fruits rouges, feuilles et en dernier viennent les extraits des branches quelque que soit le solvant utilisé.

Tous les extraits présentent une activité antioxydante supérieure à celle du standard BHT sauf les extraits des branches qui possèdent une activité inférieure à celle du standard.

L'extrait méthanolique des différents organes présente l'activité antioxydant la plus importante par rapport aux extraits préparés par d'autres solvants.

Les extraits testés ont donné une activité antioxydante très importante cette dernière est dépendante du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes. L'étude de la relation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et l'activité antioxydante des différents extraits de la plante étudiée mesurée par les trois tests (DPPH, ABTS et pouvoir réducteur), montre qu'il y a de fortes corrélations entre les teneurs en phénols et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des extraits méthanolique et éthanolique, mais cette relation est plus ou moins faible avec les extraits aqueux et acétonique. Par contre, il n'y a pas une corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits hexanique.

Les extraits de fruits noirs et rouges et des feuilles peuvent être considérés comme une source d'antioxydants naturels contribuant à la prévention de diverses maladies en les utilisant comme additifs alimentaires. L'extrait aqueux qui ne présente aucun risque vu son innocuité

et son respect à l'environnement contrairement aux autres solvants organiques qui peuvent être toxiques et nocifs qui a une activité antioxydante supérieure à celle du BHT pour être utilisé comme antioxydant naturel.

Tous les extraits ont réagi positivement sur les souches microbiennes testées. Les extraits méthanolique et hexanique sont très efficaces contre les trois souches bactériennes testées alors que les extraits éthanolique, aqueux et acétonique sont moins efficaces. La souche de levure *Candida albicans* est dans l'ensemble très sensible aux différents extraits testés.

A travers les valeurs des CMB trouvées, les trois souches bactériennes testées sont avérées très résistantes à l'extraits éthanolique et aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et noirs de *P. lentiscus* (L.). Cependant ces souches sont moins résistantes à tous les extraits méthanolique, acétoniques et hexanique étudiés. La levure *Candida albicans* est très sensibles à tous les extraits des différents organes. Les extraits étudiés peuvent être considérées comme agents conservateurs bactéricides et fongicides promoteurs pour l'industrie agro-alimentaire capable d'empêcher la prolifération des bactéries et de réduire la croissance des levures ce qui permet d'assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place des conservateurs de synthèse.

Les différents extraits présentent un effet insecticide sur les adultes de *T. castaneum*, les extrait éthanolique ( $DL_{50} = 1.93 \text{ mg/mL}$ ) et méthanolique ( $DL_{50} = 2.59 \text{ mg/mL}$ ) des feuilles, l'extrait hexanique des branches ( $DL_{50} = 3.42 \text{ mg/mL}$ ) et l'extrait éthanolique des fruits noirs ( $DL_{50} = 4.88 \text{ mg/mL}$ ) sont les extraits les plus efficaces contre cet insecte ravageur.

Les différences de mortalité entre les différents extraits en utilisant les cinq solvants ne sont pas importantes. Cependant, l'extrait aqueux des différents organes a donné une bonne activité insecticide et comme l'eau qui ne pose pas problème lorsqu'il est en contact avec les produits traités, cet extrait peut être considéré comme le meilleur solvant pour l'extraction des substances actives pour lutter contre les insectes ravageurs contrairement aux autres solvants organiques qui peuvent poser des problèmes de toxicité et de pollution de l'environnement. La teneur en huile fixe des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de  $11.5 \pm 0.35 \%$  et  $34.9 \pm 0.05\%$  respectivement. Les fruits noirs peuvent être considéré comme des graines oléagineuses ayant des teneurs élevés en matières grasses comme l'huile d'olive, arachide et de l'huile de tournesol.

L'huile fixe obtenue à partir des fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) est de couleur vert foncé et jaune-vert claire respectivement, elle présente un aspect huileux, elle dégage toute les deux une très forte odeur aromatique caractéristique de la plante fraîche.

Les propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice de peroxyde, indice d'iode, indice d'ester, indice de saponification, l'extinction spécifique à 232 et à 270 nm) et organoleptiques de l'huile fixe du pistachier lentisque sont conformes aux normes internationales des huiles végétales et proches des données de la littérature.

L'huile fixe de *P. lentiscus* (L.) extraite des fruits rouges et fruits noirs se compose principalement de trois acides gras, l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide linoléique avec des pourcentage respectifs de **22.74%**, **48.18%**, **25.20%** pour l'huile extraite des fruits rouges et **29.59%**, **49.70%** et **17.38 %** pour l'huile extraite des fruits noirs. Sa composition chimique incite à proposer cette huile comme huile alimentaire de bonne qualité nutritive et qui peut avoir des effets physiologiques bénéfiques dans la prévention des maladies coronariennes et le cancer.

L'indice de peroxydabilité ou peroxydation de ces deux huiles a été calculé sur la base de la composition en acides gras. Il est respectivement de **26.70%** et **18.82%** pour les huiles extraites des fruits rouges et des fruits noirs. Les résultats de notre étude relèvent que l'huile de *P. lentiscus* (L.) est stable et ne présentent aucune rancidité oxydative au cours du stockage.

L'huile fixe du pistachier lentisque a un faible teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes.

L'huile extraite des fruits noirs étant plus active que l'huile fixe issue des fruits rouges mais cette activité reste moins efficace que celle du BHT.

Les résultats relatifs à l'activité insecticide de l'huile fixe de *P. lentiscus* (L.) révèlent que l'huile fixe extraite des fruits noirs est plus efficace que celle des fruits rouges avec une IC<sub>50</sub> de **4.12 µl/ml** et **3.0401µl/ml**. L'effet toxique de ces huiles est proportionnel à la dose employée et à la durée de traitement.

L'huile fixe extraite des fruits noirs s'est avérée plus efficace que celle extraite des fruits rouges. Cette activité peut être attribuée aux effets toxiques des substances volatiles contenues dans les huiles fixes qui réduisent l'action des insectes ravageurs à travers des effets dissuasif (répulsif).

Cette huile peut être utilisé pour le développement des bioinsecticides et susceptible de fournir de nouvelles sources de composés d'origine végétale à propriétés insecticides non polluantes et respectueuses de l'environnement.

Pour compléter ce travail, nous envisageons de :

■ Déterminer les molécules responsables des activités biologiques, la structure chimique des composés phénoliques et d'étudier la toxicité des molécules extraites avant l'utilisation des extraits obtenus dans différentes formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

■ Optimiser les conditions d'extraction des différents métabolites secondaires afin d'augmenter les rendements.

■ Il serait intéressant d'étendre l'étude de l'activité antimicrobienne à d'autres souches bactériennes et fongiques qui causent des maladies pour les êtres humains (Onychomycose, la pneumonie, salmonellose, scarlatine) ainsi que pour les cultures (le mildiou, oïdium, botrytis, tristeza, rouille et septoriose), de mettre en évidence l'activité antioxydante avec d'autres méthodes et d'évaluer l'activité insecticide contre d'autres insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

1. **Abbassi K., Mergaoui L., Kadiri Z., Stambouli T.A., Ghaout S., 2005.** "Activités biologiques des feuilles de *Peganum harmala* (*Zygophyllaceae*) en floraison sur la mortalité et l'activité génésique chez le criquet pèlerin". Zool. Baetica., 16, 31-46.
2. **Abaza L., Ben Temime S., M'Sallem M., Daoud D., Zarrouk M., Cherif A., 2003.** Etude comparative de la lipogenèse chez quelques variétés d'oliviers cultivées en Tunisie. Riv.Ital. Dell Sost. Gr. 80, 297-306.
3. **Abbott W.S., 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal Ecological Entomology.18, 265, 267.
4. **Aberkane F.,1992.** Contribution à l'étude biochimique et organoleptique des huiles d'olive vierges Algériennes. Mémoire d'ingénieur, INA El-Harrach, Alger. 45 p.
5. **Abderrazak M., Joël R., 2007.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
6. **Aissi O., Boussaid M., Messaoud C., 2016.** Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. Industrial Crops and Products. 91,56-65.
7. **Adjalien E., Noudogbessi J.P., Kossou D., Sohounhloue D.,2014.** Etat et perspectives de lutte contre *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1789), déprédateur des céréales au Bénin: synthèse bibliographique. Journal of Applied Biosciences. 79, 6955-6967.
8. **Adjalien E., Noudogbessi J.P., Kossou D., Sohounhloue D., 2014.** Etat et perspectives de lutte contre *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1789), déprédateur des céréales au Bénin: synthèse bibliographique. Journal of Applied Biosciences. 79, 6955-6967.
9. **AFNOR (Association française de normalisation), 1981-1982.**Recueil des normes françaises. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés. NF 03-720, NF VO3-903, NF T60-204, NT T 60-223, NF T 60-205 et NF T60-203. Paris, la Défense. 327 p.
- 10.**AFNOR NF ISO279 (T75-111), 1999.** Huiles essentielles. - Détermination de la densité relative à 20 C°. -Méthode de référence (homologuée le 5 septembre 1994). *Journal officiel* du 23 février 1999, Num. 147 : Avis relatifs à l'homologation et à l'annulation de normes. NOR : ECOI9910009V.
- 11.**Agrios G.N., 2005.** Plant Pathology. San Diego, Academic Press.
- 12.**Akroum S.,2011.** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. 125p.
- 13.**Ait-Idir N., Bouyoucef H., 2017.**Etude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L.sur la stabilité membranaire du globule rouge. Mémoire de Master, Université Abd Erhamen Mira de Bejaia,55p.
- 14.**Ait Yacine Z., 2001.** Etude des facteurs déterminant la meilleure période de récolte des Olives (var. Picholine marocaine) destinées à la trituration dans le Tadla. Thèse de Doctorat d'état ès-Sciences, Université Mohamed Ier, Faculté des Sciences, Oujda.
- 15.**Akroum, S., 2011.** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. 125p.
- 16.**Alabi T., Michaud J.P., Arnaud L., Haubruge E., 2008.** A comparative study of cannibalism and predation in seven species of flour beetles. Ecological Entomology, 33, p.p. 716-726.
- 17.**Al-Farsi m. A. et Lee C. Y., 2008.** Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds; Journal of Food Chemistry. 108, 977-985.
- 18.**Al-said M.S., Ageel A.M., Parmar N.S., Tarik M., 1986.** Evaluation of mastic a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. Journal of Ethnopharmacology.15, 271-278.
- 19.**Ali-Shtayeh M.S., Yagmour R.M.R., Faidi Y.R., Salem K.A.L., Al-Nuri M.A., 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. Journal of Ethnopharmacology .60, 265-271.
- 20.**Ali-Shtayeh M.S., Yaniv Z., Mahajna J., 2000.** Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 73, 221-232.
21. **Alves M.J., Ferreira I.C.F.R., Froufe H.J.C., Abreu R.M.V., Martins A. M. Pintado.,2013.** Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. Journal of applied Microbiology. 115,346-357.
- 22.**Alviano D.S; Alviano C.S., 2009.** Plant extracts: search for alternatives to treat microbial diseases. Curr Pharm Biotech. 10, 106-21.

- 23. Alzouma I., 1995.** Connaissance et contrôle des coléoptères *Bruchidae* ravageurs des légumineuses alimentaires au Sahel. Sahel Integrated Pest management (I.P.M) /Gestion Phytosanitaire Intégrée. Revue Institut CILSS de Sahel. 1, 2-16.
- 24. Aminzadeh R., Abarzani M., Sargolzaei J., 2010.** Preserving Melon by Osmotic Dehydration in a Ternary System. World Academy of Science, Engineering and Technology. 44, 1337- 1343.
- 25. Amarowicz R.M. N., Shahidi F., 2000.** Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. Journal of American Oil Chemists Society, 77. 957-961pp.
- 26. Andrews J.M., 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 48 (suppl 1), 5-16.
- 27. Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.
- 28. Antwerpen P.V., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système Myeloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène/ Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles. 3-5.
- 29. Antwerpen P.V., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système Myeloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène/ Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles. 3-5.
- 30. Aouinti F., Zidane H., Tahri M., Wathelet J.P., El Bachiri A., 2014.** Chemical composition, mineral contents and antioxidant activity of fruits of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. J. Mater. Environ. Sci., 5 (1) ,199-206.
- 31. Aouinti F., Imelouane B., Tahri M., Wathelet J.P., Amhamdi H., Elbachiri A., 2014.** New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. Res Chem Intermed. 40,2873-2886.
- 32. Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.
- 33. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Esin Çelik S., Bekta B., Berker K., Özyurt D., 2007.** Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules. 12, 1496-1547.
- 34. Aprotosoia A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U., 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). FARMACIA, 58 (1), 46-54.
- 35. Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K., 2014.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). J. Fundment. Appl. Sci.,6. (1),79-93.
- 36. Arabi M., 2017.** Influence des facteurs environnementaux sur la qualité de l'huile de *Pistacia lentiscus* L. en moyenne montagne méditerranéenne algérienne. Mémoire de Master, Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-harrach-Alger, 103 p.
- 37. Arabi T., boucherguine Y., 2013.** Etudes comparative de séchage en termes de cinétique et de qualité phénolique étude phénoménologique. Mmoire de fin de cycle.
- 38. Arnao M.B., Cano A., Acosta M., 2001.** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry .73(2).239-244.
- 39. Asada Y., Oshikawa T., Welli., 1998.** Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Planta medica. 64(8), 746-747.
- 40. Asfaw N., Licence P., Novitskii A.A., Poliakoff M., 2005.** Green chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of clean technology with conventional methodology. Green Chemistry. 7,352-356.
- 41. Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., 2009.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chemistry. 112. 303-309.
- 42. Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P.,2005.** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry. 89(1),27-36.
- 43. Audigé C., Zonszain F., 1995.** Biochimie métabolique. Wolters Kluwer France.
- 44. Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., Wagner DD., Liegey P., Cohen HJ., 1989.** Plasma seleniumdependent glutathione peroxidase: Cell of origin and secretion. Journal of Biological Chemistry. 264(27), 15850-15855.
- 45. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W., 2002.** The neutrophil NADPH Oxidase. Arch Biochem Biophys.397, 342-344.

- 46. Bammou M., Daoudi A., Slimani I., Najem M., Bouiamrine E. H., Ibijbijen J., Nassiri L., 2015.** Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. » : Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. Journal of Applied Biosciences. 86, 7966-7975.
- 47. Bampouli A., Kyriakopoulou K., Papaefstathiou G., Louli V., Aligiannis N., Magoulas K., Magoulas K., Krokida M., 2015.** Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS. J. Food Eng., 167, 25-31.
- 48. Barkatullah S., Ibrar M., Rauf A., Ur-Rahman I., 2012.** Physicochemical Characterization of Essential and Fixed Oils of *Skimmia laureola* and *Zanthoxylum armatum*. Middle-East Journal of Medicinal Plants Research. 1(3), 51-58.
- 49. Barry N., 2001.** Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi-même, pp. 125-128.
- 50. Baser C.H.K., Buchbauer G., 2010.** Hand book of essential oils: Science, technology and applications. Raton Florida: CRC Press, Boca Raton, New York
- 51. Baudoux D., 2003.** L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, édition Amyris, 145-146.
- 52. Baxendale R.W., Johnson W.T., 1990.** Efficacy of summer oil spray on thirteen commonly occurring insect's pests. Journal of Arboriculture. 16 (4), 89-94.
- 53. Beddou F., 2015.** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers Département de Biologie. Laboratoire des Produits Naturels « LAPRONA ». 164p.
- 54. Beghlal D., El Bairi K., Marmouzi I., Haddar L., Boukili M., 2016.** Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). Asian Pacific Journal of Tropical Disease .6, 305-310.
- 55. Belaiche T., Tantaoui-Elaraki A., Ibrahimy A., 1995.** Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. Sciences Des Aliments. 15(6), 571-578.
- 56. Belaiche P., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme. Éd. Maloine. Paris.
- 57. Belfadel F.Z., 2009.** Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* –Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques. Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Magister en chimie organique, Université Mentouri Constantine, 139p.
- 58. Belhadj S., 2000.** Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, 108 p.
- 59. Bellakhdar J., 2003.** Le Maghreb à travers ses plantes : plantes, productions végétales et traditions au Maghreb. Eds. Le fenec.
- 60. Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F., 2008.** Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. J Food Sci., 73, 331-338.
- 61. Belyagoubi L., 2006.** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110 p.
- 62. Belyagoubi L., Belyagoubi-Benhammou N., Atik-Bekkara F., Coustard J.M., 2016.** Effects of extraction solvents on phenolic content and antioxidant properties of *Pistacia atlantica* Desf fruits from Algeria. International Food Research Journal. 23(3), 948-953.
- 63. Benavente-Garcia O., Castillo J., 2008.** Update on use and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(15), 6185-6205.
- 64. Benazzedine S., 2010.** Activité insecticide de 5 huiles essentielles Vis à Vis de *S. oryzae* (Coleoptera Curculionidae) ET *Tribolium confusum* (Coleoptera-Tenebrionidae), Thèse Ingénieur Etat, Science agronomique. I.N.A. El-Harrach, 89 p.
- 65. Benbrinis S., 2012.** Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne extraits de *santolina chamaecyparissus*. Mémoire de magister en biochimie. Université de Ferhat Abbas-Sétif, 33p.
- 66. Ben Douissa F., 2004.** Etude Chimique et Biologique de *Pistacia lentiscus*. AbeBooks.fr, 330-331.
- 67. Ben Douissa F., Mariotte A.M., Hayder N., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M.G., Hammami M., Ghedira K., 2005.** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia Lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. Flavour and Fragrance Journal, 20, 410-414.
- 68. Benhamou N., Atik Bekkara F., Kadifkova Panovska T., 2008.** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African J of Pharmacy and Pharmacology. 2 (2), 22-28.

- 69. Benhammou N., Atik Bekkara F., 2009.** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie). H. Greche & A. Ennabili (éd.). Recherches sur les plantes aromatiques et médicinales. Actes du congrès international des 22-24 mars 2007, Mezraoua (Taounate) & Fès, Maroc, 281-285
- 70. Benini C., 2007.** Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109p.
- 71. Ben Mansour H., Latrach Tlemceni L., 2009.** Les colorants naturels sont-ils de bons additifs alimentaires. *Phytothérapie*. 7, 202-210.
- 72. Benrokia H., Aouar K., 2015.** Etude de l'activité Antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus*. Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, Algérie, 83 p.
- 73. Bensaci M., Hadj Mokhnache M., 2015.** Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 74p.
- 74. Bensalem G., 2014.** L'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) dans l'est algérien : caractéristiques physico-chimiques et composition en acides gras. Mémoire de magister, Université Constantine (1). 193 p.
- 75. Benseghier k., Khamed O., 2014.** Huiles Alimentaire de graines *Pinus pinea* Extraction et Caractérisation physique-chimique. Mémoire d'ingénieur. Université Kasdi Merbah–Ouargla. 127 p.
- 76. Benayad N., 2013.** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse de doctorat, Université Mohammed V–Agdal, Faculté des sciences Rabat-Maroc, 186 P.
- 77. Benyoussef E.H., Charchari S., Nacer-Bey N., Yahiaoui N., Chakou A., Bellatreche M., 2005.** The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 17, 642-644.
- 78. Béreau D., 2001.** "Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens. Thèse de Doctorat, 156p.
- 79. Beretz A., Cazenave I.P., Anton R., 1982.** Agents actions. 12, 382-387.
- 80. Bermúdez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G.V., 2011.** Power Ultrasound to Process Dairy Products. In: Feng H., Barbosa-Cánovas G.V., Weiss J. (Eds.) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer. 445-465.
- 81. Bernadet M., 2000.** "Phytoaromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. *Editions Dangles*.
- 82. Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées (Doctoral dissertation, La Rochelle).
- 83. Bhourri W., Derbel S., Skandrani I., Boubaker J., Bouhlef I., Sghaier M.B., Kilani S., Mariotte A.M., Dijoux-Franca M.G., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., 2010.,** Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*. 24, 509-515.
- 84. Bhourri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L., 2012.** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O--isorhamminoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamminoside. *S. Afr. J. Bot.* 80, 57-62.
- 85. Bidie P.H., N'guessan B., Yapo F., N'guessan J., Djaman A., 2011.** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8 (1), 5p.
- 86. Bitis L., Sen A., Ozsoy N., Birteksoz-Tan S., Kultur S., Melikoglu G., 2017.** Flavonoids and biological activities of various extracts from *Rosa sempervirens* leaves. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 31(2), 299-303.
- 87. Bloomer R.J., Larson D.E., Fisher-Wellman K.H., Galpin A.J., Schilling BK., 2009.** Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids in Health and Disease*. 8, 36-40.
- 88. Boelens M.H., Jimenez R., 1991.** Chemical composition of the essential oils from the gum and various parts of *Pistacia lentiscus*. *Flavour Fragr. J.*, 6, 271-275.
- 89. Boizot N., Charpentier J.P., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82.
- 90. Bondi D., Cianci P., Geraci C., Giuseppe R., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Fragr. J.*, 8, 331-337.

- 91.Both S., Chemat F., Strube J., 2014.**Extraction of Polyphenols from Black Tea - Conventional and Ultrasound Assisted Extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, 1030-1034.
- 92.Bouamara K., Haddad S., 2016.** Evaluation des activités biologiques de quelques huiles végétales. Mémoire de Master.Université de béjaia, Algérie,68p.
- 93.Bouchet P., Hugon J.C., Maynadier A.M., Mortier Y.,2005.** Les OGM en question : Dossier pédagogique. Montpellier: Educagri, 60p.
- 94.Boudjoref M., 2011.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbes-Sétif. 99 p.
- 95.Bougandoura N., Bendimerad N., 2013.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*. 9, 15p.
- 96.Bougherara Merzougui I., 2014.** Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. These de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 142 p.
- 97.Bougherara Merzougui I., 2015.** Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 142 p.
- 98.Boukeloua A., Belkhiri A., Djerrou Z., Bahri L., Boulebdia N., Hamdi Pachaa Y.,2012.** Acute Toxicity of Opuntia Ficus Indica and Pistacia Lentiscus Seed Oils in Mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 9(4), 607-611.
- 99.Boukeloua A., Yilmaz M.A., Temel H., 2016.** Chemical profiling and total thickness-excised wound-healing activity of *Pistacia lentiscus* L. fruits growing in Algeria. *Cogent Biology*. (2), 1-5.
- 100. Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhsine M., Satrani B., 2010.** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata (vahl) masters*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 79,4 -11.
- 101.Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., Hakim Y., 2010.** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue Nature et Technologie*, 03. 37-45.
- 102. Boulekbache Makhlof L., Slimani S., Madani K., 2013.** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria.*Industrial Crops and Products* .41, 85-89.
- 103. Bourgou S., serairibejji R., Medini F., Ksouri R., 2016.** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*.*Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*. 28(12),1649-1655.
- 104. Bouriche H., Saidi A., Ferradji A., Belambri S.A., Senator A., 2016.** Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Pistacia lentiscus* extracts, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 (7), 140-146.
- 105. Bouteldj F., 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.
- 106. Boutedjiret C., 1990.** L'huile essentielle d'Artémisia herba-Alba Asso d'Algérie. Approche des conditions optimales se sont extraction par entrainement à la vapeur d'eau. Contribution à son étude analytique. Thèse de magister en génie chimique, École national polytechnique d'Alger.120p.
- 107. Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., 1996.**Microbiologie alimentaire, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 672p.
- 108. Bousseboua H., 2006.** Eléments de microbiologie générale. 32, 160- 167.
- 109. Bousselessela H., Yahia M., Mahboubi A., Benbia S., MassinissaY., 2014.** Antioxydant and Antibacterial Activity of Alkaloids and Terpenes Extracts from *Euphorbia granulata*. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 7(3), 166-169.
- 110. Boutedjiret C., 1990.** L'huile essentielle d'Artémisia herba-Alba Asso d'Algérie. Approche des conditions optimales se sont extraction par entrainement à la vapeur d'eau. Contribution à son étude analytique. Thèse de magister en génie chimique, École national polytechnique d'Alger.
- 111.Brand-Willims W., Cuvelier M.E., Berset C.,1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und technologie*. 28, 25-30.
- 112. Bremness, 1998.** Les plantes aromatiques et médicinales. Bordas Editions.

- 113. Brickell C., 2004.** Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Edition française: Larousse-Bordas, 798-799.
- 114. Browne R.W., Bloom M.S., Schisterman E.F., Hovey K., Trevisan M., Wu C., Liu A., Wactawski-Wende J., 2008.** Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*. 13(2),160-83.
- 115. Bruneton J., 1999.** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, 1120 p.
- 116. Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie : phytochimie et plantes médicinales, 3e édition. Tec et Doc Lavoisier, Paris.
- 117. Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
- 118. Buranov A.U., Mazza G., 2008.** Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 28, 237-259.
- 119. Burt S.A., Reinders R.D., 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*.36 (3), 162-167.
- 120. Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- 121. Buang F., Jantan I., Amran A.Z., Arbain D., 2014.** Optimization of ginger (*Zingiber officinale*) oil yield from Malaysia in different hydrodistillation physical parameters via central composite design of response surface methodology (RSM). *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*. 7(24), 5098-5105.
- 122. Calliste C.A., Trouillas P., Allais D.P., Simon A., Duroux J.L., 2001.** Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.49, 3321- 3327.
- 123. Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson MP., Hasselmann M., Leverve X., 2007.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte 3ème édition, XVII, 1189p.
- 124. Cao G., Sofic E., Prior R.L., 1996.** Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*. 44(11), 3426-3431.
- 125. Cao G., Prior R.L., 1999.** In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology and medicine*. 27, 1173-1181.
- 126. Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V., 1995.** Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82 (332), 181-185.
- 127. Castola V., Bighelli A., Casanova J., 2000.** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28, 79-88.
- 128. Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M.D.L., Paez-Hernández M.E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C.A., 2009.** "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry*. 113(4), 859-871.
- 129. Castola V., Bighelli A., Casanova J., 2000.** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28, 79-88.
- 130. Castro L., Freeman B.A., 2001.** Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*. 170,161-165.
- 131. Cavar S., Maksimovic M., Vidic D., Paric A., 2008.** Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*. 37, 479-485.
- 132. Chaib A., 2015.** Guide des plantes phytothérapeutiques. Ed. Thala. El-Biar, Alger.
- 133. Chan S.W., Lee C.Y., Yap C.E., Wan Aida W.M., Ho C.W., 2009.** Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from lima purpur (Citrus hystrix) peels. *International Food Research Journal* 16, 203-213.
- 134. Charabot E., Dupont J., Pillet., 1899.** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants. Ch. Beranger, Paris.
- 135. Charef M., 2011.** Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*. These de doctorat. Université Kasdi Merbah Ouargla. 137 P.
- 136. Chaumont J.P., Mandin D., Sanda K., Koba., De Sousa C., 2001.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles de lamiacées togolaises vis- à-vis de germes représentatifs de la microflore cutanée. *Acta Bol. Gall*. 148 ,93-101.

137. Chemat F., 2011. Eco-extraction du végétal, Procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod éditions. France.
138. Chemat F., Huma Z.E., Khan M.K., 2011. Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction, Ultrasonics Sonochemistry. 18, 813-835.
139. Cheng S.S., Liu J.Y., Chang E.H., Chang S.T., 2008. Antifungal activity of cinnam aldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. Bioresource Technology. 99 (11), 5145-5149.
140. Cherbal A., Kebeiche M., Madani K., El-Adawi H., 2012. Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algerian Pistacia lentiscus. Asian journal of plant sciences. 11, 131-136.
141. Chernane H., Mansori M., Latique S., El Kaoua M., 2014. Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four Moroccan macro algae species. European Scientific Journal, ESJ, 10(15).
142. Cheurfa M., Allem R., 2015. Study of hypocholesterolemic activity of Algerian Pistacia lentiscus leaves extracts *in vivo*. Rev Bras Farmacogn. 25(2), 142-144.
143. Cheng S.S., Liu J.Y., Chang E.H., Chang S.T., 2008. Antifungal activity of cinnam aldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. Bioresource Technology. 99 (11), 5145-5149.
144. Chenni M., 2016. Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum* L." extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Benbella. Faculté des sciences exactes et appliquées département de chimie. 186 P.
145. Chin Y.F., Salimon J., Said M., 2010. Optimisation of urea complexation by Box-Behnken design. Sains Malaysiana. 39, 795-803.
146. Chiasson H., Vincent C., Bostanian N.J., 2004. Insecticidal properties of a Chenopodium-based botanical. Journal of Economic Entomology. 97 (4), 1378-1383.
147. Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G. A., Uzunov D., Tubaro A., Loggia R.D., 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. Journal of Ethnopharmacology. 116(1), 144-151.
148. Congiu R., Falconieri D., Bruno M., Alessandra P., Silvia P., 2002. Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO<sub>2</sub>. Flavour and Fragrance Journal. 17(4), 239-244.
149. Conseil Oléicole International (COI). 2011. Normes commerciales applicables aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. T.15/NC n°3, / Rév. 6.
150. Correia O.A., Catarino F.M., 1994. Seasonal changes in soil-to-leaf resistance in *Cistus sp.* And *Pistacia lentiscus*. *Acta Oecologica*, 1994, vol. 15, pp. 289-300.
151. Coste H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.
152. Cosentino S., Tuberoso C.I.G., 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett Appl Microbiol. 29(2), 130-5.
153. Coste H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.
154. Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents, Clinical Microbiology Reviews. 12(4), 564 -582.
155. Codex alimentarius., 1992. Joint FAO/WHO, Editeur: Food & Agriculture Org; Édition. 2, FAO, Rome (Italie), 337 p.
156. Cox S. D., Gustafson J.E., Mann C. U., Warmington J., 1998. Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26, 355.
157. Cristina P., Ilonka S., Bartek T., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH, Rev. Génie. Ind. 4, 25-39.
158. Da Cruz-Cabral L., Fernandez-Pinto V., Patriarca A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. Int.J. Food Microbiol. .166, 1-14.
159. Dacosta Y., 2003. Les phytonutriments bioactifs : Ed. Yves Dacosta, Paris. 317.
160. Daels-rakotoarison D., 1999. Extraits polyphénoliques d'aubépine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 (64).
161. Daglia M., 2012. "Polyphenols as antimicrobial agents." Current Opinion in Biotechnology 23(2), 174-181.

162. Dai J., Russell J.M., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 2.7313-7352.
163. Dajoz R., 1982. Précis d'écologie. Ed. Bordas, Paris, 503p.
164. Dale Poulter C., Marscle L., Hughers J.M., Argyle J.C. 1977. *J. Am. Soc.*, 99, 3823.
165. Dash K., Thangavel S., Krishnamurthy N.V, Rao S.V., Karunasagar D., Arunachalam J., 2005. Ultrasound-assisted analyte extraction for the determination of sulfate and elemental sulfur in zinc sulfide by different liquid chromatography techniques. *Analyst*. 130, 498-501.
166. Debbabi H., Nemri K., Riahi H., 2017. Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Foliar Extracts on fresh turkey breast cutlets. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*. 40(1), 2144-2152.
167. Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R., 1971. Travaux et documents de l'Orstom. Paris, N°8.
168. De Cliff S., Harerimana P.C., 2013. Extraction de l'huile essentielle... Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de *Cananga Odorata* de la Plaine de l'Imbo : Vers la Vulgarisation d'une Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi, *Revue de l'Université du Burundi Série Sciences Exactes*. 28, 1 -17.
169. De Groot I., 2004. Protection des céréales et des légumineuses stockées. *Agrodok 18*. Digigraphi, Wageningen, Pays Bas, 74p.
170. Degryse A.C., Delfa I., Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique*. 94, 8-11.
171. Delazar A., Reid R.G., Sarker S.D., 2004. GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 40(1), 24-27.
172. Delobel A., Tran M., 1993. Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Edition CTA et ORSTROM, 424 p.
173. De Maack F., Sablier M., 1994. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*. 3, 2614-2619.
174. Derwich E., Manar A., Benziane Z et Boukir A., 2010. GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*. 8, 1267-1276.
175. Desjobert J.M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F., 1997. Étude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*. 25 (6), 13-16.
176. Dewick P.M., 1995. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*. 12(2), 101-133.
177. Dhifi W., Jelali N., Chaabani E., Beji M., Fatnassi S., Omri S., Mnif W., 2013. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *African Journal of Agricultural Research*. 8(16), 1395-1400.
178. Dias M.G., Camões M. F. G., Oliveira L., 2009. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 113(3), 808-815.
179. Dicko M.H., Gruppen H., Traoré A.S., Alphons G.J., Willem J.H., Berkel V., 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1, 21-38.
180. Didry N., Dubreuil L., 1993. Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize* 1993; 48: 301-304.
181. Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P., 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22(7): 1046-1053.
182. Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97, 654-660.
183. Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P., 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol*. 48, 2599-2606.
184. Djerrou Z., 2014. Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk fed rabbits: a comparative study with simvastatin. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12 (8), 0561-0566.
185. Djilani A., Dicko A., 2012. The Therapeutic Benefits of Essential Oils, INTECH Open Access Publisher, Croatia.

- 186. Dob T., Dahmane D and Chelghoum C., 2006.** Chemical Composition of the essential Oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*.17, 642-644.
- 187. Don Pedro K.N., 1989.** Mode of action of fixed oils against eggs of *Callosobruchus maculatus* Fab. *Pestic. Sei.*, 26, 107-116.
- 188. Dorman H. J. D., Deans S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.*, 88(2), 308-316.
- 189. Douissa F.B., Hayder N., Chekir-Ghedira L., 2005.** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia, *Flavour and Fragrance Journal*. 20, 410- 414.
- 190. Dramane S., Witabouna K.M., Kagoyire K., 2010.** Evaluation des activités Antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte D'ivoire. *European Journal of Scientific Research*. 40 (2), 307-317.
- 191. Dugo G., Mondello L., Prevlti. Begum J., Yusuf M., Chowdhury J.U., 1998.** Studies on the essential oil-bearing plants of Bangladesh. Composition of the leaf oils of three cymbopogon species. *Essent. Oil Res*, 10.301-306.
- 192. Duh P.D., Du P.C., Yen G.C., 1999.** Action of methanolic extract of mung beans hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* 37, 1055-1061.
- 193. Dupont F., Guignard J.L., 2007.** Abrègé botanique systématique moléculaire. 14ème édition révisée, Masson.
- 194. Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lappraz J.C., 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Elements thérapeutiques synergiques. 2ème édition Masson (Paris), 87 pp.
- 195. Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J., 2000.** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*. 88,106S-116S.
- 196. Edris AE., 2007.** Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy Research*.21, 308-323.
- 197. Elbadry E. A., Ahmed M. Y. Y., 1975.** Effects of gamma radiation on the egg stage of southern cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. *Entomology*, 79. 323-328.
- 198. Earnsworth N.R., Berderka J.P., Moses M., 1974.** Screening of Medicinal plant flavonoides. *Med. Nia*. 32,17-27.
- 199. Eisenhut M., 2007.** The toxicity of essential oils, Article in presse, *International Journal of Infectious Diseases*. 11(4), 365-370.
- 200. El-Adawi H., Abdel-Fattah Y., El-Wahab A.A., 2011.** Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from 'milk thistle' seeds. *African Journal of Biotechnology* 10, 9804-9811.
- 201. El Darra N., 2013.** Les composés phénoliques des raisins : étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne (UTC).
- 202. El Gharras H., 2009.** "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* .44(12), 2512-2518.
- 203. El-Haci I.A., Atik Bekkara F., Mazari W., Gherib M., 2013.** Phenolics content and antioxidant activity of some organic extracts of endemic medicinal plant *Anabasis aretioides* Coss. & Moq from Algerian Sahara. *Pharma J.*, 5,108-112.
- 204. El Idrissi M., Barbouchi M., Choukrad M., Louzi L., 2016.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from leaves and twigs of *pistacia lentiscus* l. growing wild in morocco. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4), 516-524.
- 205. El Massry K.F., El-Ghorab A.H., Farouk A., 2002.** Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chemistry*, 79, 331-336.
- 206. Ela M.A., El-shaer N.S., Ghanem N.B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*. 51, 993 - 995.
- 207. Enan E., 2000.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.130, 325-337.
- 208. Essien E.P., Essien J.P., Ita B.N., Ebong G.A., 2008.** Physicochemical Properties and on assessing Fungitoxicity of the Essential Oil of *Citrus medica* L. against Groundnut Storage Fungi. *Turk. J. Bot.*32, 161-164.
- 209. Études Rwandaises., 1977.** Médecine traditionnelle et pharmacopée rwandaise, Butare, UNR, 19 pages.
- 210. FAO., 2001.** Codex alimentaire ; Graisse ; Huile et Dérives, édition FAO.8, 3-6.

211. **Falleh H., Ksouri R., Abdely C., 2006.** Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage *Cynara cardunculus*. Revue des régions arides, 341-344.
212. **Farhat A., 2010.** Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Thèse de doctorat, L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès. France, 136 p.
213. **Farrell J., 2010.** Diagnostic Methods for Rust-red Flour Beetle and Confused Flour Beetle *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. <http://www.padil.gov.au/pbt>.
214. **Faucon M., 2012.** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Sang de la terre. 880p.
215. **Favier A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
216. **Favier A., 2006.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 390-396.
217. **Fedeli E., 1977.** Lipides of olives, Prog, Chem, Fats other lipids. 15, 57- 74.
218. **Fernandez X., Chemat F., 2012.** La chimie des huiles essentielles. Editions Vuibert. 288p.
219. **Fernandez X., Chemat F., 2012.** « *Les huiles essentielles - Vertus et applications* », Ed. Vuibert, Paris, p.160.
220. **Ferradji A., 2011.** Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcoolique et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*, Mémoire Présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magister en biochimie Sétif.
221. **Finar I.L., 1994.** « *Organic chemistry* », Ed. Longman Scientific et Technical, Vol. II, 354.
222. **Fine D.H., Furgang D., Barnet M.L., 2001.** Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Clin Periodontol.* 28, 697-700.
223. **Finney D.J. 1971.** "Probit Analysis". Cambridge University Press, London.333p.
224. **Fleuriet A., Macheix J.J., 2003.** Acids in fruits and vegetables. Pp 1-41. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P ; Cheynier, V. 2006. Tec et Doc. Lavoisier-Paris.
225. **Ford R.A., Api A.M., Letizia C.S., 1992.** Monographs on fragrance raw materials. *Food Chem. Toxicol.*,30 (Suppl), 1S-138S.
226. **Franchomme P., 1981.** L'aromatologie à visée anti-infectueuse. *Phyтомdecine*. 1, 25-47.
227. **Franchomme P., Pénéol D., 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois éditeur. Limoges. 445 p. Francis. CRC press .73-77.
228. **Franchomme P., Jollois R., Pénéol D., 2001.** L'aromathérapie exactement. Edition Roger Jollois. Calcitrans à la réunion, Université Paul Sabatier de Toulouse, 19-28.
229. **From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V., Granum P.E., 2005.** Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3), 1178-1183
230. **Fournier G., Habib J., Reguigui A., Safta F., Guetari S., Chemli R., 1989.** Etude de divers échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus* de Tunisie. *Plantes médicinales et phytothérapies*, X) UII. (3), 180-185.
231. **Ford R.A., Api A.M., Letizia C.S., 1992.** Monographs on fragrance raw materials. *Food Chem. Toxicol.*30 (Suppl), 1S-138S.
232. **Gaboriaud R., 1996.** Physico-chimie des solutions ; Edition MASSON, Paris, 208-228.
233. **Gacem D., Cherif D., Mekhtoui K., 1995.** Evaluation de la qualité de l'huile d'olive à travers la wilaya de tizi-ouzou. Thèse de Magistère en biochimie appliquée et biotechnologie de Tizi-ouzou ». 150p.
234. **Gakuru S., Fouabi K., 1996.** Effet d'extraits de plantes sur le bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus*) et le charançon de riz (*Sitophilus oryzae* L). *Cahiers Agricultures*.5(1),34-42.
235. **Galván D'Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K., 2012.** Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*. 93,42-47.
236. **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., 2010.** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15, 8813-8826.
237. **Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., Komaitis M., 2008.** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*.107(3), 1120-1130.
238. **Garneau F.X., 2001.** Notes du cours *Produits naturels*. Département des SCIences fondamentales, UQAC, Chicoutimi, Québec. 17p.
239. **Garnéro J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques ; 345-1, 39p.

- 240. Gehin A., Guyon C., Nicod L., 2006.** Glyphosate induced antioxidant imbalance in HacaT: The protective effect of vitamin C and E. *Environ.Toxicol. Pharmacol.*,22,27-34.
- 241. Gerasopoulos D., and Stavorulakis G., 1997.** Quality characteristics of four mulberry (*Morus* sp.) cultivars in the area of China, Greece. *J. Sci. Food Agric.* 73,261-264.
- 242. Ghanemi F., Haggani L., 2017.** Effet de séchage au micro-onde et à l'étuve sur la composition phénolique et l'activité antioxydante de *Pistacia lentiscus* L *Pistacia lentiscus* ( L.). Mémoire de Master. Université de Béjaïa, 69p.
- 243. Ghafari S., Abdul Aziz H., Hasnain Isa M., Akbar Zinatizadeh A., 2009.** Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation–flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. *Journal of Hazardous Materials.*163, 650-656.
- 244. Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. 2001.** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, - Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- 245. Gholivand MB., Rahimi Nasrabadi M., Batooli H., Haghiri Ebrahimabadi A., 2010.** Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food Chem Toxicol.*48, 24-28.
- 246. Giner-Larza E.M., Manez S., Recio M.C., Giner-Pons R., Prieto J.M., Cerda-Nicolas M., 2001.** Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology.* 428,137-143.
- 247. Girault M., Bougeon J., 1971.** L'aromatogramme. Cahier de biothérapie n°29. Dr LAKHDAR L. 136.
- 248. Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazawa K., 2008.** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* 45; 318-325.
- 249. Goula A.M., 2013.** Ultrasound-Assisted Extraction of Pomegranate Seed Oil Kinetic Modeling, *Journal of Food Engineering.* 117, 492-498.
- 250. Goupy J., 1999.** Plans d'expériences pour surfaces de réponse
- 251. Gourine N., Bombarda I., Yousfi M et Gaydou E.M., 2010.** Chemotypes of *Pistacia atlantica* leaf essential oils from Algeria. *Natural product of communication.*5(1),115- 120.
- 252. Gourine N., Yousfi M., Bombard I., Nadjemi B., Stocker P. Gaydou E.M., 2010.** Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products.* 31,203-208.
- 253. Granato, D., Branco, G.F., de Araújo Calado, V.M., 2010.** Withdrawn: Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review. *Food Research International.*
- 254. Granger M.M R., Passet J., Arbousset G., 1973.** L'essence de *Rosmarinus officinalis*, influence du mode de traitement du matériel végétal. *Parf. Cosm. Sav. France* 3(3),133- 137.
- 255. Grant wyllie S, Joseph J Brophy, Vassilios Sarafis., Hobbs T., 1990.** Volatile Components of the Fruit of *Pistacia Lentiscus*. *Journal of Food Science,* 55 (5), 1325-1326.
- 256. Grati Kammoun N., Khlif M., Ayadi M., Rekik H., Rekik B. et Hamdi M. T., 1999.** Evolution des caractéristiques chimiques de l'huile au cours de la maturation des olives. *Revue Ezzaitouna.* 5, 30-46.
- 257. Grosjean N., 2007.** L'Aromathérapie, édition Eyrolles, 163 p.
- 258. Grysole J., 2004.** La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 139-141.
- 259. Guessan J.D., Bidié A.P., Lenta B.N., Weniger B., André P., Guédé-Guina F., 2007.** *In vitro* assays for bioactivity-guided isolation of antisalmonella and antioxidant compounds in *Thonningia sanguinea* flowers. *African Journal of Biotechnology.* 6,1685-1689.
- 260. Guinoiseau E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, Université de Corse-Pasquale Paoli. Faculté des Sciences et Techniques. 149p.
- 261. Gueye M.T., Seck D., Wathelet J.P., Lognay G., 2011.** Lutte contre les ravageurs des stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement.*15 (1), 183-194.
- 262. Gulcin I., Kufrevioglu O.I., Oktay M., Buyukokuroglu ME., 2004.** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.*90, 205-215.

- 263. Gunstone F.D., 2002.** Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses. Blackwell Publishing Ltd (CRC Press), Boca Raton, FL. (USA), 337p.
- 264. Gutteridge J.M., 1993.** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.*, 19, 141-158.
- 265. Gwinner J., Harnisch R., Muck O., 1996.** Manual on the prevention of post-harvest grain losses, Ed. GTZ, Germany, 19p.
- 266. Hadi M., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques, Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine : Pharmacochimie, Université Strasbourg I, pp155.
- 267. Hafez M., 2010.** Valorisation de deux plantes médicinales et aromatiques du Nord du Maroc : *Pistacia lentiscus* et *Coriaria myrtifolia*. Thèse de magister, Université ,183 p.
- 268. Haloui T., Abdellah F., Lebrazi S., Fadil M., Belrhiti A., 2015 a.** Effect of harvesting period and drying time on the essential oil yield of *Pistacia lentiscus* L. leaves *Der Pharma Chemica*. 7(10),320-324.
- 269. Haloui T., Fadil M. S. Jennan A., Farah A., Belrhiti A., 2015.** Application of Plackett-Burman design in the essential oil extraction by hydro-distillation process of *Pistacia lentiscus* L. leaves *J. Mater. Environ. Sci.*, 6 (4) ,942-948.
- 270. Haloui T., Farah A., Balouiri M., Chraibi M., Fadil M., Benbrahim K.F., Alaoui A.B., 2015.** Bacteriostatic and Bactericidal Profile of Leaves and Twigs Essential oils of Moroccan *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.5 (06), 050-053.
- 271. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Aruoma O., 1987.** The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical biochemistry*. 165(1), 215-219.
- 272. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- 273. Hammer K.A., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86,985-990.
- 274. Hamad H., Habib I.H., Gonaïd M. H., Mojahidul M., 2011.** Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour*.1 (1), 15-23.
- 275. Haslam E., Cai Y., 1994.** Plant polyphenols (vegetable tannins) : gallic acid metabolism. *Natural Product Reports*. 11, 41-66.
- 276. Havsteen B.H., 2002.** The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Therap*. 96,67-202.
- 277. Hayder N., Ammar R.B., Abdelwahed A., 2005.** Antibacterial and antimutagenic activity of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 87,567-573.
- 278. Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A. R., Faleiro M. L., Miguel M.G., 2009.** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*.116(3),714-721.
- 279. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.13, 572-584.
- 280. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.13, 572-584.
- 281. Hekal A.M., El-Kady E.A., 1987.** Effect of gamma radiation on the level of infestation with *Callosobruchus maculatus* (F.) in stored cowpea seeds. *Agricultural Science*., Egypt n.32, vol.3, p.1689-1698.
- 282. Hellal Z., 2011.** Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 178 p.
- 283. Hermal C., 1993.** Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles (Doctoral dissertation).
- 284. Hicks M., Gebicki, J.M., 1986.** Rate constants for reaction of hydroxyl Radicals with tris, tricine and hepes buffers, *FEBS Lett*, 92-94.
- 285. Hollman P.C.H., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., Van Trijp J.M.P., De Vries J.H.M., Katan M.B., 1996.** Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology and Medicine*. 21, 703-707.
- 286. Hafez M., 2010.** Valorisation de deux plantes médicinales et aromatiques du Nord du Maroc : *Pistacia lentiscus* et *Coriaria myrtifolia*. Thèse de magister, Université ,183 p.

- 287. Halmi S., 2015.** Etude botanique et phytochimique : Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus-indica*. Thèse de Doctorat en sciences. Université des frères Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, 183 p.
- 288. Haloui T., Fadil M., Jennan S., Farah A., Alaoui BA., 2015.** Application of Plackett Burman design in the essential oil extraction by hydro-distillation process of *Pistacia lentiscus* L. leaves. Journal of Materials and Environmental Science. 6 (4), 942-948.
- 289. Hamiani A., Kambouche N., Bellahouel S., 2016.** Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Pistacia lentiscus* L. Essential Oil from Oran (Algeria) advances in Bioscience and Biotechnology. 7, 539-544.
- 290. Hassaine S., 2017.** Activité biologique de quelques plantes sur les ravageurs des denrées stockées. Mémoire de Master, Université de Tlemcen, 66p.
- 291. Harborne J.B., 1993.** Introduction to ecological Biochemistry. 4th ed. Academic Press. 318 p. Vol 1: 291-299.
- 292. Havsteen B.H., 2002.** The biochemistry and medical significance of flavonoids. Pharmacol Therap. 96, 67-202.
- 293. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry. 13, 572-584.
- 294. Hekal A.M., El-Kady E.A., 1987.** Effect of gamma radiation on the level of infestation with *Callosobruchus maculatus* (F.) in stored cowpea seeds. Agricultural Science., Egypt n.32, vol.3, p.1689-1698.
- 295. Herzi N., 2013.** Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de docteur. Université de Toulouse. 150p.
- 296. Hicks M., Gebicki, J.M., 1986.** Rate constants for reaction of hydroxyl Radicals with tris, tricine and hepes buffers, FEBS Lett, 92-94.
- 297. Hindmarsh P.S., Tyler P. S., Webley D.J., 1978.** Conserving grain on the small farm in the tropics. Outlook Agriculture. 9(5), 214-219.
- 298. Hollman P.C.H., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., Van Trijp J.M.P., De Vries J.H.M., Katan M.B., 1996.** Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. Free Radical Biology and Medicine, 21, 703-707.
- 299. Houghton P.J., Ren Y., Howes M.J., 2006.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Natural Product Reports. 23, 181-199.
- 300. Howe R.W., 1978.** Introduction-The principles and problems of storage and pest control. Outlook Agriculture. 9 (5), 198-203.
- 301. Huie C.W., 2002.** A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and bioanalytical chemistry. 373(1-2), 23-30.
- 302. Ilboudo Z., 2009.** Activité biologique de quatre huiles essentielles contre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae), insecte ravageur des stocks de niébé au Burkina Faso. Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées. Université d'Ouagadougou, Burkina-Faso, 149p.
- 303. Iloki-Assanga S.B., Lewis-Lujan L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., Haines D.D., 2015.** Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. BMC Research Notes. 8 (396), 1-14.
- 304. Inouye S., 2001.** Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. J. Infect. Chemother. 7 (4), 251-4.
- 305. Iserin P., 2001.** Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins 2<sup>ème</sup> édition Ed Larousse/VUEF, pp13-16, p 250, pp291-296.
- 306. Isman M.B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot. 19, 603-608.
- 307. ISO 5509 : juin 2000.** Corps gras d'origines animale et végétale - Préparation des esters méthyliques d'acides gras.
- 308. Jacobson M., 1989.** Botanical pesticides: past, present and future. Arnason J.T., philogene B.J.B., & Morand p., eds, Insecticides of plant origin. ACS Symposium series. 384, 1-10, Washinton DC USA.
- 309. Jacques B., André R., 2004.** Biochimie métabolique Ed ellipses. Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- 310. Jayaprakasha G. K., Selvi T., Sakariah K. K., 2003.** "Anti-bacterial and Antioxidant Activities of of Grape (*Vitis vinifera*). 36, (2) 117-122.

311. **Jalayer-Naderi N., Niakan M., khodadadi E., Mohamadi-Motlagh M., 2016.** The antibacterial activity of methanolic *Anacyclus pyrethrum* and *Pistacia lentiscus L.* extract on *Escherichia coli*. Iran J Microbiol. 8(6), 372-376.
312. **Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakariah K.K., 2003.** “Antibacterial and Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Extracts,” Food Research International.36 (2), 117-122.
313. **Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C., 2004.** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52,3389-3393.
314. **Jeyaratnam N., Nour A.H., Akindoyo J.O., 2016.** Comparative study between hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation for extraction of *Cinnamomum Cassia* oil. Journal of Engineering and Applied Sciences. 11, 2647-2652.
315. **Jiri S., Marketa R., Olga K., Petr S., Vojtech J., Libuse T., Ladislav h., Miroslava B., Josef Z., Ivo P., Rene K., 2010.** Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. Molécules. (15), 8618-8640.
316. **Johnson D.R., GU L.C., 1988.** In Autoxidation and Antioxidants, John Wiley, New York, pp 433-448.
317. **Joubert T.L, Chambon P., Gattefosse M., 1958.** Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et mélanges. Bull. Tech. Gatte. 5,7-16.
318. **Kaissa M., Saibi S., Nacer-Bey N., Benyoussef E., 2012.** Modelling of Water Distillation Kinetic of *Pistacia lentiscus L.* Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing 15 (6), 980- 987.
319. **Kalembe D., Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Med Chem.,10(10), 813-829.
320. **Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., 2012.** Pharmacie galénique. In La connaissance des huiles essentielles : qualité et aromathérapie. Springer, Paris. 129-153.
321. **Kamal-Eldin A., Appelqvist LA., 1996.** The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids.31(7),671-701.
322. **Kammoun N.G., Khlif M., Ayadi M., Rekik H., Rekik B., Hamdi M., 1999.** Evolution des caractéristiques chimiques de l’huile au cours de la maturation des olives. Revue Ezzaitouna.5,30-46.
323. **Kamoun N., Khlif M., Rekik H., Hamdi M.T., 1999.** Evolution of oil characteristics during olive maturation (Chemlali variety). Acta horticulturae.474(474),701-704 .
324. **Kandji N.A., 2001.** Etude de la composition chimique et de la qualité d’huiles végétales artisanales consommées au Sénégal. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Cheikh Anta
325. Diop, Faculté de médecine, de pharmacie et d’onto-stomatologie, Dakar, 66 p.
326. **Kanoun K., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Atik Bekkara F., 2014.** Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf stem and berry of *Myrtus communis L.* Inter Food Rese J.21(5) n1957-1962.
327. **Kansole M.M.R., 2009.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahi et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d’Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
328. **Kar A., 2007.** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology (Revised-Expanded Second Edition). New Age International Limited Publishes New Delhi. 332-600.
329. **Karagözler A.A., Erdağ B., Emek Y.Ç., Uygün D.A., 2008.** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. Food Chemistry.111 (2), 400-407.
330. **Karleskind A., 1992.** Manuel Des Corps Gras. 1st Edn., Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, ISBN-10 : 2852066629, 787.
331. **Kayoks S., Shuishi M., Michis F., Sachiks E., 1994.** Naohide.K. Carcinogenesis. 15(11), 2669-2675.
332. **Kayombo M.A., Mutombo T.J.M., Somue M.A., Muka M.P., Wembonyama O.M., Tshibangu B.K.E., Kaboko K.J., 2014.** Effet de la poudre de basilic (*Ocimum basilicum*) dans la conservation des graines de niébé (*Vigna unguiculata*) en stock contre *Callosobruchus maculatus* à Mbuji-Mayi (RD. Congo). Congo Sciences.2 (2), 62-66.
333. **Keïta SM., 2000.** Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus*. Stored Prod. 36, 355-364.
334. **Keïta S.M. Vincent C., Schmit J.P., Ramasway S. Belanger A., 2000.** Effect of various essentials oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 36, 335-364.

- 335. Keita S.M., Vincent C., Schmit J.P., Arnason J.T., 2001.** Insecticidal effect of *Thudja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Science*. 81(1), 173 -177.
- 336. Kellner W., Kobert., 1954.** Möglichkeiten der verwendung atherischer ole zur raumdesinfektion. 1. Die wirkung gebräuchlicher atherischer ole auf testkeime. *Arzneimittel-forschung-drug research*.4(5), 319-325.
- 337. Kellouche A., AitAider F., Labdaoui K., Moula D., Ouendi K., Hamadi N., Ouramdane A., Frerot B., Mellouk M., 2010.** Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Integrative Biology*. 10(2), 86-93.
- 338. Ketoh G.K., Glitho A.I., Huignard J., 2002.** Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *J. Eco.* .95, 174-182.
- 339. Keynan N., Geller-Bernstein C., Waisel Y., Bejerano A., Shomar-Ilan A., Tamir R., 1987.** Positive skin tests to pollen extracts of four species of *Pistacia* in Israel. *Clin. Allergy*. 17, 243-249.
- 340. Keynan N., Tamir R., Waisel Y., Reshef A., Spitz E., Shomer-Ilan A., Geller-Bernstein C., 1997.** Allergenicity of the pollen of *Pistacia*, *Allergy* .52, 323-330.
- 341. Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F., Pirmoradei M.R., 2005.** Comparison of essential oil composition of *Ferula assa. foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 91, 639-644.
- 342. Khiair K., 2016.** Contribution à l'étude des propriétés thermo-physiques des biocarburants de seconde génération et leur influence sur le comportement des moteurs. Thèse de doctorat. Ecole des Mines de Nantes, France. 195p.
- 343. Kim S.I., Park C., Ohh M.H, Cho H.C., Ahn Y.J., 2003.** Contact and fumigant activities of aromatic plants extract and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*. 39, 11-19.
- 344. Kimbaris A., Siaty N., Daferera D., Tarantilis P., Pappas C., Polissiou M., 2006.** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem*. 13, 54-60.
- 345. Kiritsakis A., Dugan J.P., 1985.** Studies in photooxidation of olive oil. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 62, 892-896.
- 346. Knobloch K., Pauli A., Iber I.B., Weigand H., Weis N., 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1(3), 119-128.
- 347. Korkina L., De Luca C., Pastore S., 2012.** Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 77-86.
- 348. Kostyukovsky M., Rafaeli A., Gileadi C., Demchenko N., Shaaya E., 2002.** Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.*, 58, 1101-1106.
- 349. Koffi N., Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T., Laurent, A., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature*. 6 (1), 1- 15.
- 350. Kohen R., Nyska A., 2002.** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.*, 30, 620-650.
- 351. Koleva II., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., De Groot A., Evstatieva L.N., 2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13, 8-17.
- 352. Korkina L., De Luca C., Pastore S., 2012.** Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1259 (1), 77-86.
- 353. Kossou D.K., Aho N., 1993.** Stockage et conservation des grains alimentaires tropicaux : Principes et Pratiques. Les éditions du Flamboyant, 125p.
- 354. Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A., 2005.** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus var. chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7681-7685.
- 355. Kraljić L., Trumbore C.N., 1965.** P-Nitrosodimethylaniline as an OH radical scavenger in radiation chemistry. *Journal of the American Chemical Society*. 87(12), 2547-2550.
- 356. Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D., Drews G., 1994.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.*, 426, 552-554.

- 357. Krinat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum C., Metidji H., 2014.** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine.* 2,478-483.
- 358. Krippel-Drews P., Lang F., Haussinger D., Drews G., 1994.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflügers Arch.* 426,552-554.
- 359. Kumar R., 1991.** La lutte contre les insectes ravageurs. *Edition Karthala et CTA*, France et Pays-Bas, 293p.series, 384, pp, 1-10, Washinton DCUSA.
- 360. Kurita N., myaji M., kurane R., Takahara Y., Ichimara K., 1979.** Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. *Agric. Boil. Chem.* 43, 2365-2371.
- 361. Ladd P.G., Crosti R., Pignatti S., 2005.** Vegetative and seedling regeneration after fire in planted Sardinian pinewood compared with that in other areas of Mediterranean-type climate. *Journal of Biogeography.*32, 85-98.
- 362. Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* .18, 435-448.
- 363. Lakhdar L., Hmamouchi M., Rida S., Ennibi O., 2012.** Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: A qualitative systematic review. *Trop Dent J.*, 35,140-145.
- 364. Lamaison J.L.C., Carnet A., 1990.** Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) DC flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica.* 65, 315-320.
- 365. Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas R., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology.*91, 453-462.
- 366. Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., 1999.** Dossier Couplage, pp 21.
- 367. Le Cren F., 2004.** Les antioxydants, la révolution du XXI<sup>e</sup> siècle, 2eme édition.
- 368. Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M., 1995.** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Doin Editeur, Paris, p.506.
- 369. Leelaja B.C., Rajashekar Y., Reddy P.V., Begum K., Rajendran S., 2007.** Enhanced fumigant toxicity of allyl acetate to stored-product beetles in the presence of carbon dioxide. *Journal of stored products research.* 43(1), 45-48.
- 370. Le K., Chiu F., Ng K., 2007.** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry.*105, 353-363.
- 371. Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S., Geissman T.A., 1971.** Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. *Cancer Research.* 31, 1649-1654.
- 372. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than teas and Red Wine. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 7292-7295.
- 373. Leonard S., Ngamo T., 2004.** Conseil phytosanitaire interafricain, bulletin d'informations phytosanitaires. Ed. F.A.O Rome, 44-58.
- 374. Lepesme P., 1944.** Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés, Ed Lechevalier, Paris, 335. p.
- 375. Lev E., Amar Z., 2000.** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *Journal of Ethnopharmacology.* 72, 191-205.
- 376. Lewis W.H., et Elvin-Lewis M.P., 1995.** Medicinal plants as sources of new therapeutics. *Annal of Missouri Botanical Garden.* 82,16-24.
- 377. Li Y., Fabiano-Tixier A.S., Vian M. A., Chemat F., 2013.** Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 47, 1-11.
- 378. Li Y., Fabiano-Tixier A. S., Chemat F., 2014.** Essential oils: from conventional to green extraction. In *Essential oils as reagents in Green Chemistry* (pp. 9-20). Springer, Cham.
- 379. Lien E.J., Ren S., Bui H.H., Wang R., 1999.** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine,* 26 (3-4),285-294.
- 380. Lienard V., Seck D., Lognay G., Gaspar C., Severin M.,1993,** Biological activity of *Cassia occidentalis* L. against (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research,* 29: 311-318.
- 381. Lienard V., Seck D., 1994.** Revue des méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae), ravageur des graines de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) en Afrique Tropicale. *Insect Sci. Appli.* 15(3),301-311.

382. Liu X., Cui C., Zhao M., Wang J., Luo W., Yang B., Jiang Y., 2008. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 109,909-915.
383. Logan N.A., Rodriguez-Diaz M., 2006. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Ed. Hawkey, 139-158.
384. Longo L., Scardino A., Vasapollo G., 2007. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 360-364.
385. Louni S., 2009. Extraction et caractérisation physico-chimique de l'huile de graines de *Moringa oleifera*, Mémoire de Magister, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) El Harrach. 115 p.
386. Lowy F.D., 1998. Staphylococcus aureus infections. *N Eng Lj Med*. 339,520-32.
387. Lucchesi M.E., 2005. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).
388. Lugasi A., Hovari J., Sagi K., Biro L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta. biologica. Szegediensis*. 47 (1-4), 119-125.
389. Luque-García J.L., Luque de Castro M.D., 2003. Comparison of the static, dynamic and static-dynamic pressurized liquid extraction modes for the removal of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with on-line filtration-preconcentration. *Journal of Chromatography A*, 1010, 129-140.
390. Lutge U., Kluge M., Bauer G., 2002. Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 211p.
391. Maameri Z., Djerrou Z., Habibatni S., Riachi F., Djaalab H., Hamdi Pacha Y., 2016. Physicochemical Characteristics and Sub Chronic Oral Toxicity of *Pistacia lentiscus* L. Vegetable Oil in Rabbits. *On Line Journal of Biological Sciences*. 16 (1), 43-48.
392. Mac Laren D., 2007. Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
393. Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Bio ed*. 54-65.
394. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., 1997. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Ed.
395. Maffei S., Sacco L., 1987. Perfumer and flavorist. Vol. 13, N° 5, 61p. *In Besombes C.*, 2008.
396. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.
397. Mahmoudi S., Khali M., et Mahmoudi N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 09,35-40.
398. Majinda R. R., Abegaz B. M., Bezabih M., Ngadjui B. T., Wanjala C. C., Mdee L. K., Yeboah S.O., 2001. Recent results from natural product research at the University of Botswana. *Pure and Applied Chemistry*. 73 (7), 1197-1208.
399. Malgalhae L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J., 2008. Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica. Chemical. Acta*. (613), 1-19.
400. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004. "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5), 727-747.
401. Manach C., Mazur A., Scalbert A., 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*. 16, 1-8.
402. Marchese, J. A., 2006. Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, Vol.8, pp.86-90.
403. Marfak A., 2003. Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. 6-7-10.
404. Marmesat S., Morales A., Velasco J., Ruiz-Méndez M.V., Dobarganes M. C., 2009. Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites*. (60) 2, 155-160.
405. Martin S., Andriantsitohaina R., 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51,304-315.
406. Martini M.C., 2006. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. 2<sup>ème</sup> Ed TEC&DOC, p 132, 135, 143.
407. Martinez-Cayuela M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*. 77, 147-161.

408. **Marner F.J., Freyer A., Lex J., 1991.** Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia Lentiscus*. *Phytochemistry* .30, 3709-3712.
409. **Marrouf A., Tremblin G., 2009.** Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.
410. **Mason R.L., Gunst R.F., Hess J.L., 1989.** Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1st ed. John Wiley and Sons, New York.
411. **Mason T.J., Paniwnyk L., 2000.** Ultrasound as a preservation technology. Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. editions, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Angleterre.
412. **Mason L.J., 2003.** Grain Insect Fact Sheet E-224-W: Red and Confused Flour Beetles, *Tribolium castaneum* (Bhst.) and *Tribolium confusum* Duval. Purdue University, Department of Entomology, 159 p.
413. **Mason T.J., Chemat F., Vinatoru M., 2011.** The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Curr. Org. Chem.*, 15, 237-247.
414. **Mata P., Garido J.A., Ordovas J.M., Blazques E., Alvarez-salal A., Rubio M.J., Alous, O., Deoya, M., 1992.** Effects of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 56, 77-83.
415. **Mau J.L. Huang P.N., Huang S.J., 2004.** Antioxydant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry*. 86, 25-31.
416. **Maxia A., Sanna C., Frau M.A., Piras A., Karchuli M.S., Kasture V., 2011.** Anti-inflammatory activity of *Pistacia lentiscus* essential oil: involvement of IL-6 and TNF-alpha. *Natural product communications*. 6(10), 1543-1544
417. **Mecherara-Idjeri S., Hassani A., Castola V., Casanova J., 2008.** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part 1: Leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20: 32-38.
418. **Mediouni Ben Jemâa J., Tersim N., Taleb Toudert K., Larbi Khoudja M., 2012.** Insecticidal activities of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*. 48, 97-104.
419. **Medjekane M., 2017.** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et son inhibition par des molécules bioactives. Thèse de doctorat. Université de Chlef. 222 p.
420. **Meena M.R., Setid V., 1994.** Antimicrobial of essential oils from spices. *J Food.SCI. And tech.* Mysore. 31, 68-70.
421. **Meghazi N.,** Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké, Mémoire de magistère en sciences agronomiques, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Elharrach-Alger, 123p.
422. **Meir S., Kanner J., Akiri B., Hadas S.P., 1995.** Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1813-1821.
423. **Méndez A. I., Falqué E., 2007.** Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control* .18, 21-529.
424. **Meullemiestre A., Kamal I., Maache-Rezzoug Z., Chemat F., Rezzoug S.A., 2015.** Antioxidant activity and total phenolic content of oils extracted from *Pinus pinaster* sawdust waste. Screening of different innovative isolation techniques. *Waste and Biomass Valorization*. 5(2), 283-292.
425. **Mezni F., Maaroufi A., Msallem M., 2012.** Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. *J Med Plants Res*. 6, 5266-5271.
426. **Mezni F., Labidi A., Msallem M., Boussaid M., Khouja M.L., Khaldi A., 2014.** Influence of harvest date on fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oils. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (6), 1703-1708.
427. **Michihiro F., Shiori A., Masuo N., 1996.** Comparative hypocholesterolemic effects of six vegetable oils in cholesterol-fed rat. *Lipids* 31, 415-419.
428. **Miguel M.G., 2010.** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312.
429. **Milojević S.Ž., Stojanović T.D., Palić R., Lazić M.L., Veljković V.B., 2008.** "Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries", *Biochem Engin J.*, 39, 547-553.
430. **Minguez-Mosquera M.I, Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas B., SanchezGomez A.H., Garrido-Fernandez J., 1991.** Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 68(5), 332-336.

431. Missoun F., Bouabedelli F., Benhamimed E., Baghdad A., Djebli N., 2017. Phytochemical study and antibacterial activity of different extracts of *Pistacia lentiscus* L collected from dahra region west of Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 9(2), 669-684.
432. Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas B., Sánchez-Gómez A.H., Garrido-Fernández J., 1991. Color–Pig-ment Correlation in Virgin Olive Oil, *Ibid.* 69,332-336.
433. Moghaddam M., Taheri P., Ghasemi P., Mehdizadeh L., 2015. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from the seed of *Echinophora platyloba* DC. against phytopathogens fungi by two different screening methods. *LWT-Food Science and Technology*. 61(2), 1-7.
434. Mohammedi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
435. Mohammedi Z., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. 170p.
436. Mohamad Ibrahim M.N., Zakaria, N., Sipaut C.S., Sulaiman O., Hashim R., 2011. Chemical and thermal properties of lignins from oil palm biomass as a substitute for phenol in a phenol formaldehyde resin production. *Carbohydrate Polymers*. 86,112-119.
437. Mohammad S., Abu-Darwish., Abu-Dieyeh Z.H.M., 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, 11 (1).59-63.
438. Moharrampour S., Taghizadeh A., Meshkatsadat M. H., Talebi A. A., Fathipour Y., 2008. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 73, 639 p.
439. Ntezurubanza L., 2000. Essential oils of Rwanda. LASEVE, University of Québec, Chicoutimi, Canada, 247.
440. Montoro E., Lemus S.D., Echemendia M., Martin A., Portaels F., Palomino J.C., 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55, 500-505.
441. Morris J.A., Khettry A., Seitz E.W., 1997. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 595-603.
442. Mostafa M., Hossain H., Anwar Hossain M., Biswas P.K., M. Haque Z., 2012. Insecticidal activity of plant extracts against *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Advanced Scientific Research* .3(3), 80-84.
443. Moure A. J. M., Cruz D., Franco J., Manuel Dominguez J., Sineiro H., Dominguez M. J., Nunez., Carlos Parajo J., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2),145-171.
444. Moure A., Franco D., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M.J., Lema J.M., 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants, *J Agric Food Chem.*48, 3890-3897.
445. Muanda F.N., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz.
446. Muhammad Hazwan H., Hasfalina C.M., Hishamuddin J., Zurina Z.A., 2012. Optimization and Kinetics of Essential Oil Extraction from Citronella Grass by Ohmic Heated Hydro Distillation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 3 (3).1-6.
447. Myers R.H., Montgomery D.C., 1995. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley and Sons, New York.
448. Myers R.H., Montgomery R.C., 2002. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Design Experiment*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York Wiley.
449. Naczki M., Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*.1054 (1-2),95-111.
450. Nana P., Nchu F., Bikomo R.M. & Kutima H.L., 2014. Efficacy of vegetable oils against dry bean beetles *Acanthoscelides obtectus*. *African Crop Science Journal*.22 (3), 175-180.
451. Nassiri-Asl M., Hosseinzadeh H., 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res.*, 23(9),1197-204.
452. Ndomo A.F., Ngamo L.T. 2008. Insecticidal effects of the powdery formulation based on clay and essential oil from the leaves of *Clausena anisata* (W.) J. D. Hooks ex. Benth. (Rutaceae) against *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Pest Science*. 81, 227-234.

- 453. Nébié R.C.H., 2006.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques du Burkina Faso. Production, composition chimique, propriétés insecticides. Thèse de Doctorat d'état. Université de Ouagadougou, 175 p.
- 454. NF ISO 3657., 1990.** Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice de saponification.
- 455. NF ISO 3961., 1999.** Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice d'iode.
- 456. NF T60-220., 1995.** Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice de peroxyde.
- 457. Ngamo L.ST., 2004.** A la recherche d'une alternative aux Polluants Organiques Persistants utilisés pour la protection des végétaux. Bulletin d'informations phytosanitaires N, 843.
- 458. Ngamo L.S.T., Hance T., 2007.** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicultura*. 25 (4), 215-220.
- 459. N'guessan Alain H.O., Ouattara L., Dago C.E., Akhanovna J., Békro M., Békro Y. A., 2011.** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en côte d'ivoire. *Revue de génie industriel*. 6, 55-61.
- 460. Ntezurubanza L., 2000.** Essential oils of Rwanda. LASEVE, University of Québec, Chicoutimi, Canada, 247.
- 461. Nichols D. S., Sanderson K., 2003.** " The nomenclature, structure, and properties of food lipids" . In Sikorski, and Kolakowska (Eds.), *Chemical and functional properties of foods lipids* (pp. 29-59). Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- 462. Nijveldt J.R., Nood E., Hoorn D., Boelens P.G., Norren K., Leewen P., 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr.*, 74,418-425.
- 463. Nouros P.G., Georgiou C.A., Polissiou M G., 1999.** Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value. *Analytica Chimica Acta* 389:239-245.
- 464. Nyabaro Obed M., Patrick T., Rayori Mosoti D., 2016.** Optimization of essential oil extraction from *Eucalyptus grandis* leaves by cleverger distillation. *International Journal of Science and Research* 5, 493-496.
- 465. Nyegue M.A., Belinga Ndoye C.F., Amvam Zollo P.H., Agnani H., Menut C., Bessiere J. M., 2005.** Aromatic plants of tropical central Africa. Part L. Volatile components of *Clerodendrum buchholzii* Gürke from Cameroon. *Flavour and fragrance journal*. 20(3), 321-323.
- 466. Ohemeng Kwasi., Schwender C.F., Fu K.P., Barrett J.F., 1993.** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 3(2), 225-230.
- 467. Ojmelukwe P. C., Adler C., 1999.** Potential of zimmtaldehyde, 4-allylanisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of confused beetle (*Tribolium confusum* J.D.V.) (Col: Tenebrionidae). *J. Pest. Sc.*, 72, 81-86.
- 468. Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., 2009.** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem.*, 112, 874-879.
- 469. Olle M. and Bender I., 2010.** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*. 8 (3), 687-696.
- 470. Ollivier D. , 2003.** Recherche d'adultération dans les huiles végétales : application à la qualité des huiles vierges et notamment de l'huile d'olive. *OCL.*, 10(4), 315-320.
- 471. Oloyede OI., 2005.** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica Papaya*. *Pak. J. Nutr.*, 4(6), 379-381.
- 472. Oomah BD., Ladet S., Godfrey D.V., Liang J., Girard B., 2000.** Characteristics of raspberry (*Rubis idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*. 69, 187-193.
- 473. Onawunmi G.O., 1984.** Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citrate*. *Ethnopharmacol.* 12(3), 279-86.
- 474. Onawunmi G.O., 1989.** Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett Appl Microbiol.* 9, 105-108.
- 475. Onay C.E., Jeffree K., 2000.** Somatic embryogenesis in woody plants (Forestry Sciences). Kluwer Academic Publisher. 6, 361-390.
- 476. Oskoueian E., Abdullah N., Hendra R., Karimi E., 2011.** Composés bioactifs, antioxydant, la xanthine oxydase inhibiteur, inhibiteur de la tyrosinase et anti-inflammatoires de la sélection agro-industriel des sous-produits. 12, 8616 p.
- 477. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior L., 2001.** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 4619-4626.

478. **Ouedraogo I., Nebie C.R., Dakouo D., Guenda W., 2016.** Insecticide Activity of Essential Oils on the Development of Eggs and Adult of *Caryedon serratus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae), Pest of Stored Groundnut. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*.9 (2), 1-10.
479. **Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307-315.
480. **Pacheco A.I., De Castro F., Paula D., Lourencao A., Bolonhezi S., Barbieri M.K., 1995.** Efficacy of soybean and castor oils in the control of *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus phaseoli* (Gyllenhal) in Stored Chick-peas (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Stored Products Research*.31, 221-228.
481. **Palevitch D., Yaniv Z., 2000.** Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, 9-88.
482. **Palmer P.B., O'Connell D.G., 2009.** Research corner regression analysis for prediction: understanding the process cardiopulmonary. *Physical Therapy Journals* .20, 23-26.
483. **Papachristos D.P., Stamopoulos D.C., 2002.** Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*.38, 117-128.
484. **Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou N.M., Apazidou K.K., 1997.** Gas chromatography-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A*.729, 263-273.
485. **Paris R., Moyse H., 1969.** Précis de matière médicinale. Paris: Masson.
486. **Patel C., Ghanim H., Ravishankar S., 2007.** Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-Kappa B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab*. 92, 4476-9.
487. **Pauli A., Schilcher H., 2010.** 12 In Vitro Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. *ESSENTIAL*, 353.
488. **Perry J., Staley J., Lory S., 2002.** Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod : 159-160.
489. **Peng T. Y., Don, M. M., Tahrel, M. A., 2012.** Optimisation and kinetics studies on the extraction of essential oil from Zingiber Cassumunar. *Journal of Physical Science*. 23(1), 65-82.
490. **Perez-Mendoza J., Throne J-E., Maghirang E-B., Dowell F-E., Baker J-E., 2005.** Insect fragments in flour: relationship to lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) infestation level in wheat and rapid detection using near-infrared spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*. 98(6), 282-291.
491. **Péroumal A., 2014.** Caractérisation des fruits et de la pulpe de six accessions de *Mammea americana* : Aptitude à la transformation des fruits et caractérisation des composés phénoliques de la pulpe, Université des Antilles-et de la Guyane, 83 p.
492. **Perruci S., Mancianti F., Cioni P L., Famini G., Morelli I., Macchioni G., 1994.** In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *microsporum canis* and *microsporum gypseum*. *Planta Med*.60, 184-187.
493. **Perry J., Staley J., Lory S., 2002.** Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod, 159-160.
494. **Petti S., Scully C., 2009.** Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*.37(6), 413-423.
495. **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systems de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, 161p.
496. **Pizano M., 2014.** Elimination du bromure de méthyle dans les pays en développement. Programme des Nations Unies pour l'Environnement, PNUE, 68p.
497. **Platzer N., 2002.** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier: P1092, vol. TA1.
498. **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. (4),8p.
499. **Point 5 de la méthode IUPAC 2.301.** Indice de saponification de l'Union internationale de chimie pure et appliquée.
500. **Powers S.K., Smuder A.J., Kavazis A.N., Hudson M.B., 2010.** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 20,2-14.
501. **Prakash Maran J., Manikandan S., Vigna Nivetha C., Dinesh R., 2013.** Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arab. J. Chem*.

- 502. Prasad K.N., Hassan F.A., Yang B., Kong K.W., Ramanan R.N., Azlan A., Ismail A., 2011.** Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*. 128(4), 1121-1127.
- 503. Priestley C.M., Williamson E.M., Wafford K.A., Sattelle D.B., 2003.** Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA<sub>A</sub> receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br.J. Pharmacol.* 140, 1363-1372.
- 504. Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4303.
- 505. Psomiadou E., Tsimidou M., Boskou D., 2000.**  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *J. of Agr. and Food Chem.* 48 (5), 1770-1775.
- 506. Quezel P., Santa S., 1962.** "Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales", Tome I, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, 611 p.
- 507. Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris.
- 508. Quézel P., Santa S., 1962-1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS, Paris*, 2.
- 509. Quideau S., Deffieux D., Douat Casassus C., Pouysegu L., 2011.** Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 50(3), 586-621.
- 510. Rafi A., Tasneem U. S., Achfaq A., Muchtaq A., 1994.** Medicinal importance of essential oils. *Hamdard Medicus*. 3, 101-105.
- 511. Rahmani M., 1989.** Mise au point sur le rôle des pigments chlorophylliens dans la photo-oxydation de l'huile d'olive vierge. *Olivae*. 26, 30-32.
- 512. Rahmani M., 2007.** Méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides, Les technologies de laboratoire. 2, 18-21.
- 513. Ramade F., 2007.** Introduction à l'écotoxicologie : fondement et application. Ed. Tec et Doc,
- 514. Ramdan M.F., Mörsel J.T., 2003.** oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food Chemistry*. 82, 339-345.
- 515. Ratledge C., Wilkinson S., 1988.** An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, 3-22.
- 516. Razali N., Razab R., Mat J.S., Abdul A.A., 2008.** Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*. 11, 38-44.
- 517. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10), 1231- 1237.
- 518. Regnault-Roger C., Hamraoui A., 1995.** Fumigant toxic activity and reproduction inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research*.
- 519. Regnault-Roger C., Bernard J.R., Philogene C.V., 2002.** Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, pp. 20-37.
- 520. Rees D., 2004.** *Insects of Stored Products*. CSIRO Publishing. 15, 58-62.
- 521. Regnault-Roger A., Hamraoui A., 1995.** Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Stored Prod. Res.*, 31, 291-299.
- 522. Regnault-Roger C., Philogene J.R.B., Vincen T.C., 2002.** Bio- pesticides d'origine végétale. Paris : Lavoisier, Editions Tec ET Doc, 319p.
- 523. Righi A.F., Righi K., Khelil M.A., Pujade-Villar J., 2014.** Biological control against the cowpea weevil (*Callosobruchus chinensis* L., Coleoptera: Bruchidae) using essential oils of some medicinal plants. *Journal of Plant Protection Research*. 54(3), 211- 216.
- 524. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*. 20(7), 933-956.
- 525. Richard H., 1992.** Connaissance de la nature des arômes. In H. Richard & J. L. Multon (Eds). *Les arômes alimentaires*. Paris: Tec et Doc-Lavoisier: APRIA. 21-37
- 526. Robiche A., 2002.** Petit manuel d'identification des principaux ravageurs de denrées stockées en Afrique de l'OUEST. 45p.
- 527. Rodriguez-Amaya D.B., 2001.** A guide to carotenoid analysis in foods. *International Life Sciences Institute press*, 1-71.

- 528. Rodriguez-Perez C., Quirantes-Piné R., Amessis-Ouchemoukh N., Madani K., Segura Carretero A., Fernández-Gutierrez A., 2013.** A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 77, 167-174.
- 529. Romani P., Pinelli C., Galardi N., Mulinacci M., Tattini., 2002.** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia Lentiscus* L. *Phytochem Anal.* 13(2), 79-86.
- 530. Rosua J.L., Granados A.G., 1987.** Analyse des huiles essentielles d'espèces du genre *Rosmarinus* L. et leur intérêt en tant que caractère taxonomique. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XXI (2), 138-143.
- 531. Ruberto G., M.T. Baratta., 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69, 167-174.
- 532. Ruiz-Garbajosa P., Canton R., Pintado V., Coque T.M., Willems R., Baquero F., 2006.** Genetic and phenotypic differences among *Ente roccusfae calis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 12, 1193-1198.
- 533. Ryan D., Robards K., Lavee S., 1998.** Evolution de la quantité de l'huile d'olive. *Olivae*. 72, 23-41.
- 534. Saiah H., Allem R., El Kebir F.Z., 2016.** Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8(1), 367-374.
- 535. Safaei-Ghomi J., Ahd A.A., 2010.** Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag.* 6, 172-5.
- 536. Sakagami H., Kishino K., Kobayashi M., Hashimoto K., Iida S., Shimetani A., Satoh K., 2009.** Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In vivo*. 23(2), 215-223.
- 537. Salle J.L., Pelletier J., 1991.** Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, 19-45.
- 538. Salvador M.D., Aranda F., Gómez Alonso S., Fregapane G., 2001.** Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*. 74, 267-274.
- 539. Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006.** Composés phénoliques de la plante structure, biosynthèse, répartition et rôle. In « Les polyphénols en agroalimentaire ». Edition Tec et Doc. Lavoisier : 3.
- 540. Santos F.S.R., Novales M. G. M., 2012.** Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.* 23, 136-41.
- 541. Sartori-Thiel A., 2003.** Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. Thèse de doctorat en Sciences et agronomie. Chimie, Avignon. 177p.
- 542. Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A., Perry G., 2005.** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità.* 41(2), 143-164.
- 543. Scalzo J., Politi A., Pellegrini N., Mezzetti B., Battino M., 2005.** Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*. 21, 207-213.
- 544. Scheffer T., 1996.** Algebraic Foundation and Improved Methods of Induction of Ripple down Rules Repetition in Compton, P., Mizoguchi, R., Motoda, H. and Menzies, T. (eds) *Proceedings of Pacific Knowledge Acquisition Workshop PKAW'96*, October 23-25 1996, Coogee, Australia, 279-292.
- 545. Schwedt G., 1993.** Atlas de poche des méthodes d'analyse. Flammarion.
- 546. Seck D., Gaspar C., 1992.** Efficacité du stockage du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en fûts métalliques hermétiques comme méthode alternative de contrôle de *Callosobruchus maculatus* (Col. Bruchidae) en Afrique sahélo-saharienne. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv., Gent.* 57/3a, 751-758.
- 547. Seck D., Sidibe B., Haubruge E., Hemptine J.L., Gaspar H., 1991b.** La protection chimique des stocks de niébé et de maïs contre les insectes au Sénégal. *Meded Fac Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* 56/3b, 1225-1233.
- 548. Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z., Ahmadi S., 2007.** The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food chemistry*. 100(3), 1054-1058.
- 549. Shakarami J., Kamali K., Moharamipour S., 2005.** Effects of three plant essential oils on biological activity of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera Bruchidae). *Iranian. J. of agricultural Sci.* 35, 965-972.

- 550. Sheng Z.L., Wan P.F., Dong C.L., Li Y.H., 2013.** Optimization of total flavonoids content extracted from Flos Populi using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 2013;43: 778-786.
- 551. Siddhuraju P., Becker K., 2007.** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry.* 101,10 -19.
- 552. Silou T., Malanda M., Loubaki L., 2004.** Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 23. *Journal of food engineering.* 65(2), 219-223.
- 553. Singh N., Luthra T., Sangwan R.S., Thakur R.S., 1990.** Metabolism of monoterpenoids in aromatic plants. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants.* 11, 174-196.
- 554. Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S., Catalan Ceser A.N., 2006.** Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, Oleoresin, and their selected components. *J. Agric. Food Chem.*, 54,174-181.
- 555. Singh R., Singh S.K., Arora S., 2007.** Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Fod Chem. Toxicol.* 45, 1216-1223.
- 556. Singh U., Jialal I., 2006.** Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 13, 129-142.
- 557. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 299, 152-178.
- 558. Slivka A., Cohen G., 1985.** Hydroxyl Radical attack on dopamine, *J. Biol. Chem.*, 15466-15472.
- 559. Smallfield B. M., Klink J. W., Perry N. B., Dodds K.G., 2001.** Coriander spice oil: effects of fruit crushing and distillation time on yield and composition. *Journal of agricultural and food chemistry.* 49(1), 118-123.
- 560. Soejarto D., Farnsworth N.R., 1989.** Tropical rainforests: potential sources of new drugs. *Perspectives in Biology and Medicine.* 32, 244-258.
- 561. Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W.C., 2002.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.*, 33, 575-586.
- 562. Sokoloff A., 1974.** *The Biology of Tribolium with Special Emphasis on Genetic Aspects,*
- 563.** Vol. 2, Oxford University Press, Oxford, UK.
- 564. Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S., Mohammad S., Darwish A., Abu-Dieyeh Z.H.M., 2009.** Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, 11(1)59-63.
- 565. Stocker R., Keaney J.F., 2004.** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews.* 84(4), 1381-1478.
- 566. Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W. C., 2002.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.* 33, 575-586.
- 567. Sokoloff A., 1974.** *The Biology of Tribolium with Special Emphasis on Genetic Aspects,* 2, Oxford University Press, Oxford, UK.
- 568. Song J.H., Fujimoto K., Miyazawa T., 2000.** Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *Journal of nutrition.* 130, 3028-3033.
- 569. Soares D.G., Andrezza A.C., Salvador M., 2003.** Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1077-1080.
- 570. Spott D.A., Shelley W.B., 1970.** Exanthem due to contact allergen (benzoin) absorbed through skin. *JAMA.* 214, 1881-1882.
- 571. Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A., 2006.** Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* 8, 86-90.
- 572. Stalikas C.D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids *J Sep Sci.* 30,3268-3295.
- 573. Stanković M., Nićiforović N., Topuzović M., Solujić S., 2011.** Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol ;25:* 2222-2227.
- 574. Stocker R., Keaney J.F., 2004.** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews.* 84(4), 1381-1478.
- 575. Suthisut D., Fields, P.G., Chandrapatya. A., 2011.** Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *Journal of Stored Products Research.* 47, 222-230.

- 576. Suleiman M., Yusuf M.A., 2011.** The potential of some plant powders as biopesticides against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) on stored grains. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*.4(2), 204-207.
- 577. Svoboda K.P., Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, 1-17.
- 578. Syed Shayfur R., Mizanus M d., Mohammad R., Mizanur R.K., Shameen A.B., Balaram R., Fakruddin Shahed S.M., 2007.** Ethanolic extract of melgota (*Sitophilus oryzae*) for repellency, insecticidal activity against rice weevil (*Sitophilus oryzae*). *African Journal of Biotechnology* .6 (4), 379-383.
- 579. Saiah H., Allem R., El Kebir F., Z., 2016.** Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 367-374.
- 580. Salvador M.D., Aranda F., Gómez Alonso S., Fregapane G., 2001.** Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem.* 74, 267-274.
- 581. Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z., Ahmadi S., 2007.** The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *SaturejaRechingerzjamzad*. *Food chemistry*.100, 1054-1058.
- 582. Shakarami J., Kamali K., Moharamipour S., 2005.** Effects of three plant essential oils on biological activity of *Callosobruchus maculatus* F. (ColeopteraBruchidae). *Iranian. J. of agricultural Scien.* 35, 965-972.
- 583. Sheng Z.L., Wan P.F., Dong C.L., Li Y.H., 2013.** Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 2013;43: 778-786.
- 584. Siddhuraju P., Vijayakumari K., Janardhanan K., 1996.** Chemical composition and nutritional evaluation of an underexploited legume, *Acacia nilotica* (L.) Del. *Food Chemistry* 57,385 -391.
- 585. Sikkema J., Bont J. A. M., Poolman B., 1995.** Mechanisms of membranes toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*59,201-222.
- 586. Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S., Catalan Ceser A.N., 2006.** Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, Oleoresin, and their selected components. *J. Agric. Food Chem.* 54,174-181.
- 587. Singh R., Singh S.K., Arora S., 2007.** Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Fod Chem. Toxicol.* 45, 1216-1223.
- 588. Singh U., Jialal I., 2006.** Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*.13, 129-142.
- 589. Soares D.G., Andrezza A.C., Salvador M., 2003.** Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1077-1080.
- 590. Stalikas C.D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids *J Sep Sci.* 30,3268-3295.
- 591. Stanković M., Nićiforović N., Topuzović M., Solujić S., 2011.** Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnol ;25: 2222-2227*.
- 592. Suty L., 2014.** Les végétaux évolutifs. Développement et Reproduction. Édition quae. 64p.
- 593. Syed Shayfur R., Mizanus M d., Mohammad R., Mizanur R.K., Shameen A.B., Balaram R., Fakruddin Shahed S.M., 2007.** Ethanolic extract of melgota (*Sitophilus oryzae*) *African Journal of Biotechnology*. 6 (4), 379-383.
- 594. Trease G. E., Evans W. C., 1987.** A text book of pharmacognosy. ELSB Baillere Tindal.
- 595. Tahari B., Saadou Z., 2015.** Détermination des propriétés organoleptiques et physicochimiques des huiles essentielles : *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Mentha pulegium* (*Lamiacees*). Mémoire de master, Université Djilali Bounaama Khemis miliana.103p.
- 596. Taleb-Toudert K., 2015.** Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. UMMTO, 206 p.
- 597. Tan Q.L.P., Kieu X.N.T., Kim N.H.T., Hong X.N.T., 2012.** Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 24, 25-30.
- 598. Tanouti K., Serghini-Caid H., Chaieb E., Benali A., Harkous M., Elamrani A., 2011.,** Quality Improvement of Olive Oils Produced In Eastern Morocco. *Les technologies de laboratoire.* 22 (6), 1-12.

- 599. Tapondjou L.A., Adler C. L. A. C., Bouda H., Fontem D. A.,2002.** Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of Stored Products Research*.38(4), 395-402.
- 600. Tarascou I., Mazauric J. P., Meudec E., Souquet J. M., Cunningham D., Nojeim S., Cheynier V., Fulcrand H.,2011.** "Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS." *Food Chemistry* .128(3),802-810.
- 601. Taudou A., 1990.**Activité antifongique des labiatae. Données bibliographiques. Etudes in vitro de treize huiles essentielles (intérêt de la microémulsion). Doctorat d'état en sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- 602. Tawaha K., AlaliF. Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*. 104(4), 1372-1378.
- 603. Tchiégang C., Ngo O. M., Dandjouma A., Lapse C.,2004.** Qualité et stabilité de l'huile extraite par pressage des amandes de ricinodendron heudelotti (Bail.) pierre ex pax pendant La conservation à température ambiante. *J. Food Eng.* (62), 69-77.
- 604. Tekin K., Akalin M., Karagöz S., 2015.** Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Industrial Crops and Products*. 77, 954-960.
- 605. Teles Y.C., Souza M.S.R., Souza M. D.F.V.D., 2018.** Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities. *Molecules*.23(2), 480.
- 606. Tir R., 2005.**Extraction et analyse de l'huile de graine de Sesame. Th. Mag, USTHB, Bab ezzouar, Alger, 122 p.
- 607. Tiwari B.K., ValdramidisV.P., Donnel C.P.O., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen J.,2009.** Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.57,5987-6000.
- 608. Tomaino A., Martorana M., Arcoraci T., Monteleone D., Giovinazzo C., Saija A., 2010.** Antioxydant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*. 92, 1115- 1122.
- 609. Tomas-Babera F.A, Espin J.C.,2001.** Phenolic compounds and related enzyme as determinants of quality in fruits and vegetables. *J of the scien of food and agre.* (81), 853-876.
- 610. Torres de Pinedo A., Penalver P., Morales J.C., 2007.** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*.103, 55-61.
- 611. Touaibia M.,2015.** Composition chimique et activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur milieu de laboratoire et sur les fruits du fraisier. *Nature & Technologie*,12.66-72.
- 612. Toumnou A.L., Seck D., Namkossere S., Cisse N., Kandiora N., Sembene M., 2012.** Utilisation des plantes indigènes à effet insecticide pour la protection des denrées stockées contre les insectes ravageurs à Boukoko (Centrafrique). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 6(3), 1040-1050.
- 613. Trabelsi H., Cherif O. A., Sakouhi F., Villeneuve P., Renaud J., Barouh N., Boukhchina S and Mayer P.,2011.** Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*. 131(2), 434-440.
- 614. Trabelsi H., Renaud J., Herchi W., Boukhchina S., Mayer P.,2015.** Triacylglycerols and aliphatic alcohols from fruits of three Tunisian *Pistacia lentiscus* populations. *J. Sci. Food Agric*. 95, 2028-2032.
- 615. Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M., Rammal S., 2002.** Insecticidal properties of essential oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae), *Pest Manag. Sci*.58, 491-495.
- 616. Trease G. E., Evans W.C., 1987.** A text book of pharmacognosy. ELSB Baillere Tindal.
- 617. Tzakou O., Bazos L., Yannitsaros A., 2007.** Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. From Greece. *Flavour and Fragrance Journal*.22(5), 358-362.
- 618. Udenigwe C.C., Ramprasath V.R., Aluko R.E., Jones P.J.H., 2008.**Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*. 66(8), 445-454.
- 619. Valnet J., 1984.** Aromathérapie, Traitement des Maladies par des Plantes, Maloine S.A. Editeur Pris.
- 620. Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P., Cilapraz J., 1978.** L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med Phytother*. 12, 43-52.
- 621. Valnet J.,1984.** Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris ,544 p.
- 622. Vaya J., Mahmood S., 2006.** Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3, 4), 169-175.

- 623. Villar A., Sanz M.J., Payo M., 1987.** Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *Int J Crude Drug Res.* 25,1-3.
- 624. Viijoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J., Edwards T.J.,2006.** Microdistillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus(lamiaceae)*. *South African Journal of Botany.* 72, 99-104.
- 625. Villar A., Sanz M J., Payo M., 1987.** Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *Int J Crude Drug Res.*25, 1-3.
- 626. Von GadowA., Joubert E., Hansmann C.F., 1997.** Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem.* 45, 632-8.
- 627. Walsh S. E., Maillard J.Y., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 94(2),240-247.
- 628. Wang G., Waller C. L., 2006.**Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology.* 17,300- 312.
- 629. Wichtl M., Anton R. ,1999.** Plantes thérapeutiques. Tech & Doc.
- 630. Wolf J.P.,1968.** Manuel des corps gras. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris.
- 631. Xia E.Q., Deng G.F., GuoY. J., Li H.B.,2011.** "Biological activities of polyphenols from grapes." *International Journal of Molecular Sciences.* 11(2), 622 -646.
- 632. Yayi E., Gbenou J. D., Ahoussi, L. A., Moudachirou M., Chalchat J.C.,2004.** *Ocimum. gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie.* 7(10-11), 1013-1018.
- 633. Zaika L.L., Spices H.,1988.** Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety.*9(2), 97-118.
- 634. Walker, J., Findlay, D., Amar, S. S., Small, P. G., Wastie, M. L., Pegg, C. A. S.,1978.** A prospective study of thyroid ultrasound scan in the clinically solitary thyroid nodule. *The British journal of radiology,* 58(691), 617-619.
- 635. Walsh S.E., Maillard J.Y., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 94(2),240-247.
- 636. Wang G., Waller C. L., 2006.**Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology.* 17,300- 312.
- 637. Wang S., Stretch A., 2001.** Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49,969-974.
- 638. Wang W., Wu N., Zu Y.G., Fu Y.J., 2008.** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry.* 108(3),1019-1022 .
- 639. Weinzeirl R.,1998.** Botanicals insecticides, soaps and oils. In: Rechcigl JE: Rechcigl NA Biological, biotechnological control of insect pest in. *Lewis Publ.,* Boca Raton, Florida, 101-121.
- 640. Wichtl M., Anton R. ,1999.** Plantes thérapeutiques. Tech & Doc.
- 641. Wojdylo A., Oszmian ́ski J., Czemerys R., 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry.* 105, 940-949.
- 642. Wojtunik K. A, Ciesla L.M, Waksmundzka-Hajnos M., 2014.**Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *J Agric Food Chem.* 62,9088-9094.
- 643. Wolf J.P.,1968.** Manuel des corps gras. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris.
- 644. Yadav Baljeet S, Yadav Ritika B., Jatain M .,2014.**Optimization of osmotic dehydration conditions of peach slices in sucrose solution using response surface methodology. *Food Sci Technol.* 49(5),547-555.
- 645. Yang J.H., Lin H.C., Macl J.L., 2002.**Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*77,229-235.
- 646. Yanishlieva N.V., Inhibiting oxidation. In: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., editors.,2001.** Antioxidants in Food: Practical Applications. Woodhead Publishing Ltd.; Cambridge, UK, 22-69.
- 647. Yayi E., Gbenou J. D., Ahoussi, L. A., Moudachirou M., Chalchat J.C.,2004.** *Ocimum. gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie.* 7(10-11), 1013-1018.
- 648. Yingngam B., Brantner A.H., 2015.** Factorial design of essential oil extraction from *Fragrea fragrans* Roxb. flowers and evaluation of its biological activities for perfumery and cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science.* 37,272-281.
- 649. Yousef R.T., TawilG.G., 1998.**Antimicrobial activity of volatile oils. *Die Pharm.* 35, 698- 701.

650. Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M., 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J Agric Food Chem* .50,1619-1624.
651. Zabeirou L., Hachimou S.,2005. Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicta* L.) et de la Poivree (*Mentha Piperita* L) dans la région d'Ouargla. Mémoire de DES Biochimie -Université de Kasdi Merbbah-Ouargla. 160 p.
652. Zadernowski R., Naczki M and Nesterowicz J., 2005. Phenolic acid profiles in small berries. *J. Agri. Food Chem.*, 53,2118-2124.
653. Zaika L.L., Herbs S.,1988. Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety*; 9(2): 97-118.
654. Zhang J., Fu., XuY., Liu C., 2010. Optimization of parameters on photocatalytic degradation of chloramphenicol using TiO<sub>2</sub> as photocatalyst by response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* .22(8), 1281-1289.
655. Zhang X., Gao H., Zhang L., Liu D., Ye X., 2012. Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products* .39, 162-169.
656. Zapata N., Smagghe G., 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Ind. Crop Prod.* 32, 405-410.
657. Zheng C.J, Yooa J.S, Leeb T.G, Choc H.Y, Kimd Y.H, Kima W.G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 579,5157-5162.
658. Zheng W., Wang S.,2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .51,2122-2127.
659. Zhong K., Wang Q., 2010. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*. 80, 19-25.
660. Zitouni A., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Toul F., Atik-Bekkara F., 2016. Assessment of phytochemical composition and antioxidant properties of extracts from the leaf, stem, fruit and root of *Pistacia lentiscus* L. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8 ,627-633.
661. Zitouni A., 2017. Profil polyphénolique et activité antioxydante de deux plantes médicinales *Pistacia lentiscus*. L et *Gymnocarpos decander*. Forsk. Thèse de doctorat, université de Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 176p.
662. Zrira S., Benjilali B.,1991., Effect of drying leaf oil of Moroccan *E. camaldulensis*; *J. Ess. Oil. Res.* 3, 443-444.
663. Vaya, J., MahmoodS., 2006. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3, 4), 169-175.

# **Annexe**

## Les Tableaux

**Tableau n °1:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des feuilles/branches de *P. lentiscus* (L.).

Source	Rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles/branches de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons						
	Coefficient d'estimation	Somme des carrés	DDL	Moyenne des carrés	F Value	p-value Prob > F	
<b>Modèle</b>	0,27	0,074	9	0.008255	116,73	< 0.0001	Significatif
<b>A-Temps d'extraction (min)</b>	0,065	0,034	1	0,034	477,98	< 0.0001	
<b>B-Puissance ultrasonique (w)</b>	0,051	0,021	1	0,021	297,15	< 0.0001	
<b>C- Le ratio MV/ eau (g.ml<sup>-1</sup>)</b>	0,029	0.00661	1	0.006613	93,51	< 0.0001	
<b>AB</b>	-0.00750	0.00002	1	0.000225	3,18	0,1176	
<b>AC</b>	0.002500	0.000025	1	0.000025	0,35	0,5708	
<b>BC</b>	0,015	0.0009	1	0.0009	12,73	0,0091	
<b>A2</b>	-0,032	0.004312	1	0.004312	60,97	0,0001	
<b>B2</b>	-0,025	0.002527	1	0.002527	35,74	0,0006	
<b>C2</b>	-0,030	0.0036	1	0.0003664	51,82	0,0002	
<b>Residual</b>		0.00004	7	0.0000707			
<b>Lack of Fit</b>		0.00037	3	0.0001250	4,17	0,1008	Non significatif
<b>Erreur Pure</b>		0.00012	4	0.000030			
<b>Cor Total</b>		0,075	16				
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9933						
<b>R<sup>2</sup> Ajusté</b>	0,984						
<b>R<sup>2</sup> Prédit</b>	0,9172						
<b>Précision Adeq</b>	36,049						
<b>Déviation standard</b>	0,00840						
<b>Moyenne</b>	0,23352						
<b>C.V %</b>	3,6009						
<b>PRESS</b>	0,0061875						

**Tableau n °2:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des fruits rouges de *P.lentiscus* (L.).

Source	Le rendement d'extraction de l'huile essentielle des fruits rouges de <i>P. lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons						
	Coefficient d'estimation	Somme des carrés	DDL	Moyenne des carrés	F Value	p-value Prob > F	
<b>Modèle</b>	0,63	0,074	9	0.00825	195,97	< 0.0001	Significatif
<b>A-Le temps d'extraction (min)</b>	0,064	0,033	1	0,033	771,48	< 0.0001	
<b>B-La puissance ultrasonique (w)</b>	0,049	0,019	1	0,019	451,14	< 0.0001	
<b>C- Le ratio MV/ eau (g :ml)</b>	0,028	0.006050	1	0.0060	143,56	< 0.0001	
<b>AB</b>	-0,018	0.001225	1	0.00122	29,07	0,0010	
<b>AC</b>	-0,020	0.001600	1	0.001600	37,97	0,0005	
<b>BC</b>	0,020	0.001600	1	0.001600	37,97	0,0005	
<b>A2</b>	-0,038	0.006160	1	0.00616	146,18	< 0.0001	
<b>B2</b>	-0,033	0.004655	1	0.004655	110,46	< 0.0001	
<b>C2</b>	-0,011	0.000486	1	0.0004866	11,55	0,0115	
<b>Residual</b>		0.000295	7	0.004214			
<b>Lack of Fit</b>		0.001750	3	0.0000583	1,94	0,2643	Non significatif
<b>Erreur Pure</b>		0.0012	4	0.00003			
<b>Cor Total</b>		0,075	16				
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9960						
<b>R<sup>2</sup> Ajusté</b>	0,9910						
<b>R<sup>2</sup> Prédit</b>	0,9600						
<b>Précision Adeq</b>	50,965						
<b>Déviation standard</b>	0.006492						
<b>Moyenne</b>	0,60						
<b>C.V %</b>	1,09						
<b>PRESS</b>	0.002987						

**Tableau n ° 3:** Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de surfaces de réponse quadratiques du rendement d'extraction de l'huile essentielles des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.).

Source	Le rendement d'extraction de l'huile essentielle des fruits noirs de <i>P.lentiscus</i> (L.) par hydrodistillation assistée par ultrasons						
	Coefficient d'estimation	Somme des carrés	DDL	Moyenne des carrés	F Value	p-value Prob > F	
<b>Modèle</b>	0.61	0.074	9	0.00824	174.80	< 0.0001	Significatif
<b>A- Le temps d'extraction (min)</b>	0.065	0.034	1	0.034	716.97	< 0.0001	
<b>B- La puissance ultrasonique (w)</b>	0.048	0.018	1	0.018	382.88	< 0.0001	
<b>C- Le ratio MV/eau (g :ml)</b>	0.030	0.007.2	1	0.0072	152.73	< 0.0001	
<b>AB</b>	-0.020	0.0016	1	0.0016	33.94	0.0006	
<b>AC</b>	-0.01	0.0004	1	0.0004	8.48	0.0226	
<b>BC</b>	0.015	0.0009	1	0.0009	19.09	0.0033	
<b>A2</b>	-0.044	0.008152	1	0.008152	172.91	< 0.0001	
<b>B2</b>	-0.019	0.00152	1	0.00152	32.24	0.0008	
<b>C2</b>	-0.019	0.00152	1	0.00152	32.24	0.0008	
<b>Residual</b>		0.00033	7	0.000047			
<b>Lack of Fit</b>		0.00005	3	0.000016	0.24	0.8660	Non significatif
<b>Erreur Pure</b>		0.00028	4	0.00007			
<b>Cor Total</b>		0.074	16				
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9956						
<b>R<sup>2</sup> Ajusté</b>	0.9899						
<b>R<sup>2</sup> Prédit</b>	0.9834						
<b>Précision Adeq</b>	47.474						
<b>Déviati on standard</b>	0.006866						
<b>Moyenne</b>	0.57						
<b>C.V %</b>	1.21						
<b>PRESS</b>	0.001238						

## Les Figures

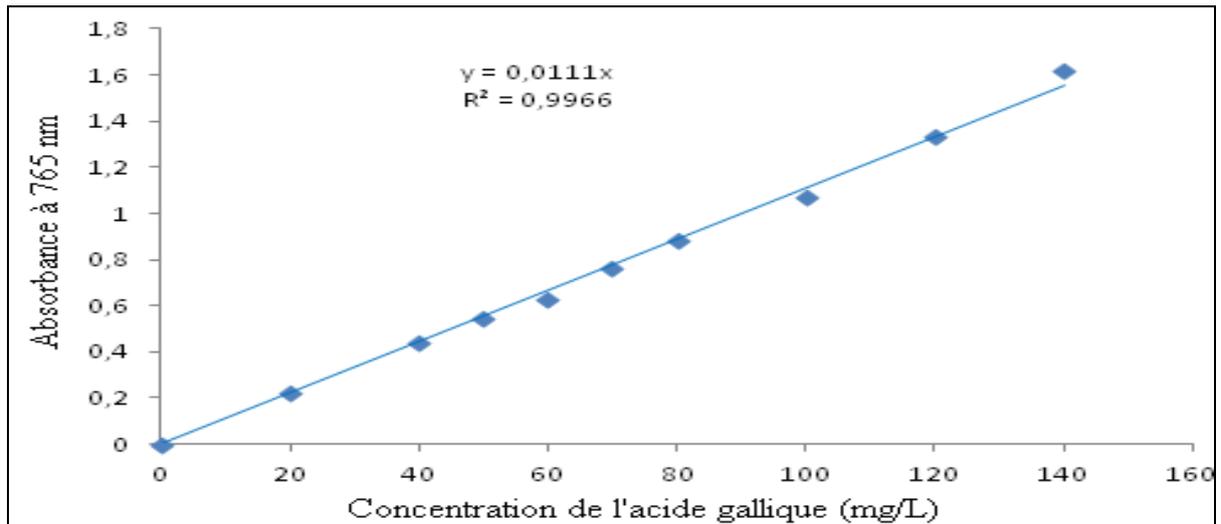


Figure n°1 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique

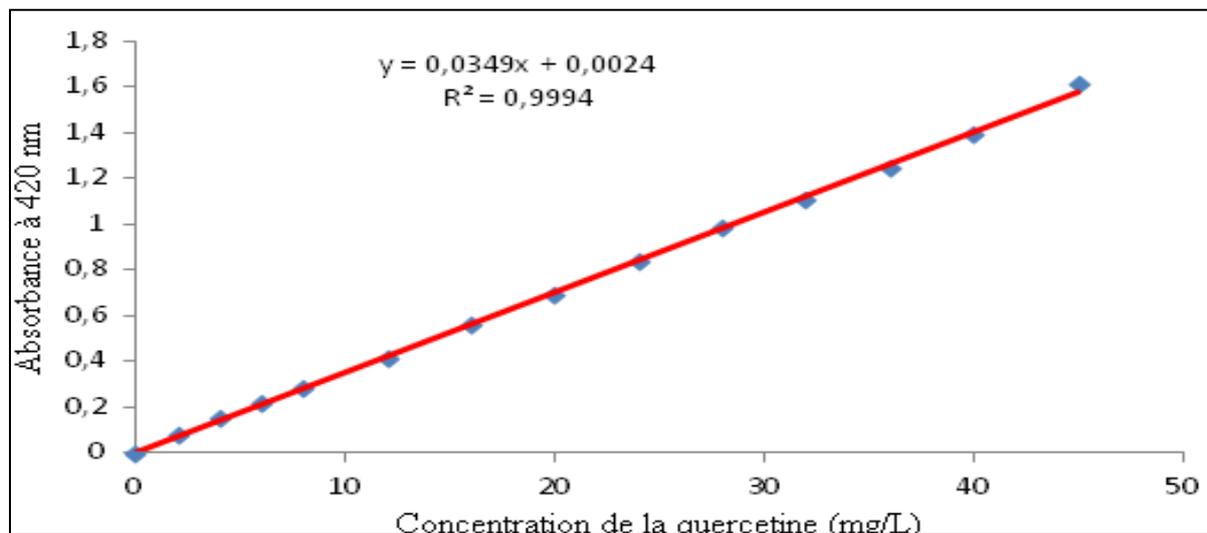


Figure n°2 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

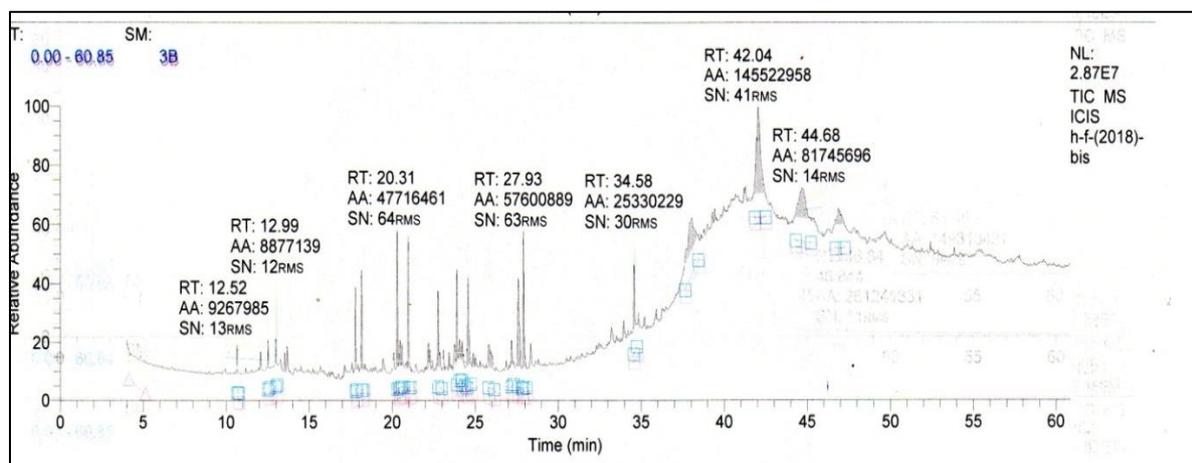
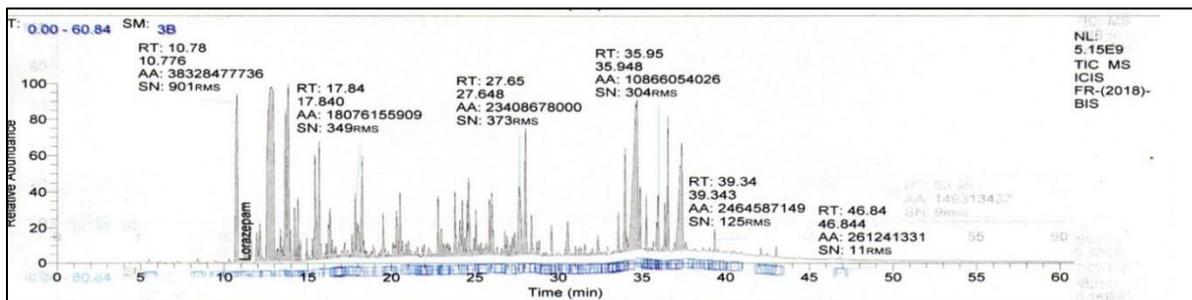


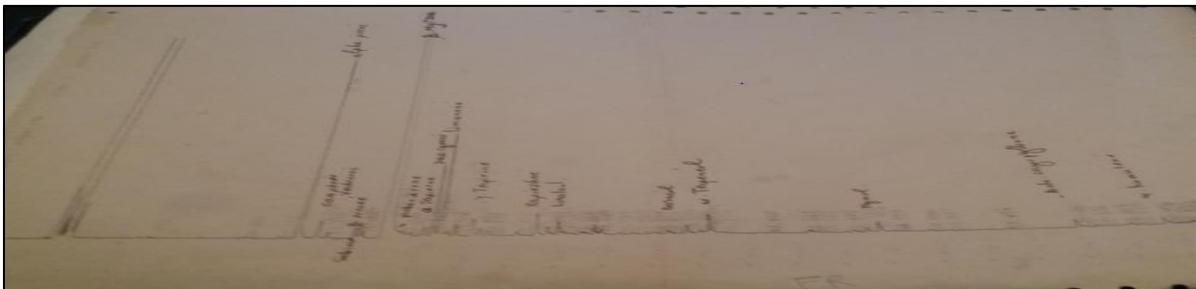
Figure n°3 : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des feuilles/branches de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.



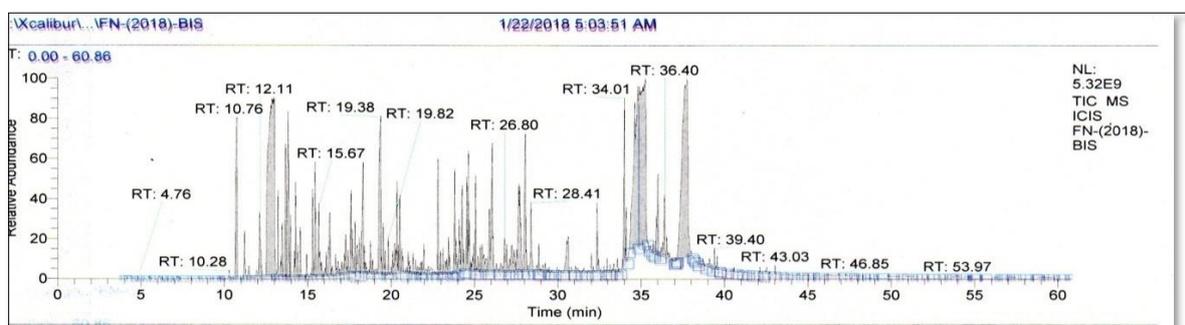
**Figure n°4 :** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des feuilles/branches de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.



**Figure n°5 :** Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des fruits rouges de *P.lentiscus* (L.) de la région de Bouira.



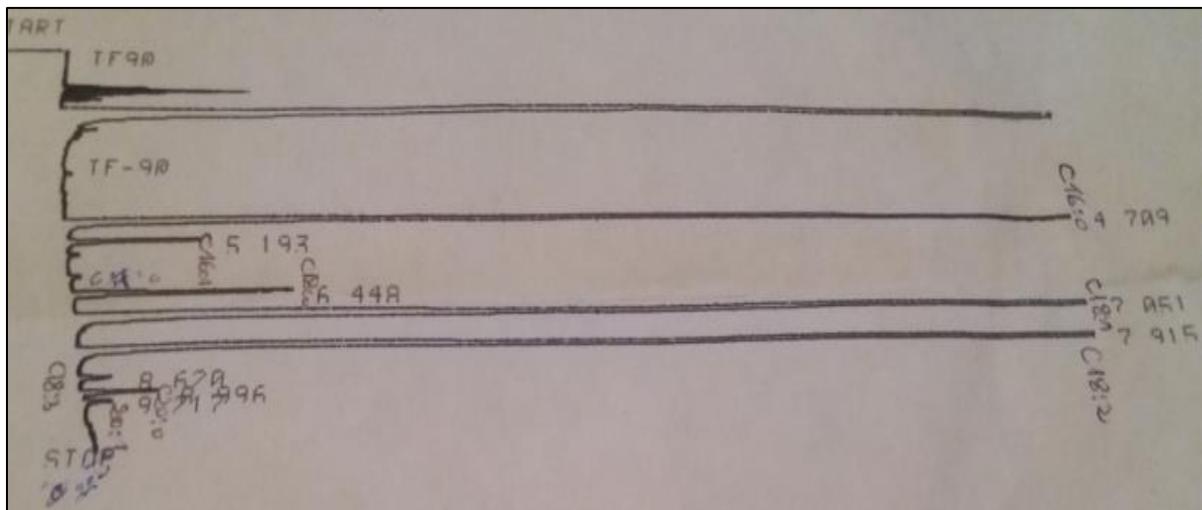
**Figure n°6:** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) de Bouira.



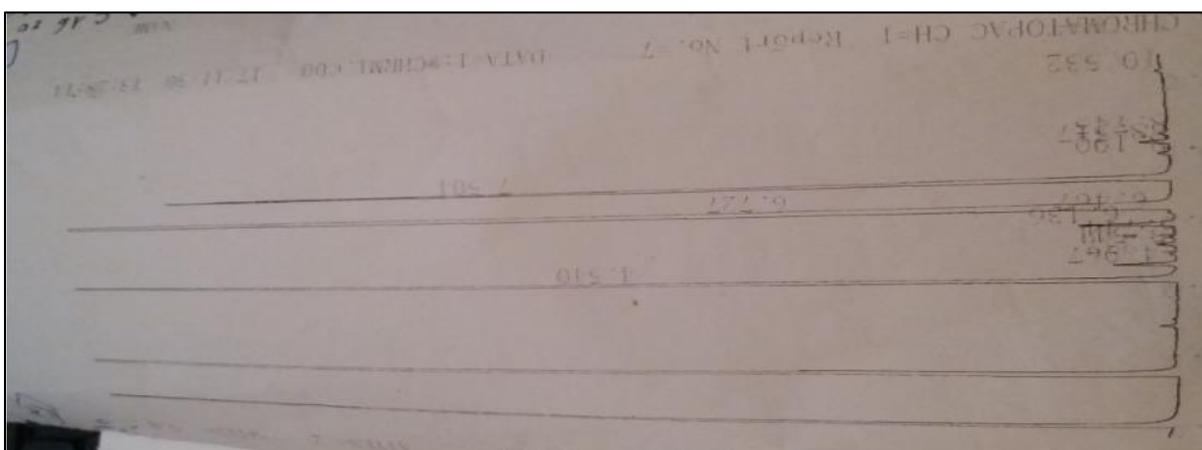
**Figure n°7:** Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) de Bouira.



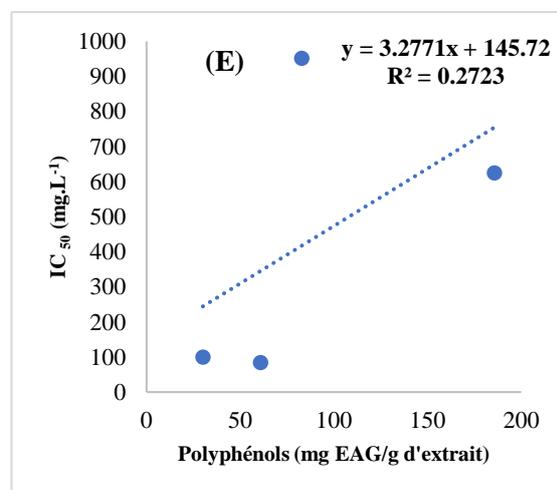
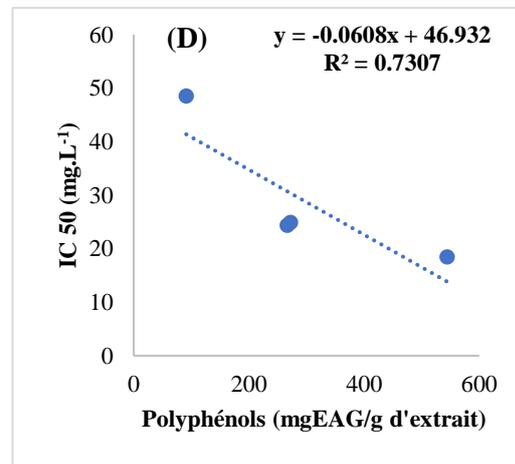
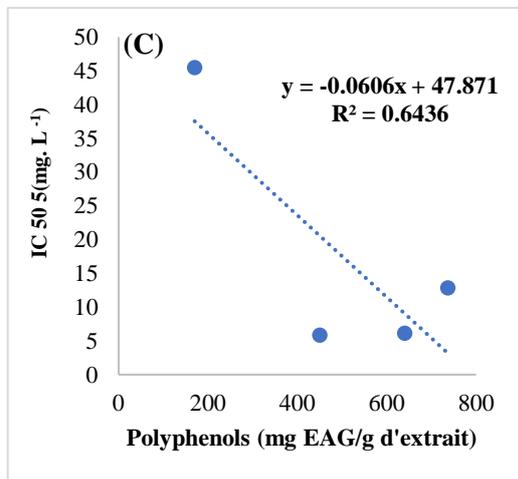
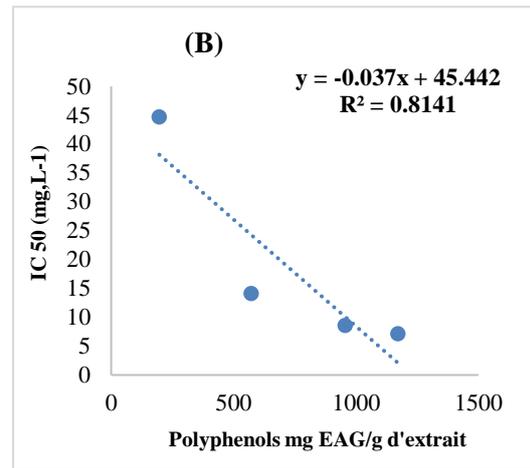
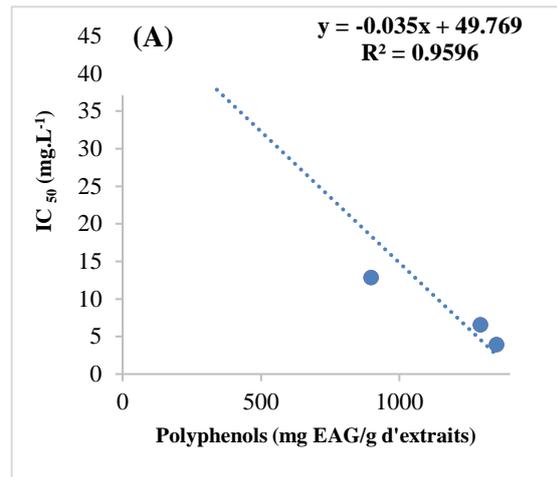
**Figure n°8:** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) de Bouira.



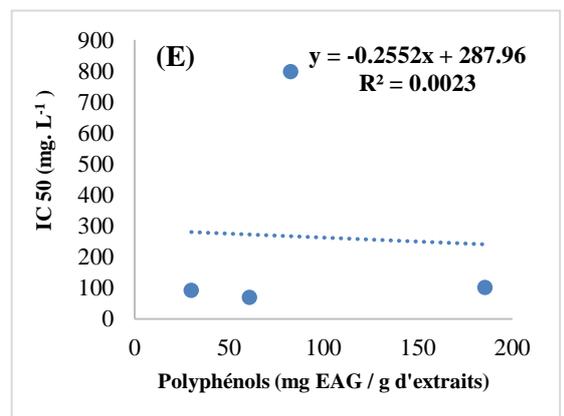
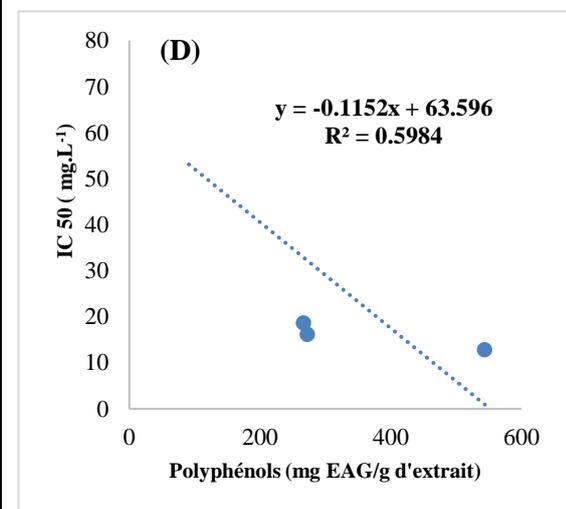
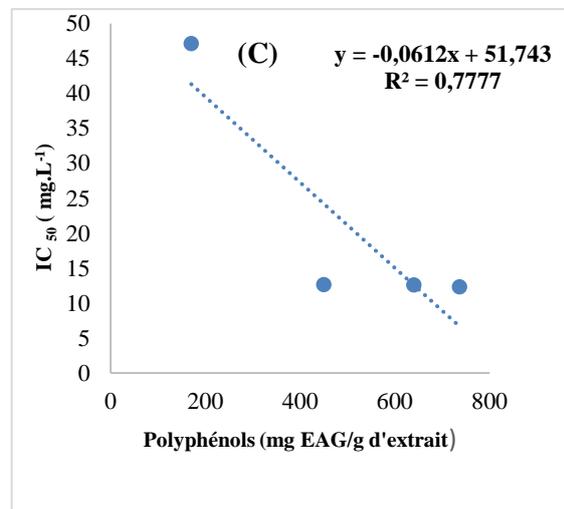
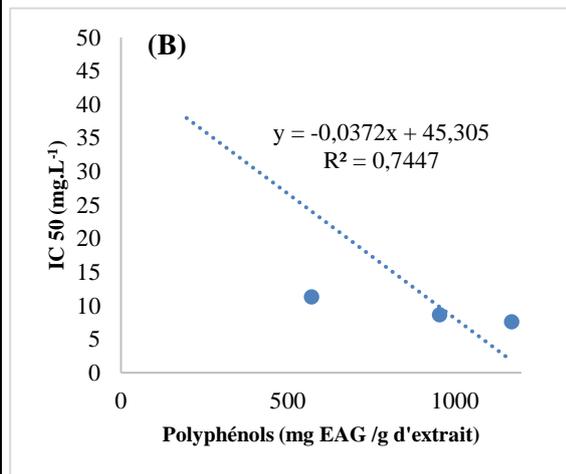
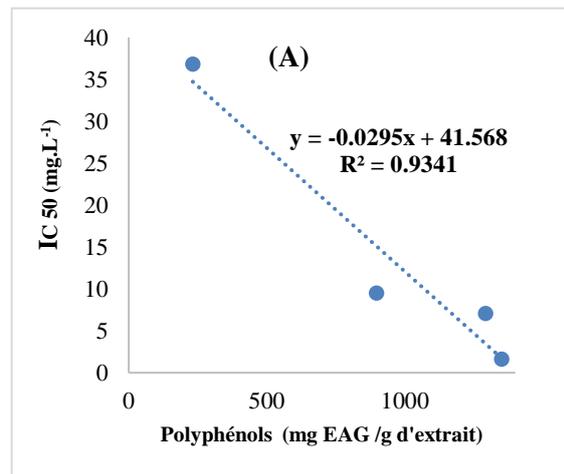
**Figure n°9 :** Chromatogramme CPG de l'huile fixe des fruits rouges de *P. lentiscus* (L.) de la région de Bouira.



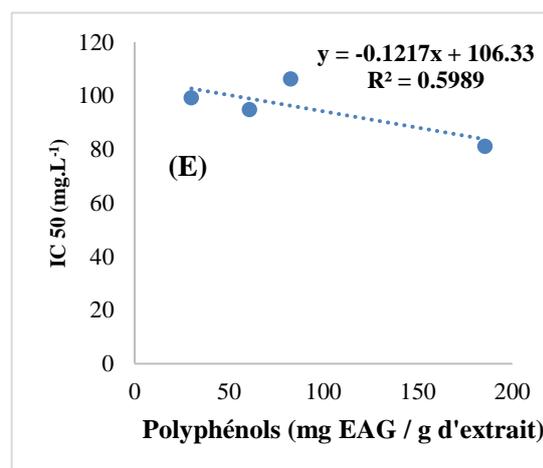
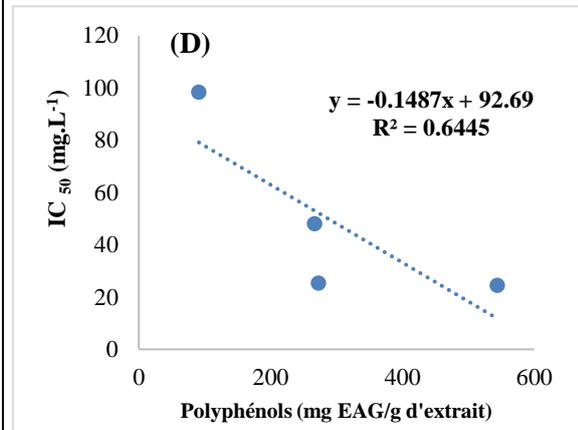
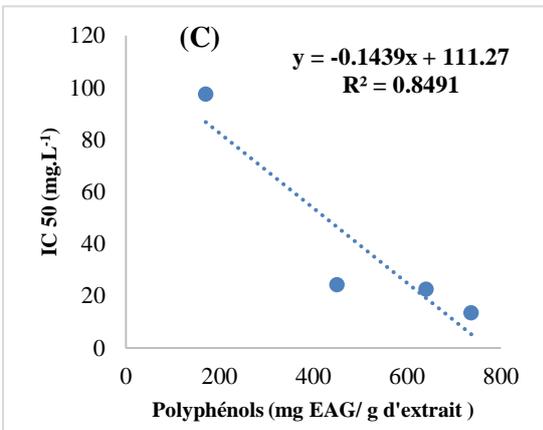
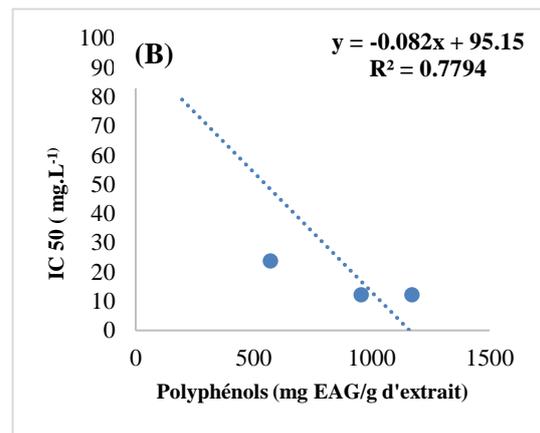
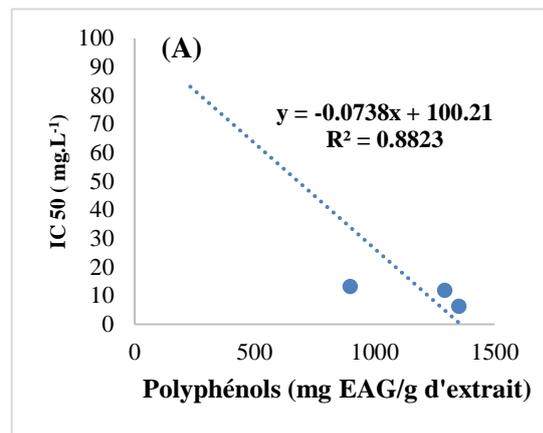
**Figure n°10 :** Chromatogramme CPG de l'huile fixe des fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) de la région de Bouira.



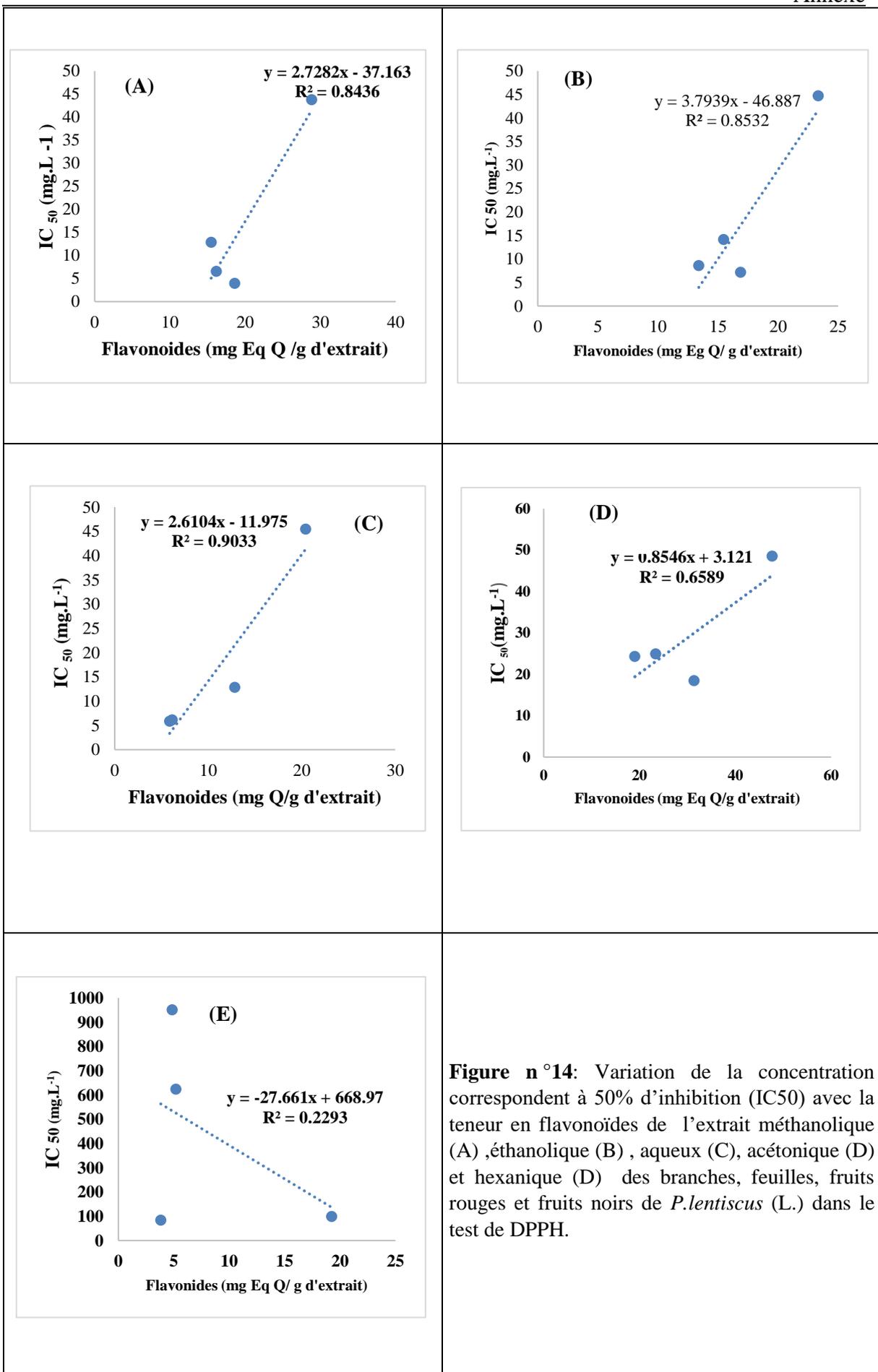
**Figure n °11:** Variation de la concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) avec la teneur en polyphénols de l'extract méthanolique (A) ,ethanolique (B) ,aqueux (C) ,acétonique (D) et hexanique (D) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) dans le test de DPPH.

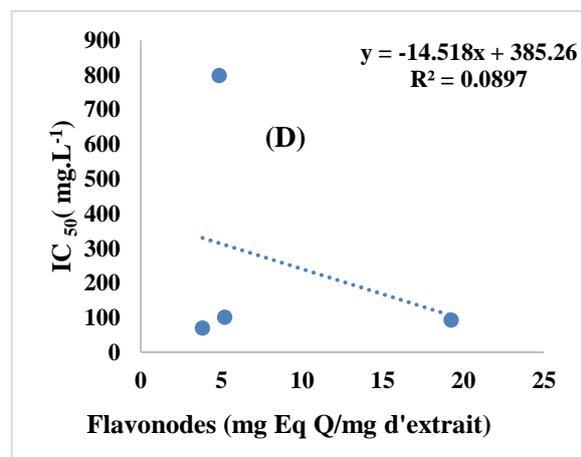
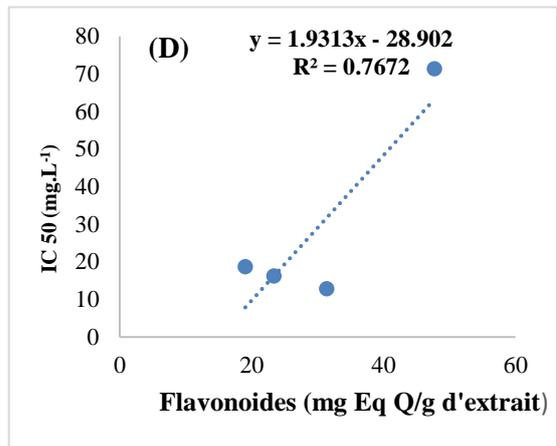
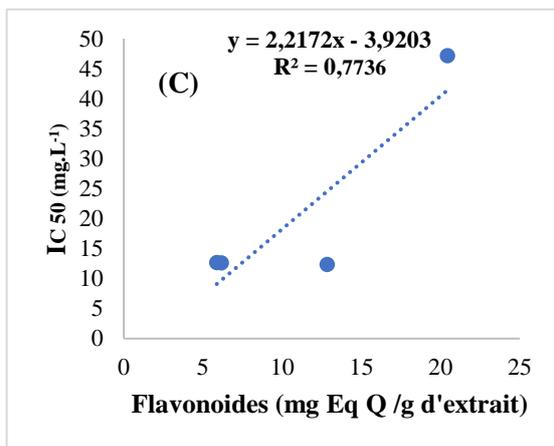
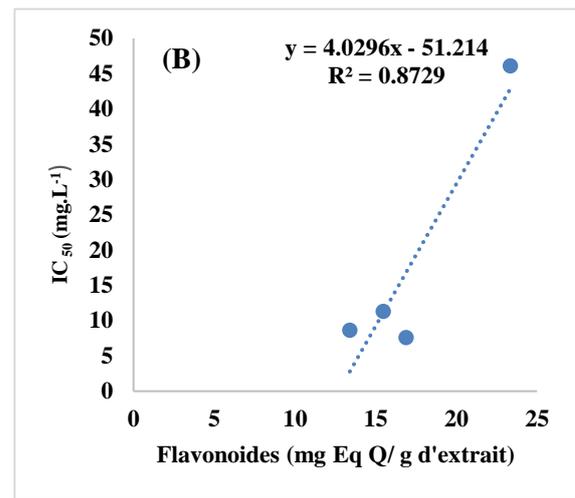
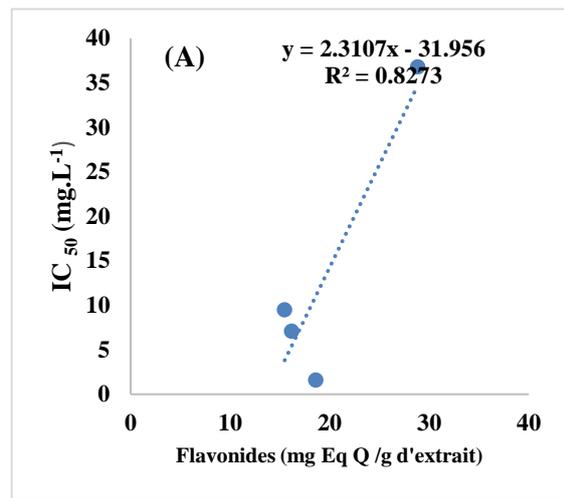


**Figure n°12 :** Variation de la concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) avec la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique (A) ,ethanolique (B) , aqueux (C) ,acétonique (D) et hexanique (D) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) dans le test de l'ABTS.

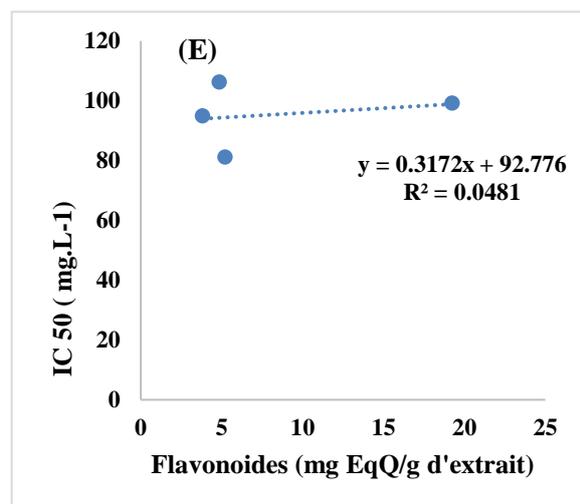
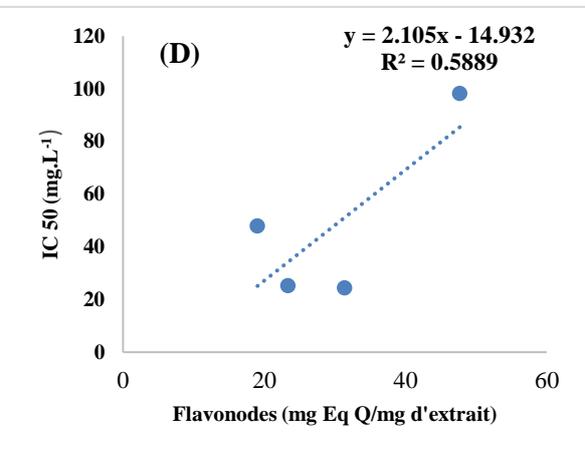
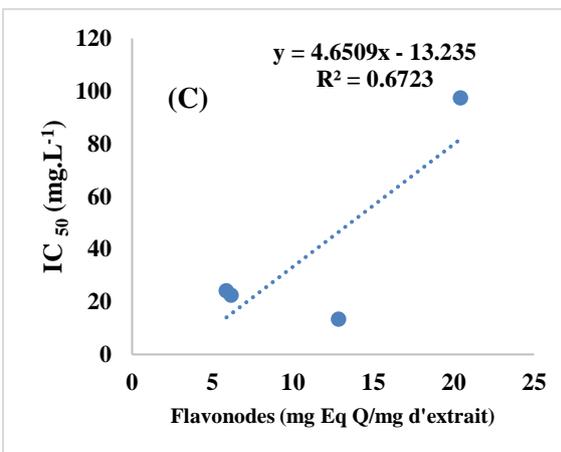
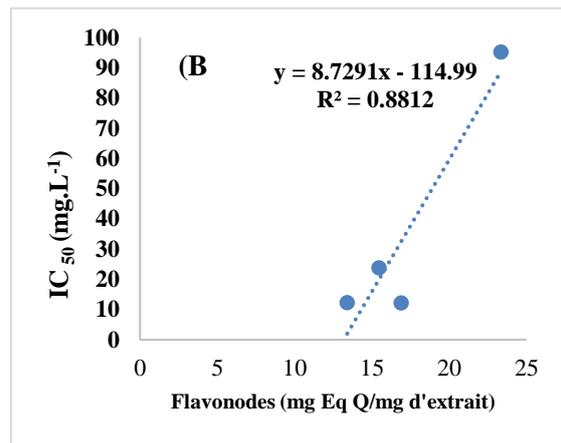
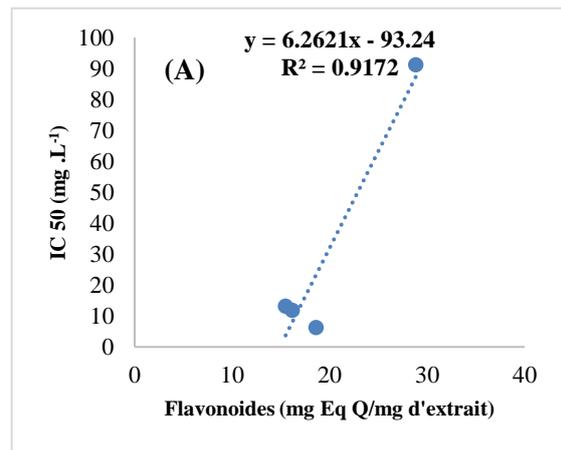


**Figure n°13 :** Variation de la concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) avec la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique (A), ethanologique (B), aqueux (C), acétonique (D) et hexanique (D) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) dans le test du pouvoir réducteur.





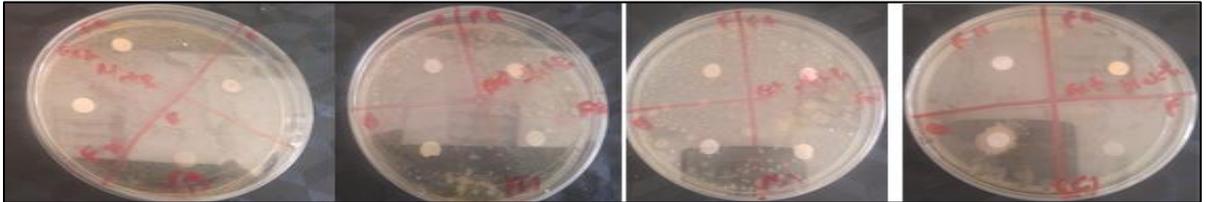
**Figure n°15 :** Variation de la concentration correspondant à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) avec la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) et hexanique (D) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) dans le test de l'ABTS.



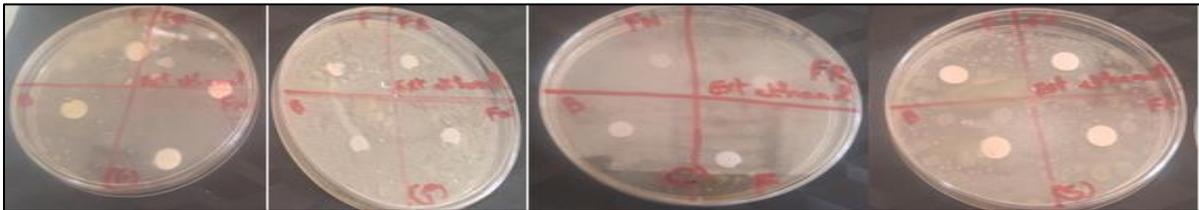
**Figure n°16 :** Variation de la concentration correspondante à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) avec la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique (A), éthanolique (B), aqueux (C), acétonique (D) et hexanique (E) des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) dans le test du pouvoir réducteur.



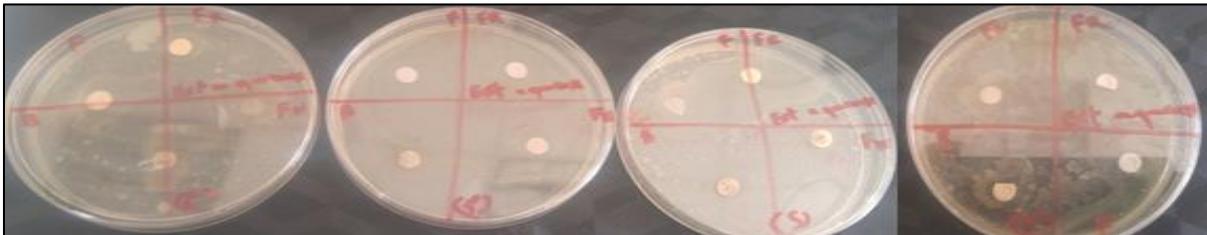
**Figure n °17:** Zones d'inhibition de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*.



**Figure n °18:** Zones d'inhibition des extraits méthanolique, des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*.



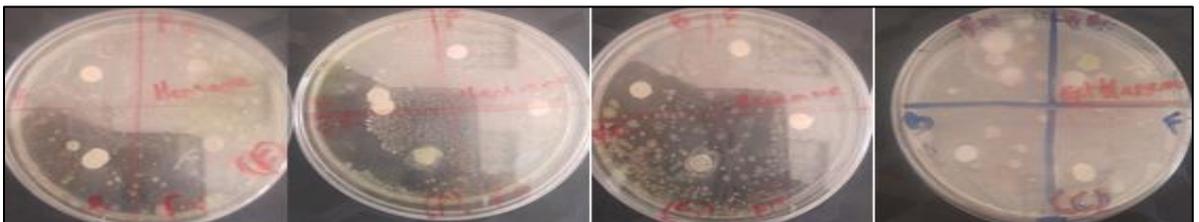
**Figure°19:** Zones d'inhibition des extraits ethanologique des branches, feuilles ,fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.



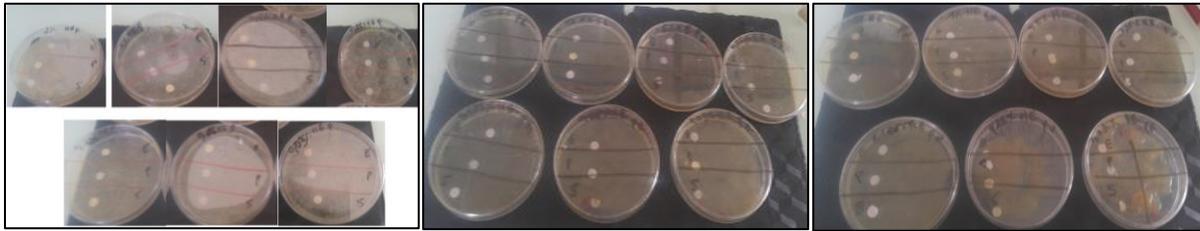
**Figure°20 :** Zones d'inhibition des extraits aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureu* ,*C. albicans*.



**Figure °21:** Zones d'inhibition des extraits acetonique des branches, feuilles ,fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.



**Figure°22 :** Zones d'inhibition des extraits avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ,*C. albicans*.



**Figure n°23:** Illustration de la CMI de l'huile essentielle des feuilles /branches, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°24:** Illustration de la CMI de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans* .



**Figure n°25:** Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches bactérienne.



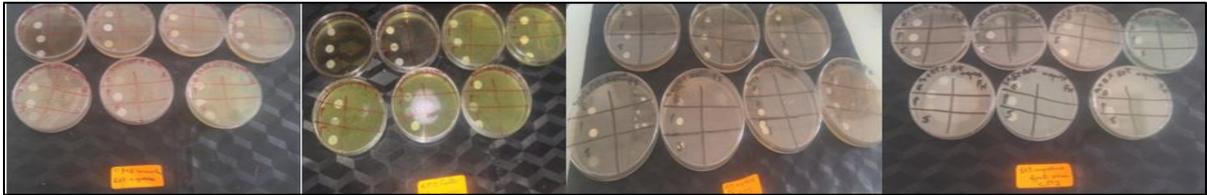
**Figure n°26:** Illustration de la CMI de l'extrait méthanolique des branches, feuilles , fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



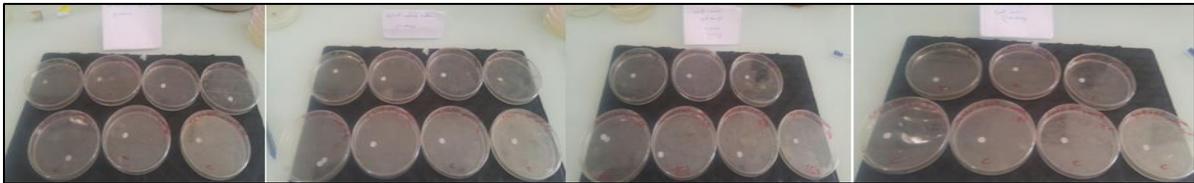
**Figure n°27:** Illustration de la CMI de l'extrait éthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches bactérienne.



**Figure n°28:** Illustration de la CMI de l'extrait éthanolique des branches,de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



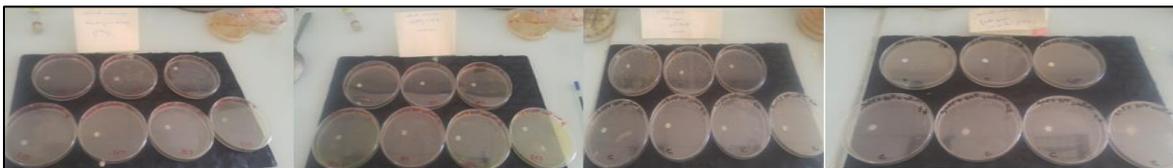
**Figure n°29:** Illustration de la CMI de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°30:** Illustration de la CMI de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis *Candida albicans*.



**Figure n°31:** Illustration de la CMI de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°32:** Illustration de la CMI de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



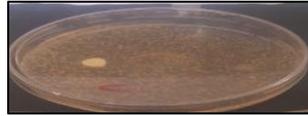
**Figure n°33:** Illustration de la CMI de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°34:** Illustration de la CMI de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure n°35:** Illustration de la CMB de l'huile essentielle des feuilles/ branches, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



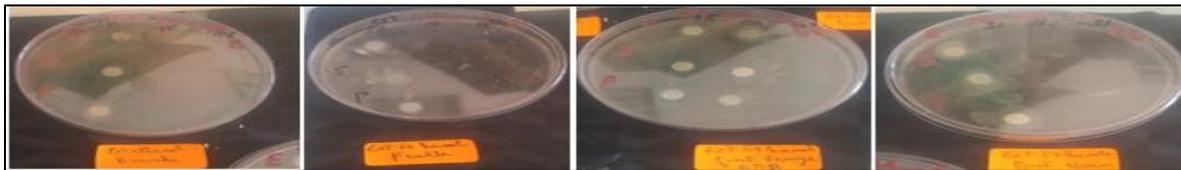
**Figure n°36:** Illustration de la CMB de l'huile essentielle des fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure n°37:** Illustration de la CMB de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noir de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°38:** Illustration de la CMB de l'extrait méthanolique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure n°39:** Illustration de la CMB de l'extrait éthanolique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°40:** Illustration de la CMB de l'extrait éthanolique des branches, feuilles, fruits rouge et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure n° 41:** Illustration de la CMB de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des *Candida albicans* souches bactériennes testées.



**Figure n°42:** Illustration de la CMB de l'extrait aqueux des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



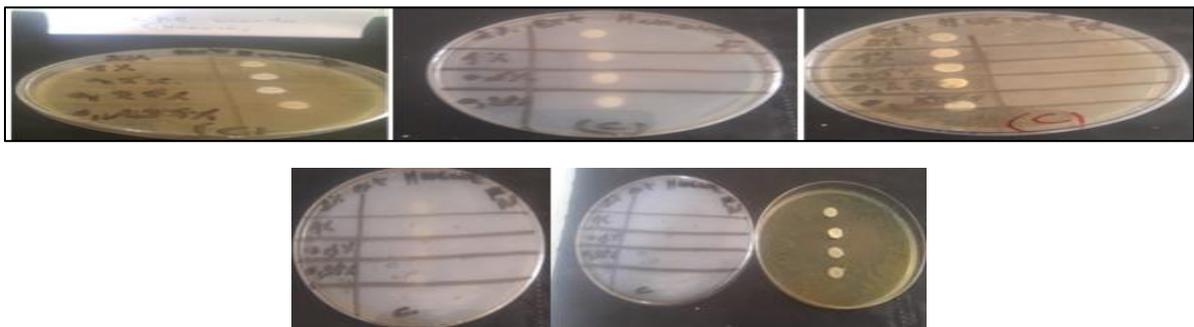
**Figure n°43:** Illustration de la CMB de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des trois souches microbiennes testées.



**Figure n°44:** Illustration de la CMB de l'extrait acétonique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure n°45:** Illustration de la CMB de l'extrait avec l'hexane des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis des 3 souches bactériennes testées.



**Figure n°46:** Illustration de la CMB de l'extrait hexanique des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P.lentiscus* (L.) vis-à-vis de *Candida albicans*.

#### Préparation des réactifs

✚ **Le réactif d'amidon** : Dissoudre 1.2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium ; Chauffer pendant 5 minutes ; Diluer jusqu'à 500 mL.

✚ **La liqueur de Fehling** : La solution est un mélange de deux solutions :

- **Solution A** : Dissoudre 8.66g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans une eau contenant quelques gouttes d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,1N, diluer ensuite la solution à 125 mL.

- **Solution B** : Dissoudre 15g de NaOH et 43,25 g de tartrate de sodium et de potassium dans 50 mL d'eau. Filtrer puis diluer la solution à 125 mL. Les deux solutions à volume égal sont mélangées au moment de l'emploi.

✚ **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,35g du chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) et 5g d'iodure de potassium (KI) dans 60mL d'eau distillée. Ensuite, agiter jusqu'à dissolution et compléter le volume à 100mL.

✚ **Réactif de Wagner** : Dissoudre 2g d'iodure de potassium (KI) et 6g d'iode ( $\text{I}_2$ ) dans 60mL d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100mL.

# Publications

# Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* berries ethanolic extract growing in Algeria

Djamila Belhachat<sup>a,\*</sup>, Fatiha Aid<sup>b</sup>, Lakhdar Mekimene<sup>a</sup> and Messaouda Belhachat<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Département de Technologie Alimentaire, École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El-Harrach, Algiers, Algeria

<sup>b</sup>Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediene (USTHB), El Alia Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

<sup>c</sup>East China Normal University, Shanghai, China

Received 14 July 2017

Accepted 8 September 2017

## Abstract.

**BACKGROUND:** The synthetic antioxidants are used routinely in foods especially those containing oils and fats to protect them against oxidation. Among the synthetic types, the most frequently used are butylated hydroxyl anisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT), propyl gallate (PG) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ). These compounds have been reported to be dangerous for human health. Thus the search for effective, natural compounds with antioxidant activity has been intensified in recent years to replace the synthetic products.

**OBJECTIVE:** The aim of the present study is to investigate the phytochemical composition, quantify the total phenolic and flavonoid contents and to study the *in vitro* antioxidant potential of berries ethanolic extract of *P. lentiscus*.

**METHODS:** *P. lentiscus* berries were subjected to different chemical tests for the detection of phytoconstituents of the Algerian variety. The total phenolic and flavonoid contents were also determined using standard methods. Moreover, the antioxidant activity was assessed by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) assay, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS·+) assay and reducing power activity assay. Here, (BHT) was used as standard antioxidant.

**RESULTS:** Phytochemical screening revealed that the berries contained phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, leucoanthocyanins, phlobotannins, tanins, saponins, terpenoids, proteins and mucilage while alkaloids, quinones and carotenoids are absents. The *P. lentiscus* berries extract was found to contain a high amount of total phenols, flavonoids. The berries ethanolic extract of *P. lentiscus* possess strong scavenging activity against DPPH·, (ABTS·+) free radical scavenging activity and reducing power. The antioxidant proprieties may be attributed to the presence of high phenolic and flavonoid compounds.

**CONCLUSION:** *P. lentiscus* is a potential source of natural antioxidants and other phytoconstituents, which justifies its uses in folk medicines.

Keywords: *P. lentiscus*, antioxidant activity, phytochemical screening, DPPH· assay, ABTS·+ assay, reducing power

\*Corresponding author: Djamila Belhachat, Département de Technologie Alimentaire, École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El-Harrach, Algiers, Algeria. E-mail: djamilaina@hotmail.com.

## 1. Introduction

Plants are a large source of new bioactive molecules with therapeutic potentials [1–5]. Many studies carried out have shown that the medicinal properties of plants come from the presence of bioactive agents in their extracts [6–9]. The most important elements are alkaloids, flavonoids, vitamins, tannins, essential oils, organic acids, resins, fat oils, saponins and polysaccharides [10, 11]. Reports indicate that there is an inverse relationship between the dietary intake of antioxidant-rich foods and the incidence of human disease [12, 13]. However, synthetic antioxidants, such as (BHT) and (BHA), have been widely used as antioxidants in the food industry and may be responsible for liver damage and carcinogenesis [14, 15]. For this reason, interest in the use of natural antioxidants has increased. Epidemiological studies have indicated the relationship between the plant antioxidants and reduction of chronic diseases [16–18]. Therefore, the development and utilization of more effective and non-toxic antioxidants from natural products are recommended, not only for the food and drug storage, but also for the nutritional and clinical applications. A great deal of effort has focused on using available experimental techniques to identify natural antioxidants from medicinal plants [19]. The Mediterranean region is relatively rich with plants (between 15,000 and 20,000 species) [20]. Algeria, a North African country with a large variety of soils (littoral, steppe, mountains and desert) and climates, possesses a rich flora (more than 3,000 species and 1,000 genders) [21], it has an immense biodiversity. *Pistacia lentiscus* L. is an aromatic evergreen shrub belonging to the Anacardiaceae family, largely distributed in the Mediterranean basin [22]. Aerial parts of *P. lentiscus* have traditionally been used in the treatment of hypertension, coughs, sore throats, eczema, stomach aches, kidney stones and jaundice. They possess stimulant and diuretic properties [23]. The fruits, galls, resin and leaves of *P. lentiscus* have a long tradition in folk medicine dating from the times of the ancient Greeks [24]. Several studies focused on the phytochemical composition of the resin, the leaves and the galls essential oil of *P. lentiscus* [24–28] and also on its antioxidant activity [29, 30], but in contrast, fewer studies are related to the composition and antioxidant activity of the berries of *P. lentiscus* [31–33].

The aim of this study was to investigate the *P. lentiscus* berries growing in Algeria for its phytochemical composition, DPPH radical scavenging activity, ABTS activity and reducing power activity to explore their potential pharmaceutical and functional food uses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The berries of *P. lentiscus* were collected in October 2014 from Bouira region in Algeria. The plant material identification was carried out according to the new flora of Algeria [34]. The *P. lentiscus* berries were dried at room temperature. After drying, the aerial part was ground with a coffee grinder to obtain a fine powder and stored in paper bags at 4°C until their use.

### 2.2. Preparation of the extract

Ethanol extract was prepared from 20 g of the dried and powdered plant with 200 ml of absolute ethanol (Ethanol 95%) in a Soxhlet apparatus for 6 hours. Then, the solvent was evaporated using a rotary evaporator at 65°C. Finally, the residue was lyophilized, weighed and kept in the dark at +4°C until further analysis.

### 2.3. Phytochemical screening

Phytochemical analysis of the berries of *P. lentiscus* was carried out using the standard protocols for the presence of phenolic content, flavonoids, alkaloids, saponins, antocyanins, leucanthocyanins, phlobatannins,

tannins, terpenoids, quinones, proteins, carotenoids and mucilage. Detection of these phytochemicals was based on visual observation following color change or formation of a precipitate after the addition of specific reagents.

#### 2.4. Total phenolic content

Total phenolic constituents of plant extracts were performed employing the literature methods involving Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid as standard [35]. 0.25 ml of each sample (three replicates) was mixed with 1.25 ml 1/10 dilution of Folin-Ciocalteu's reagent. After 3 minutes, 1 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%, w/v) were added and incubated for 30 min.

The absorbance of all samples was measured at 765 nm. The total phenolic content was expressed in mg of gallic acid equivalents (mg GAE)/g of dried extract by using the regression equation that was obtained from the calibration curve of the gallic acid standard. All determinations were performed 3 times.

#### 2.5. Total flavonoids contents

Total flavonoid content of each extract was determined by aluminium trichloride (AlCl<sub>3</sub>) method as described by Lamaison et al. [36]. 1 ml aliquot of each extract dissolved in ethanol was added to 1 ml of solution of AlCl<sub>3</sub> (2% w/v). The mixture was vigorously shaken, and after 1 h of incubation, absorbance was taken at 420 nm. Quercetin was used as the standard for the calibration curve. The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalent (QE) per gram dry weight of *P. lentiscus* berries extract.

#### 2.6. Antioxidant activity

In this study, the antioxidant potential of the ethanolic extract of *P. lentiscus* berries was measured by different chemical assays: DPPH radical scavenging activity, ABTS test and reduction power activity. We compared the antioxidant capacity of the extract with BHT as reference.

##### 2.6.1. DPPH assay

The antiradical activity of ethanolic extract was determined using the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) [37]. 25 μL samples of various concentrations of ethanolic extract were added to 975 μL of ethanolic solution containing DPPH radicals (60 μM) while butylatedhydroxytoluene (BHT) acted as a positive control, the absorbance of DPPH· radical solution without sample was measured as blank. All test tubes were incubated in a dark place at room temperature for 30 minutes. Then the absorbance was measured at 517 nm. All determinations were carried out in triplicates. The disappearance of DPPH· was recorded and the percent inhibition of the DPPH· radical by sample is calculated as follows:

$$\text{Inhibition Percent} = [(A_b - A_s)/A_b] \times 100.$$

Where A<sub>b</sub> is the absorbance of blank and A<sub>s</sub> is the absorbance of positive control or sample. Extract concentration providing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) was calculated from the graph plotting inhibition percentage against extract concentration.

##### 2.6.2. ABTS·+free radical scavenging activity

The ABTS method is based on the reduction of the green ABTS radical cation (7.00 mM) that was obtained by its oxidation with equal volume of potassium persulfate (2.45 mM) [38], for 12–16 h at 4°C in the dark. ABTS·+ solution was diluted with ethanol to absorbance of (1.00 ± 0.02) at 734 nm. Then, 25 μL of the extract dilutions was mixed with 1 mL ABTS<sup>+</sup> solution, the absorbance of reaction mixture was measured after 7 min at 734 nm. Tests were carried out in triplicate. ABTS·+ solution was used as blank sample, and BHT was used as positive control. As for the DPPH assay, ABTS scavenging ability was expressed as IC<sub>50</sub> (mg/l). The values of IC<sub>50</sub> were

determined as reported above. The inhibition percentage of ABTS radical was calculated using the following formula:

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100.$$

Where  $A_0$  is the absorbance of the control, and  $A_1$  is the absorbance of the sample.

### 2.6.3. Reducing power

The reducing power was determined according to the method of Oyaizu [39]. 0.125 ml of ethanolic extract and BHT at different concentrations were mixed with 2.5 ml of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH = 6.6), and 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Then, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture which was centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The upper layer (2.5 ml) was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% ferric chloride. The absorbance was measured at 700 nm. Blank absorbance was read by replacing sample by ethanol. BHT was used as a positive control. The reducing power increases with the increase of absorbance. All determinations were carried out in triplicates. A higher absorbance indicates a higher reducing power. IC<sub>50</sub> value (mg/l) is the effective concentration giving an absorbance of 0.5 for reducing power and was obtained from linear regression analysis.

### 2.6.4. Statistical analysis

Statistical comparisons were made with one way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical calculation was performed using SPSS 20.0 software. All the data were analyzed and expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three separate determinations ( $n = 3$ ).

## 3. Results

In the present study, the DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity and reducing power of *P. lentiscus* berries extract were investigated. The antioxidant activities of *P. lentiscus* extract were also compared with that of reference synthetic antioxidant. In addition, the phytochemical analysis, phenolic compound and flavonoids content of ethanolic extract were carried out.

### 3.1. Phytochemical screening

Phytochemical screening was performed using standard protocols which showed the presence of phenolic compounds, flavonoids, antocyanins, leucanthocyanins, phlobotannins, tannins, saponins, terpenoids, proteins and mucilage with absence of alkaloids, quinones and carotenoids (Table 1).

### 3.2. The total phenolic and flavonoid content

Phenolic compounds are the largest group of phytochemicals and have been touted as accounting for most of the antioxidant activity of plants or plant products [40]. Several reports have shown a close relationship between total phenolic content and high antioxidant activity [41]. Total phenolic contents obtained were  $955.28 \pm 0.125$  mg GAE/g of the berries extract and total flavonoid contents obtained were  $13.40 \pm 0.35$  mg QE/g of the berries extract for the *P. lentiscus* (Table 2).

### 3.3. DPPH radical scavenging assay

Plants rich in secondary metabolites, including phenolics, flavonoids and carotenoids, have antioxidant activity due to their redox properties and chemical structures [42], the DPPH radical scavenging method was used to

Table 1  
Phytochemical screening of *P. lentiscus* berries

Phytochemicals	<i>P. lentiscus</i> berries
Phenolic compounds	+
Flavonoids	+
Anthocyanins	+
Leucoanthocyanins	+
Phlobatannins	+
Tannins	+
Alkaloids	-
Carotenoids	-
Proteins	+
Mucilage	+
Saponins	+
Terpenoids	+
Quinones	-

(+): Present, (-): Absent.

Table 2  
The content of total phenolics, flavonoids in *P. lentiscus* berries ethanolic extract

	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mg QE/g extract)
<i>P. lentiscus</i> berries ethanolic extract	955.28 ± 0.125	13.40 ± 0.35

Data are expressed as mean ± standard deviation of three different experiments. mg GAE/g: mg of gallic acid equivalent per g of lyophilized extract; mg QE/g: mg of quercetin equivalent per g of lyophilized extract.

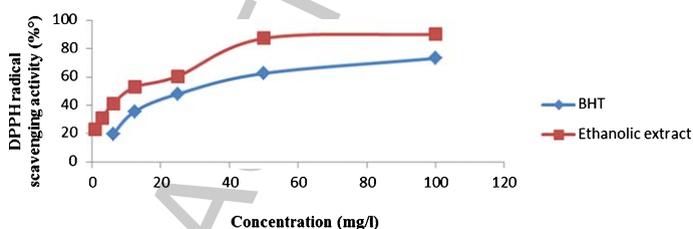


Fig. 1. Free radical scavenging capacities of BHT and *P. lentiscus* berries ethanolic extract measured in DPPH assay.

evaluate the antioxidant capacity of the berries extract, because the use of DPPH radical provides an easy, rapid and convenient method to evaluate the antioxidants and radical scavengers [43]. In the present study, *P. lentiscus* berries extract showed a strong effect in inhibiting DPPH, reaching up to  $90.059 \pm 0.65\%$  at concentration of 100 mg/l. Figure 1 shows the dose response curve of DPPH radical scavenging activity of *P. lentiscus* compared with standard BHT. The concentration of the extract to scavenge 50% of the DPPH radical is called  $IC_{50}$  and lower  $IC_{50}$  values indicates higher antiradical activity. The  $IC_{50}$  value of *P. lentiscus* berries extract was  $8.60 \pm 0.07$  mg/l while the  $IC_{50}$  value of standard antioxidant BHT was  $28.24 \pm 0.20$  mg/l (Table 3).

Table 3  
Antioxidant activity expressed in IC<sub>50</sub> (mg/l) of ethanol extract of *P. lentiscus* berries and BHT

Plant sample/Control	DPPH	ABTS	Reduction power
Berries ethanolic extract	8.60 ± 0.07 <sup>b</sup>	8.65 ± 0.051 <sup>a</sup>	12.21 ± 0.036 <sup>b</sup>
BHT	28.24 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.81 ± 0.01 <sup>b</sup>	64.14 ± 0.14 <sup>a</sup>

Values in the same column followed by the same letter are not significantly different by the Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Data are the mean of three replicates.

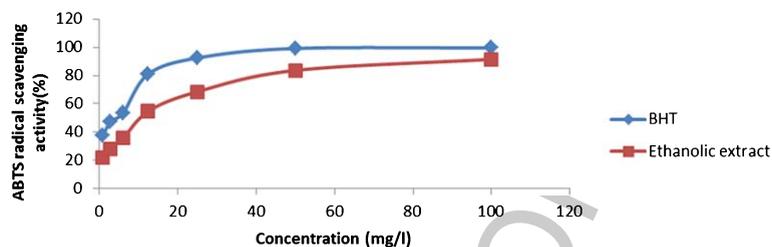


Fig. 2. Free radical-scavenging capacities of BHT and *P. lentiscus* berries ethanolic extract measured in ABTS assay.

#### 3.4. ABTS radical scavenging activity

The ABTS assay is based on the inhibition of the absorbance of radical cation, ABTS<sup>+</sup>, which has a characteristic wavelength at 734 nm, by antioxidants. Similar to DPPH, the decolorization of ABTS radical reflects the capacity of an antioxidant species to donate electron or hydrogen atoms to inactivate this radical cation [44]. ABTS results were in good agreement with DPPH method that the scavenging activity of the ethanolic extract was increased with the increasing concentration. The extract scavenged the ABTS radical in a dose dependent manner at concentration of 1–100 mg/l (Fig. 2). Furthermore, the results obtained in this study indicated that the berries ethanolic extract of *P. lentiscus* exhibited a high ABTS radical-scavenging activity and its percentage inhibition reached 91.45 ± 0.14% at a concentration of 100 mg/l, which appeared lower than of synthetic antioxidants BHT (99.56 ± 0.056%) for the same concentration, these findings were confirmed by calculating the IC<sub>50</sub> values for the *P. lentiscus* berries extract (8.65 ± 0.051 mg/l), which was found to be lower than that of standard BHT (IC<sub>50</sub> = 5.81 ± 0.01 mg/l).

#### 3.5. Reducing power

Reducing power experiment is a good reflector of antioxidant activity of the plant. The plant having high reducing power generally reported to carry high antioxidant potential too. In this experiment, Ferric ions are reduced to ferrous ions with the color of the reaction mixture changes from yellow to bluish green. In reducing power assay, the dose-dependent curve of the plant extract at different concentrations (1–100 mg/l) was compared with that of BHT (Fig. 3). Ethanolic extract showed higher reducing power than that of the BHT. Reducing power potential of extract increase with the dose, however, extract exhibits height reducing power than that of BHT. The absorbance of the plant extract was varied from 0.39 ± 0.008 (1 mg/l) to 0.87 ± 0.001 (100 mg/l), whereas BHT was varied from 0.01 ± 0.001 (1 mg/l) to 0.78 ± 0.006 (100 mg/l). The IC<sub>50</sub> value of the plant extract was 12.21 ± 0.036 mg/l and that of BHT was 64.14 ± 0.14 mg/l (Table 2).

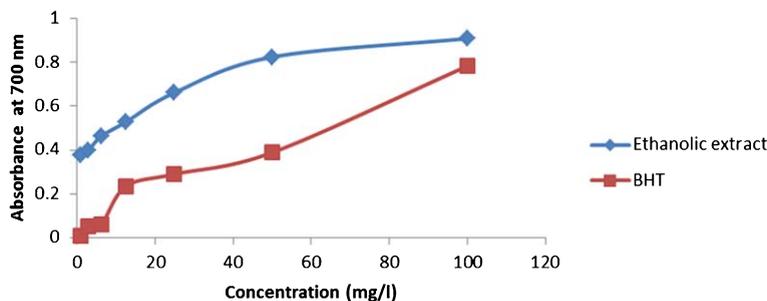


Fig. 3. Reduction power of berries ethanolic extract of *P. lentiscus* compared with that of BHT.

#### 4. Discussion

The phytochemical screening was performed to identify the classes of chemical compounds present in the berries of *P. lentiscus*. Preliminary results have shown that *P. lentiscus* contains the majority of secondary metabolites, confirming the findings of Arab et al. [45]. We can say that almost all of bioactive molecules are present which proves their wealth and potentiality biological activities; they are responsible for the major activities including antioxidant activity; thus supporting the medicinal uses of this plant. Phenolic compounds have been detected in different parts of it [46], demonstrating that digallic acid (39) from fruits of *P. lentiscus* has anti-mutagenic properties. 1,2,3,4,6-Pentagalloyl glucose (45) and gallic acid from fruits of *P. lentiscus* were introduced as antioxidant and anti-mutagenic compounds [22]. Flavonoids were also isolated from aerial parts of *P. lentiscus*, quercetin-3-glucoside (56) was reported as the most abundant one [47]. Natural antioxidants like phenols, flavonoids and tannins possess potent antioxidant [48, 49]. Zitotni et al. [33] reported that phytochemical analysis showed that the major constituents of the extracts of *P. lentiscus* fruit were flavonoids, tannins, and anthocyanins, another authors found the anthocyanins, the flavonoids and triterpenes respectively in this plant [50, 51]. Similarly, the review of phytochemical screening realized by Hamad et al. [52] revealed the presence of unsaturated sterols and/or triterpenes, carbohydrates, flavonoids and tannins in *P. lentiscus*. Anthocyanins have been reported from some *Pistacia* species [53–55]. Cyanidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-glucoside (63) have been detected in *P. lentiscus* berries and leaves [27, 50].

Plant phenols represent one of the major groups of compounds acting as primary antioxidants or free radical terminators. Thus, it was reasonable to determine their total amount in the selected plant extracts [56]. The results of these phytochemicals obtained in the present study, especially those of flavonoids and phenolic content, was shown to be higher than that found in some studies, the phenolic contents in berries were of  $103.342 \pm 2.317$  mg GAE/g and  $414.9 \pm 3.0$  mg GAE/g, respectively found by Zitouni et al. [33] and Boutsari et al. [57]. Another recent study by Arab et al. [45] reported an abundance of phenolic compounds in fruits of *P. lentiscus* (61.34%). In comparison with others authors, Zitouni et al. [33] found that the flavonoid content was  $4.696 \pm 0.329$  (mg CE/g DM) in berries of *P. lentiscus*. Author work reported that the total phenolic and flavonoid content in fruits extract of *P. lentiscus* were ( $205.79 \pm 6.51$  mg CatE/gE and  $6.28 \pm 1.04$  mg RutE/gE), respectively [32]. The results of this study shown the higher total phenolic compounds content of *P. lentiscus* berries than cranberry berries from Canada [58]. The Total phenolic compound values of methanolic extracts of three berry fruits (blueberry, blackberry, and strawberry) growing in Nanjing, China, were found to be 9.44, 5.58, and 2.72 mg gallic acid/g DW, respectively [59]. These differences in total phenolic contents could be due to genotypic and environmental variations (climate, location, temperature, fertility and diseases) within species, plant part tested, harvesting time and extraction procedure [60]. The presence of phenolic compounds account for the majority of antioxidant activity in plants. Flavonoids, including flavones, flavanols and condensed tannins, are plant secondary metabolites, the antioxidant activity of which depends on the presence of free OH groups,

especially 3-OH. Plant flavonoids have antioxidant activity *in vitro* and also act as antioxidants *in vivo* [61, 62]. The presence of phenolic compounds account for the majority of antioxidant activity in plants, in which the antioxidant properties are mainly because of their redox potential, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, metal chelators and singlet oxygen quenchers [63]. Flavonoids exhibit a variety of biological activities both *in vitro* and *in vivo* [64]. The flavonoids content reported in our study for *P. lentiscus* berries were higher than that reported in previous studies for other berries (cranberry) [58, 65]. The Total flavonoids content values of blueberry, blackberry and strawberry were found to be 24.38, 3.99 and 1.16 mg catechin/g DW, respectively [59]. The type and variety of berries plants may account for differences in the results obtained as well as possible variations in the extraction conditions and type used, Geographic origin of plants, genotypes considered, environmental conditions (soil, climate) and maturity stage at harvest of plants berries. It is reported in literature that flavonoids show considerable antioxidant action on human health and fitness and act either through scavenging or chelating processes [66].

Several methods are available to measure the antioxidant activity of food and biological systems [67]. Due to the presence of different bioactive components with antioxidative potential in the berries extracts of *P. lentiscus*, three complementary methods (DPPH, ABTS radical scavenging activity and reducing power) have been used to investigate sample extract antioxidant activity. The improved ABTS method has been widely used to evaluate the total antioxidant capacities of both aqueous and lipophilic systems *in vitro*, while the DPPH method has been used for evaluating the scavenging activities of antioxidants in lipophilic systems [68]. The DPPH is a stable free radical, which has been widely used as a tool for estimating free radical scavenging activities of antioxidants [48]. Our results suggested that different concentration have different activities and maximum activity was observed at 100 mg/l concentration. The observed antioxidant of extracts may be due to the neutralization of free radicals (DPPH), either transfer of hydrogen atom or by transfer of an electron [69]. This significant scavenging ability in the above berries extract could be attributed to the presence of active phytoconstituents in them and their high content of phenols and flavonoids. Phytochemical studies indicated the presence of copious amounts of flavonoids, tannins and phenolics in the extracts of *P. lentiscus*, which could be responsible for the observed activity [51]. Zitouni et al. [33] reported that Tannins roots and fruits of *P. lentiscus* exhibited also high activity with  $EC_{50}$  of  $0.090 \pm 0.011$  mg/ml and  $0.099 \pm 0.019$  mg/ml. Belyagoubi-Benhammou et al. [70] reported that the results from various free radical scavenging systems revealed that the fruits of *P. atlantica* plant had significant antioxidant activity and free radical scavenging activity and the  $EC_{50}$  values of the DPPH radical scavenging activity of the ethyl acetate fraction found to be (14.64 mg Antioxidant/g DPPH) and (49.21 mg/g) for the butanolic extract. Flavonoids and phenolic acids are the most important groups of secondary metabolites and bioactive compounds in plants [27]. Some researchers have investigated the relationship between antioxidant activity and polyphenol content [71–74]. Polyphenol compounds are reported to be a good source of natural antioxidants [75]. The rich flavonoid plants could be a good antioxidant source that would help increase the overall antioxidant capacity of an organism and guard it against lipid peroxidation [76].

The presence of specific chemical compounds in the extract of *P. lentiscus* may inhibit the potassium persulfate activity and hence reduced the production of ABTS. Several other authors noted that there is a correlation between total phenolic content and ABTS scavenging activity of the plants extracts [77–78]. Previous studies [53, 79, 80], showed that greater antioxidant potential of several *Pistacia* species extract could be related to the nature of phenolic compounds and their hydrogen ability. Cherbal et al. [81] reported that a strong correlation exists between the total phenolic content and the antioxidant properties of *P. lentiscus* extract, indicating that the phenol compounds play an important role in the beneficial effects of these medicinal plant. Plants containing flavonoids have been reported to possess strong antioxidant activities [82]. Higher total phenol and flavonoid contents lead to better radical scavenging activity [83]. Phenolic compounds and flavonoids have been reported to be associated with antioxidant action in biological systems, mainly due to their red-ox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides [84].

The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. It was found that in general, the reducing power of the berries ethanolic extract was higher than that of the standard BHT, giving an indication in the potential higher antioxidant activity of the extract. Earlier study revealed the antioxidant activity of reduction power of *P. atlantica* fruit extract with an  $IC_{50}$  of  $0.13 \pm 0.001$  mg/ml [70]. Also in another recent study conducted by Zitouni et al. [33] reported that the  $IC_{50}$  of *P. lentiscus* fruit metnanolic extract was  $0.666 \pm 0.035$  mg/ml. Our results are in agreement with those of Atmani et al. [51], Djidel et al. [85] and Atmani et al. [86], which showed that *P. lentiscus* exhibited a great reducing power. Benhammou et al. [87] noted that the both extracts of *P. lentiscus* and *P. atlantica* leaves were characterized by a high reduction power. Reducing power may be due to the presence of polyphenols, which can donate electrons and scavenge free radicals by converting them into more stable products and can terminate the radical chain reaction [88]. The reducing power of the extract is an indicator of its antioxidant properties [89].

## 5. Conclusion

The phytochemical tests performed on the berries of *P. lentiscus* shows the presence of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, leucoanthocyanins, phlobotannins, tanins, saponins, terpenoids, proteins and mucilage while alkaloids, quinones and carotenoids are absents. The present study revealed that the *P. lentiscus* berries extract was found to contain a high amount of total phenols, flavonoids. In the present study, we concluded that the ethanolic extract of *P. lentiscus* is a potential source of natural antioxidants to react against free radicals such as DPPH, ABTS and reduction power. This activity of the extract may be due to the total polyphenolic contents present in it. The phytochemical profile results showed that the plant extract has molecules with high potential for the development of new drugs with application in the treatment and prevention of various diseases. On the whole, it is interesting to note that the studied plants have, in fact, properties that may suggest applications in pharmaceutical industry and food. Our results also suggest that inclusion of antioxidant rich extract of *P. lentiscus* as a dietary supplementary has beneficial effects for human health. The data of the current work appear useful for further research aiming to chemically identify the specific compounds responsible for the antioxidant activities of *P. lentiscus*, further works are necessary to explore this medicinal plant in terms of isolation of this compound. *In vivo* antioxidant activity, anti-inflammatory activity and anticancer activity studies are also necessary.

## Conflict of interest

None to report.

## References

- [1] Cheurfa M, Allem R. Study of hypocholesterolemic activity of Algerian Pistacia lentiscus leaves extracts *in vivo*. Rev Bras Farmacogn. 2015;25(2):142-44. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.02.011
- [2] Abe AE, de Oliveira CE, Dalboni TM, Chagas-Paula DA, Rocha BA, de Oliveira RB, Gasparoto TH, Da Costa FB, Campanelli AP. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from Tithonia diversifolia trigger different effects on human neutrophils. Rev Bras Farmacogn. 2015;25(2):111-16.
- [3] Mehenni C, Atmani-Kilani D, Dumarçay S, Perrin D, Gérardin P, Atmani D. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. J Food Drug Anal. 2016;24(3):653-69. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.03.002
- [4] Lemouchi R, Selles C, Medjdoub H, Tabti B. Assessment of possible efficacy of aqueous leaves extract of Psoralea bituminosa L. for anti-hyperglycaemic activity. Asian Pac J Trop Dis. 2015;5(7):575-8.
- [5] Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca. J Ethnopharmacol. 2002;83(1-2):135-8.
- [6] Morita M, Naito Y, Yoshikawa T, Niki E. Antioxidant capacity of blueberry extracts: Peroxyl radical scavenging and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants. J Berry Res. 2017;7:1-9. DOI:10.3233/JBR-170152

- [7] Pissard A, Lateur M, Baeten V, Magein H, Dupont P, Tabart J, Kevers C, Pincemail J. Determination of total phenolic compound content and antioxidant activity in cherry species and cultivars. *J Berry Res.* 2016;6(1):81-91. DOI:10.3233/JBR-150109
- [8] Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem Toxicol.* 2015;75:58-70. DOI: 10.1016/j.foct.2014.11.004
- [9] Oh YS. Bioactive compounds and their neuroprotective effects in diabetic complications. *Nutrients.* 2016;8(8):472. DOI: 10.3390/nu8080472
- [10] Rawani A, Pal S, Chandra G. Evaluation of antimicrobial properties of four plants extracts against human pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1:S71-5.
- [11] Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1992;35(3):275-83. DOI:10.1016/0378-8741(92)90025-M
- [12] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215(2):213-9.
- [13] Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry as a health promoter: An evidence based review. *Food Funct.* 2015;6(5):1386-98. DOI: 10.1039/c5fo00147a
- [14] Grice HC. Safety evaluation of butylatedhydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food Chem Toxicol.* 1986;24(10-11):1127-30.
- [15] Wichi HP. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol.* 1988;26:717-23.
- [16] Willcox JK, Ash SL, George L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44:275-95. DOI: 10.1080/10408690490468489
- [17] Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th edition, Oxford University Press, Oxford, UK; 2007.
- [18] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004;74:2157-84. DOI:10.1016/j.lfs.2003.09.047
- [19] André C, Castanheira I, Cruz JM, Paseiro P, Sanches-Silva A. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2010;21:229-46. DOI:10.1016/j.tifs.2009.12.003
- [20] Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Ghosh A, Chandra G. Antibacterial activities of some plants extracts used in Indian traditional folk medicine. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1:S165-9.
- [21] Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T and Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: Evolving translational strategies. *Crit Care Med.* 2009;37(5):1777-86. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31819ff137
- [22] Abdelwahed A, Bouhlela I, Skandrani I, Valenti K, Kadrid M, Guiraud P, Steimand R, Mariotte AM, Ghedira K, Laporte F, Dijoux-Franca MG, Chekir-Ghedira L. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chem Biol Interact.* 2007;165(1):1-13. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.10.003
- [23] Amhamdi H, Aouinti F, Wathelet JP, Elbachiri A. Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec Nat Prod.* 2009;3(2):90-5.
- [24] Charef M, Yousfi M, Saidi M, Stoccker P. Determination of the fatty acid composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc.* 2008;85:921-4.
- [25] Castola V, Bighelli A, Casanova J. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem Systematic Ecol.* 2000;28:79-88.
- [26] Duru ME, Cakir A, Kordali S, Zengin H, Harmandar M, Izumi S, Hirata T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *FIT.* 2013;74:170-6.
- [27] Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal.* 2002;13(2):79-86.
- [28] Dob T, Dahmane D, Chelghoum C. Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *J Essent Oil Res.* 2006;18(3):335-8.
- [29] Bampouli A, Kyriakopoulou K, Papaefstathiou G, Louli V, Krokida M, Magoulas K. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2014;1:81-91.
- [30] Beghlal D, Cherif HS, Boubekeur S, Rebiai N, Chaouia C, Beghlal K, Zeghdaoui AH, Terkmane C, El Bairi K. Antioxidant activity, total phenolic content and chemical composition of *Pistacia lentiscus* (L.) from Algeria. *J Chem Pharm Res.* 2015;7:621-32.
- [31] Aouinti F, Zidane H, Tahri M, Wathelet JP, El Bachiri A. Chemical composition, mineral contents and antioxidant activity of fruits of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *J Mater Environ Sci.* 2014;5(1):199-206.
- [32] Remilaa S, Atmani-Kilani D, Delemasure S, Connat JL, Azib L, Richard T, Atmani D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med.* 2015;7:274-86. DOI:10.1016/j.eujim.2015.03.009

- [33] Zitouni A, Belyagoubi-Benhammou N, Ghembaza N, Toul F, Atik-Bekkara F. Assessment of phytochemical composition and antioxidant properties of extracts from the leaf, stem, fruit and root of *Pistacia lentiscus* L. *Int J Pharmacognosy and Phytochem Res.* 2016;8(4):627-633.
- [34] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II. Ed. CNRS, Paris; 1963.
- [35] Singleton VL, Ortofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology.* Orlando. Academic Press; 1999;152-78.
- [36] Lamaison JLC, Carnet A. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 1990;65:315-20.
- [37] Hazzit M, Baaliouamer A, Verssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chem.* 2009;116:714-21.
- [38] Cavar S, Maksimovic M, Vidic D, Paric A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind Crop Prod.* 2012;37:479-85.
- [39] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr.* 1986;44:307-15.
- [40] Nain P, Saini V, Sharma S. *In-vitro* antibacterial and antioxidant activity of *Emblia officinalis* leaves extract, *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4:385-9.
- [41] Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SMB, Namjooyan F. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf, Iran *J Pharm Res.* 2014;13:163-170.
- [42] Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J Taibah Univ Sci.* 2015;9:449-54.
- [43] Nickavar B, Kamalinejad M, Izadpanah H. In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pak J Pharm Sci.* 2007;20:291-4.
- [44] Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Phytochemical assessment and antioxidant activities of alcoholic and aqueous extracts of *Acacia mearnsii* de wild. *Int J Pharm.* 2011;7:856-61. DOI: 10.3923/ijp.2011.856.861
- [45] Arab K, Bouchenak O, Yahiaoui K. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus*L. *J Fundam Appl Sc.* 2014;6(1):79-93. DOI:10.4314/jfas.v6i1.7
- [46] Bhourri W, Derbel S, Skandrani I, Boubaker J, Bouhleb I, Sghaier MB, Kilani S, Mariotte AM, Dijoux-Franca MG, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:509-15. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.06.024
- [47] Kawashty SA, Mosharrafa SAM, El-Gibali M, Saleh NA. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochem Syst Eco.* 2000;28:915-7.
- [48] Sanchez-moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 2002;8:121-37.
- [49] Zahin M, Farrukh A, Iqbal A. The *in vitro* Antioxidant activity and total phenolic content of four Indian medicinal plants. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2009;1(1):88-95.
- [50] Longo L, Scardino A, Vasapollo G. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L. *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innov. Food Sci Emerg Tech.* 2007;8(3):360-364. DOI:10.1016/j.ifset.2007.03.010
- [51] Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.* 2009;112:303-9.
- [52] Hamad HH, Ibrahim HH, Mariam HG, Mojahidul I. Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plant growing in Al Jabal Al Akhdar. *J Nat Prod Plant Resour.* 2011;1(1):15-23.
- [53] Tomaino A, Martorana M, Arcoraci T, Moteleone T, Giovinnazzo C, Saija A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochim.* 2010;92:1115-22.
- [54] Bellomo MG, Fallico B. Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. *J Food Compos Anal.* 2007;20:352-9.
- [55] Wu X, Prior L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):3101-13. DOI: 10.1021/jf0478861
- [56] Parajuli S, Pun NT, Parajuli S, Jamarakatell-Pandit N. Antioxidant activity, total phenol and flavonoid contents in some selected medicinal plants of Nepal. *JHAS.* 2012;2(1):27-31.
- [57] Botsaris G, Orphanides A, Yiannakou E, Gekas V, Goulas V. Antioxidant and antimicrobial effects of *Pistacia lentiscus* L. extracts in pork sausages. *Food Technol Biotechnol.* 2015;53(4):472-8. DOI: 10.17113/ftb.53.04.15.4051
- [58] Abeywickrama G, Debnath SC, Ambigaipalan P, Shahid F. Phenolics of selected cranberry genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their antioxidant efficacy. *J Agric Food Chem.* 2016;64(49):9342-51. DOI:10.1021/acs.jafc.6b04291

- [59] Huang WY, Zhang Hc, Liu WX, Li CY. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13(2):94-102. DOI: 10.1631/jzus.B1100137
- [60] Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem*. 2005;53(20):7749-59. DOI:10.1021/jf051513y
- [61] Geetha S, Sai-Ram M, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2003;87(2-3):247-51.
- [62] Shimoi k, Masuda S, Shen B, Furugori M, Kinae N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res*. 1996;350(1):153-61.
- [63] Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids: A review. *Biomed Pharmacother*. 2010;56(6):296-301.
- [64] Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J Food Sci*. 2010;75:H212-7. DOI:10.1111/j.1750-3841.2010.01755.x
- [65] Tulio AZ Jr, Jablonski JE, Jackson LS, Chang C, Edirisinghe I, Burton-Freeman B. Phenolic composition, antioxidant properties, and endothelial cell function of red and white cranberry fruits. *Food Chem*. 2014;157:540-52. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.047
- [66] Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(1):131-42. DOI: 10.1211/002235702559
- [67] Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, Bora U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*. 2008;41:1-15. DOI:10.1016/j.foodres.2007.10.001
- [68] Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Rev Int*. 2008;24(4):392-415. DOI: 10.1080/87559120802304269
- [69] Naik GH, Priyadarsini KI, Satav JG, Banavalikar MM, Sohoni PP, Biyani MK, Mohan H. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochem*. 2003;63(1):97-104.
- [70] Belyagoubi-Benhammou N, Belyagoubi L, El Zerey-Belaskri A, Atik-Bekkara F. In vitro antioxidant properties of flavonoid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* fruit using five techniques. *J Mater Environ Sci*. 2014;6(4):1118-25.
- [71] Al-Rimawi F, Abu-Lafi S, Abbadi J, Alamarneh AAA, Sawahreh RA, Odeh I. Analysis of phenolic and flavonoids of wild Ephedra alata PLANT extracts by lc/pda and lc/ms and their antioxidant activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017;14(2):130-41. DOI: 10.21010/ajtcam.v14i2.14
- [72] Al-Rimawi F, Rishmawi S, Ariqat SH, Khalid MF, Warad I, Salah Z. Anticancer activity, antioxidant activity, and phenolic and flavonoids content of wild tragopogon porrifolius plant extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:1-7. DOI: 10.1155/2016/9612490
- [73] Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun*. 2009;4(6):819-24.
- [74] Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:223S-9S.
- [75] Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem*. 1998;46(5):1887-92. DOI: 10.1021/jf970975b
- [76] Shariffar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem*. 2009;112(4):885-8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.064
- [77] Kumar S, Sandhir R, Ojha S. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Res Notes*. 2014;7:560. DOI: 10.1186/1756-0500-7-560
- [78] Fidrianny I, Rahmiyani I, Komar RW. Antioxidant capacities from various leaves extracts of four varieties mangoes using DPPH, ABTS assays and correlation with total phenolic, flavonoid, carotenoid. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5:189-94.
- [79] Hatamnia AA, Abbaspour N, Darvishzadeh R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chem*. 2014;145:306-11. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.031
- [80] Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami SH. Anti-inflammatory and antioxidant activities of gum mastic. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010;14:765-9.
- [81] Cherbal A, Kebeiche M, Madani K, El-Adawi H. Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algerian *Pistacia lentiscus*. *Asian J Plant Sci*. 2012;11:131-6. DOI: 10.3923/ajps.2012.131.136
- [82] Soares JR, Dins TC, Cunha AP, Almeida LM. Anti-oxidants activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic Res*. 1997;26:469-78.
- [83] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem*. 2005;53:1841-56.
- [84] Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5165-70.
- [85] Djidel S, Khennouf S, Ameni D, Baghiani A, Arrar L, Charef N. Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Phcog Commn*. 2013;3:28-34.

- [86] Atmani D, Chaher N, Ayouni K, Berboucha M. Antioxidant capacity of *Pistacia lentiscus* and *Fraxinus angustifolia* extracts and their fractions. *Planta Med.* 2011;7:1407. DOI: 10.1055/s-0031-1282788
- [87] Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova Panovska T. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharma col.* 2008;2:22-8.
- [88] Rajamanikandan S, Sindhu T, Durgapriya D, Sophia D, Ragavendran P, Gopalakrishnan VK. Radical scavenging activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by *in vitro* assays. *Ind J Pharm Educ Res.* 2011;45:310-16.
- [89] Mier S, Kaner J, Akiri B, Hadas SP. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem.* 1995;43:1813-7.

AUTHOR COPY



# Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of *Pistacia lentiscus* using ultrasonic pretreatment



Djamila Belhachat<sup>a,\*</sup>, Lakhdar Mekimene<sup>a</sup>, Messaouda Belhachat<sup>b</sup>, Ali Ferradji<sup>a</sup>, Fatiha Aid<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Département de Technologie Alimentaire, École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El-Harrach, Algiers, Algeria

<sup>b</sup> East China Normal University, Shanghai, China

<sup>c</sup> Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediene (USTHB), BP 32, El Alia Bab Ezzouar, 16111, Algiers, Algeria

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Berries  
Optimization  
Essential oil  
Box Behnken design  
Response surface methodology (RSM)

## ABSTRACT

*Pistacia lentiscus* is one of the medicinal plants that is traditionally used to cure several diseases such as asthma or burns. The present work focuses on the application of the ultrasound as pretreatment to extract essential oil from the ripe berries of this plant using the hydrodistillation process. The objective of this study was to extract essential oil from the ripe berries of this plant and optimize the extraction parameters using the Response Surface Methodology (RSM). Design Expert 9.0.6 was used to design the experiments based on the Box-Behnken Design with three parameters, namely extraction time, ultrasonic power and plant material to water ratio. The ranges of the examined independent variables (factors), i.e. the extraction time (30.60–90 h), ultrasonic power (20–60 W) and plant material to water ratio of (1:4–1:12 g dry berries per ml water) were identified by preliminary experiments. The antioxidant activity of the essential oil of *P. lentiscus* ripe berries was measured by different chemical assays: 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity and reducing power. The butylated hydroxytoluene (BHT) was used as positive control. The experimental data obtained from a 17 run experiment were fitted to a second-order polynomial equation. The optimal conditions were determined by the 3D response surface and the contour plots derived from the models. Results showed that the extraction time, the ultrasonic power and the plant material to water ratio have significant effect ( $p < 0.001$ ) on the yield extraction of the essential oil. The optimum extraction conditions were found to be extraction time of 60 min, ultrasonic power of 60 W and solid-liquid ratio of 1 g: 12 ml. Under the optimized conditions, the maximum value of essential oil recovery relative to the initial mass of ripe berries powder was  $0.66 \pm 0.03\%$ . The antioxidant activity of the essential oil evaluated by the scavenging activity of free radicals DPPH ( $\cdot$ ), ABTS ( $\cdot+$ ) and reduction power showed a moderate efficiency with  $IC_{50} = 571.22 \pm 1.40$  mg/l,  $528.87 \pm 1.65$  mg/l and  $244.24 \pm 0.41$  mg/l, respectively. The essential oil of *P. lentiscus* ripe berries can provide good alternatives to the synthetic antioxidants, to reduce the application of synthetic compounds as antioxidants because of their potential negative health effects and as a result of consumer demand for healthy products.

## 1. Introduction

The medicinal uses of the plants are attributed by the plant's secondary metabolites and are unique resources for pharmaceuticals, food additives and fine chemicals (Zhao et al., 2005). Recently, there has been a considerable interest in finding natural antioxidants from plant materials to replace synthetic ones. Data from different scientific researches show that plants contain a large variety of substances that possess an interest antioxidant activity (Galketiya et al., 2017; Khan et al., 2017). *P. lentiscus*, commonly known as “Darw” belonging to the

Anacardiaceae family grows very well in many regions in Algeria. In Algeria, the tree is widespread in forests alone or associated with other tree species such as terebinth, olives and carob, in all coastal areas up to 700 m above sea level or in seaside stony areas (Yildirim, 2012). The fruit is a drupe of 0.5 cm in diameter approximately, initially red, but becoming shiny black on maturity. It has been used since ancient times as an ingredient to aromatize olives and vinegar (Wyllie et al., 1990). The fruit, galls, resin and leaves of the *P. lentiscus* have a long tradition in folk medicine dating from the time of the ancient Egyptians and Greeks (Pellicuer et al., 1980). *P. lentiscus* is currently generating real

\* Corresponding author.

E-mail address: [djamilaina@hotmail.com](mailto:djamilaina@hotmail.com) (D. Belhachat).

interest regarding its use as a medicinal plant in Algeria. The oil of *P. lentiscus* berries has a vital interest in Algerian populations; it is used in traditional medicine for the treatment of respiratory disorders such as asthma, and to treat stomach aches, dermal burns, lombalgias and varicose veins. The mature fruits are incorporated in some culinary preparations. It has proved scientifically, in a previous study, that this oil stimulates the cicatrizing process in rabbit model (Djerrou et al., 2010). Several studies have also reported that essential oil from aerial parts of *P. lentiscus* possesses appreciable biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial (Hafse et al., 2017; Medjkane et al., 2016), antifungal (Barra et al., 2007; Kordali et al., 2003), antiatherogenic activities (Dedoussis et al., 2004), herbicidal (Amri et al., 2012), hepatoprotective and antidiabetic effects (Mehenni et al., 2016). The antioxidant activity of leaf essential oil of *P. lentiscus* has been widely investigated (Hamiani et al., 2016; Bachrouch et al., 2013). Conversely, few studies relative to the antioxidant activity of fruit essential oil of *P. lentiscus* have been reported (Aouinti et al., 2014). The extraction of essential oils from plants has been the subject of great research interest due to their potential uses in a variety of applications, including food preservatives, pharmaceutical medicines, and cosmetics. Essential oils derived from aromatic plants have many biological activities, they exhibit antioxidant, antibacterial, antifungal, insecticidal, antinflammatory and allelopathic activity, several researches have proved these activities (Tavallali et al., 2017; Stappen et al., 2015; Ayvaz et al., 2010; Azirak and Karaman, 2008). However, the content of essential oil in raw plant material is low and rarely exceeds a few percent. For this reason, a method of extraction that allows the isolation of possibly the whole content of oil from the raw materials without changing its composition is being sought (Kowalski and Wawrzykowski, 2009). Several methods are used to extract essential oils from medicinal plants such as; steam distillation, hydrodistillation, percolation, microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction. Ultrasound-assisted extraction (UAE) has been recognized for potential industrial application in the phyto-pharmaceutical extraction industry for a wide range of herbal extracts (Salehan et al., 2016). Today, ultrasound assisted extraction method, due to its higher efficiency and lower energy and water consumption, has become an appropriate alternative to the conventional extraction methods and an approved method in processing plant substances, especially compounds with low molecular weight (Rodrigues and Gustavo, 2007) and this additive effect of ultrasound waves in the rate of extracting plant substances are related to the breaking cells and releasing their contents to the extraction environment (Lingyun et al., 2007). The sono-assisted extraction has been applied by several researchers to improve the extraction yield and shorten the extraction time (Hashemi et al., 2016; Morsy, 2015; Pingret et al., 2014; Sereshiti et al., 2012; Périno-Issartier et al., 2013; Kowalski and Wawrzykowski, 2009). The aim of an extraction process should be to provide for the maximum yield of substances and of the highest quality which consist of high concentration of target compounds and antioxidant power of the extracts (Spingo and Faveri, 2009). In any extraction method, the extraction parameters have significant effects on the extract yields. There are two most commonly used optimization studies, the classical single factor experiments and the response-surface methodology (RSM). The optimization of extraction parameters is generally carried out with a classical optimization technique in which one variable is changed at a time while the other variables are kept constant (Kannan et al., 2004). The use of the single factor experiments, despite being having some drawbacks, such as time-consuming, expensive, possible interaction effects between variables cannot be evaluated and misleading conclusions may be drawn, also this classical optimization requires a large amount of material (Bas and Boyaci, 2007; Bezerra et al., 2008). The experimental design can be used for optimizing operational conditions for the multivariable system (Montgomery, 2001) and the interaction between variables would be considered too (Khajvand et al., 2011). The number of experiment's runs would be reduced by statistical design of

experiments (Khajvand et al., 2011; Lu et al., 2009). RSM has important applications in the design, analysis and optimization of existing products and unit operations, its use decreasing thus the volume of experiments, reagents, time, financial input, energy, among others (Montgomery, 2009). In recent years, RSM has been extensively applied for the optimization of multiple variables in many bioprocesses and showed satisfactory results (Tanyildizi et al., 2005; Tilay et al., 2010), it is widely used in agriculture, biology, food, chemistry, and other fields (Velu et al., 2017; Chotphruethipong et al., 2017; Ashengroph et al., 2013). The main objective of RSM is to simultaneously optimize the levels of these variables, determine the optimum operational conditions to obtain the desirable response (Bezerra et al., 2008). Box-Behnken design (BBD) is one of the most common RSM tools, which has been widely used by researchers for optimization of experimental trials. It is more efficient to conduct experiments using a BBD over traditional methods because it simplifies the complexity of the experimental trials needed to evaluate multiple variables and their interactions (Wang et al., 2014). Response surface methodology (RSM) has been widely investigated to analyze and optimize parameters influencing the Ultrasound assisted extraction (UAE) yield or extract profiles of bioactive components of plants (Fuad et al., 2016; Kong et al., 2014; Hemwimol et al., 2006; Alzorqi et al., 2017; Liu et al., 2015; Jennan et al., 2015). To the best of our knowledge, until date no studies have been reported the application of RSM to the extraction yield of essential oil from *P. lentiscus* berries using ultrasound as pretreatment. A Box-Behnken central composite design (CCD) was employed to study the influence of extraction time, ultrasonic power and plant material to water ratio on the extraction yield of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries and to optimize the extraction conditions. The antioxidant activity of essential oil was also investigated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The ripe (black) berries of *P. lentiscus* were collected from natural stands in December 2014 in Bouira region, Algeria. The plant material identification was carried out according to the new flora of Algeria (Quezel et Santa, 1963). The *P. lentiscus* ripe berries were dried at room temperature. After drying, the aerial part was ground with a coffee grinder to obtain a fine powder and stored in paper bags at 4 °C until their use.

### 2.2. Ultrasound assisted extraction (UAE) of essential oil

About 100 g of the powdered sample was weighed and placed in 4 flasks, each one containing 25 g of plant and mixed with 20 ml of distilled water. The mixture was subjected to ultrasonic radiation using ultrasound bath (Transonic TI-H Fisher bioblock), following different power (20, 40, 60 W), constant frequency 25 kHz and temperature of 25 °C at 15 min was used. Ultrasonic pretreatment was used as a preliminary extraction step in the extraction process of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries. After ultrasonic pretreatment, the mixture transferred to round-bottom flask containing different volumes of water, the extraction was carried out using three ratio of plant material to water of (1:4, 1:8 and 1:12), the flask was set in a Clevenger apparatus where the hydro distillation was carried out at 100 °C for (60, 90 and 120 min). Finally, to remove water, the extracted essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), weighed and stored in amber vials at 4 °C until they were used for analysis. Data of the oil volumes achieved were re-calculated with regard to the initial weight of *P. lentiscus* herb subjected to the distillation process. All experiments were done in triplicates and results were expressed on the basis of dry matter weight.

**Table 1**  
Uncoded and coded independent variables used in RSM design for optimization studies.

Independent variables	Coded levels		
	-1	0	+1
Extraction time (A, min)	30	60	90
Ultrasonic power (B, w)	20	40	60
Plant material to water ratio (C, g:ml)	1/4	1/8	1/12

### 2.3. Experimental design for response surface methodology (RSM) and statistical analysis

Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the process variables which influence extraction yield, three variables were chosen: extraction time A (30, 60 and 90 min), the ultrasonic power B (20, 40 and 60 W) and solid liquid ratio C (1:4, 1:8 and 1:12 g: ml) to achieve the highest extraction yield of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries. The extraction conditions of *P. lentiscus* berries were optimized using a Box-Behnken Design (BBD) (Ferreira et al., 2007). From preliminary experiments the range for each independent variable was selected. Each parameter was tested at three levels coded as (-1) for lower level, (+1) for higher level, and a central coded value considered as zero (0) as it is depicted in Table 1. A central composite design (CCD) with axial points was used for designing the experimental data. This generated 17 treatments with 5 replications at the center points (0, 0, 0) to estimate the pure error. The dependent variable chosen as response was extraction yield (Y, %). The coded and uncoded levels of different process variables used for optimization are indicated in Table 1.

A second-order polynomial equation was used to fit the experimental data of the studied variables. The generalized second-order polynomial model used in the response surface analysis is shown in Eq. (1):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

Where Y is the response (extraction yield) and  $b_0, b_{12} \dots b_{23}$ , are constant coefficients of intercept, linear, quadratic, and interaction terms.  $X_1$ – $X_3$  are coded independent variables. Design Expert software (version 9.0.6.2) was used for experimental design analysis and data processing. The different operating conditions of the experiments carried out in this study are presented in Table 2.

### 2.4. Antioxidant activity

In this study, the antioxidant potential of the essential oil of *P. lentiscus* ripe berries was measured by different chemical assays: DPPH radical scavenging activity, ABTS test and reduction power assay. We compared the antioxidant capacity of the essential oil with BHT as reference.

#### 2.4.1. DPPH assay

The antiradical activity of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries was determined using the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) (Hazzit et al., 2009). The essential oils were dissolved in methanol to obtain various concentrations (50, 100, 200, 500, 1000, 1500 and 2000 mg/l). 25  $\mu$ L of various concentrations of the samples in methanol were added to 975  $\mu$ L of methanolic solution containing DPPH radicals (60  $\mu$ M) while (BHT) acted as a positive control, the absorbance of DPPH· radical solution without sample was measured as blank. All test tubes were incubated in a dark place at room temperature for 30 min. Then the absorbance was measured at 517 nm. All determinations were carried out in triplicates. The disappearance of

**Table 2**  
Experimental points of the Box Benken design and the experimental data.

Run	Extraction time (A)	Ultrasonic power (B)	Plant material to water ratio (C)	Extraction yield (%)
1	-1	0	1	0.52 $\pm$ 0.01
2	0	1	1	0.66 $\pm$ 0.03
3	0	0	0	0.61 $\pm$ 0.01
4	-1	0	-1	0.44 $\pm$ 0.02
5	-1	-1	0	0.41 $\pm$ 0.01
6	1	1	0	0.64 $\pm$ 0.03
7	0	0	0	0.61 $\pm$ 0.02
8	1	-1	0	0.58 $\pm$ 0.05
9	0	0	0	0.62 $\pm$ 0.02
10	-1	1	0	0.55 $\pm$ 0.03
11	0	1	-1	0.57 $\pm$ 0.04
12	0	-1	1	0.54 $\pm$ 0.02
13	0	0	0	0.6 $\pm$ 0.04
14	1	0	1	0.63 $\pm$ 0.03
15	1	0	-1	0.59 $\pm$ 0.02
16	0	-1	-1	0.51 $\pm$ 0.01
17	0	0	0	0.61 $\pm$ 0.02

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation of three different experiments.

DPPH· was recorded and the percentage of inhibition of the DPPH· radical by sample is calculated as follows:

$$\text{Inhibition Percentage} = [(A_b - A_s)/A_b] \times 100$$

Where  $A_b$  is the absorbance of blank and  $A_s$  is the absorbance of positive control or sample. Essential oil concentration providing 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) was calculated from the graph plotting inhibition percentage against essential oil concentration.

#### 2.4.2. ABTS· + Free radical scavenging activity

The ABTS method is based on the reduction of the green ABTS radical cation (7.00 mM) that was obtained by its oxidation with equal volume of potassium persulfate (2.45 mM) (Cavar et al., 2008), for 12–16 h at 4 °C in the dark. ABTS· + solution was diluted with ethanol to absorbance of  $1.00 \pm 0.02$  at 734 nm. Then, 25  $\mu$ L of the essential oil dilutions was mixed with 1 ml ABTS<sup>+</sup> solution, the absorbance of reaction mixture was measured after 7 min at 734 nm. Tests were carried out in triplicate. ABTS· + solution was used as blank sample, and BHT was used as positive control. As for the DPPH assay, ABTS scavenging ability was expressed as  $IC_{50}$  mg/l. The values of  $IC_{50}$  were determined as reported above. The inhibition percentage of ABTS radical was calculated using the following formula:

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100,$$

Where  $A_0$  is the absorbance of the control, and  $A_1$  is the absorbance of the sample.

#### 2.4.3. Reducing power assay

The reducing power was determined according to the method of Oyaizu (1986). 0.125 ml of different concentrations of tested samples and BHT at different concentrations were mixed with 2.5 ml of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH = 6.6), and 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Then, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture which was centrifuged for 10 min at  $1500 \times g$ . The upper layer (2.5 ml) was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% ferric chloride. The absorbance was measured at 700 nm. Blank absorbance was read by replacing sample by methanol. BHT was used as a positive control. The reducing power increases with the increase of absorbance. All determinations were carried out in triplicates. A higher absorbance indicates a higher reducing power.  $IC_{50}$  value mg/l is the effective concentration giving an absorbance of 0.5 for reducing power and was obtained from linear regression analysis.

**Table 3**  
Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model.

Source	Regression coefficients	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.61	0.074	9	0.00824	174.80	< 0.0001	Significant
A-Extraction time	0.065	0.034	1	0.034	716.97	< 0.0001	
B-Ultrasonic power	0.048	0.018	1	0.018	382.88	< 0.0001	
C-Plant material to water ratio	0.030	0.007.2	1	0.0072	152.73	< 0.0001	
AB	-0.020	0.0016	1	0.0016	33.94	0.0006	
AC	-0.01	0.0004	1	0.0004	8.48	0.0226	
BC	0.015	0.0009	1	0.0009	19.09	0.0033	
A <sup>2</sup>	-0.044	0.008152	1	0.008152	172.91	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	-0.019	0.00152	1	0.00152	32.24	0.0008	
C <sup>2</sup>	-0.019	0.00152	1	0.00152	32.24	0.0008	
Residual		0.00033	7	0.000047			
Lack of Fit		0.00005	3	0.000016	0.24	0.8660	Not significant
Pure Error		0.00028	4	0.00007			
Cor Total		0.074	16				
Std. Dev.		0.006866		R-Squared	0.9956		
Mean		0.57		Adj R-Squared	0.9899		
C.V. %		1.21		Pred R-Squared	0.9834		
PRESS		0.001238		Adeq Precision	47.474		

#### 2.4.4. Statistical analysis

All the data were analyzed and expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three separate determinations ( $n = 3$ ). The statistical analysis was carried out by using Microsoft Excel program.

### 3. Results and discussion

Coded experiments, response obtained for each run of the central composite design, effect of extraction time (A), ultrasonic power (B) and plant material to water ratio (C) on the experimental value for yield of essential oil extraction (response) were studied. The experimental values for response (extraction yield %) under different combinations of extraction conditions were shown in Table 2. The response varied widely as a function of parameter settings of the experiments (from  $0.41 \pm 0.01$ – $0.66 \pm 0.01\%$  (v/w) (g of absolute per 100 g of plant dry matter). Experiment number 2 had the highest yield of essential oil, whereas the lowest yield was found in experiment number 5. The results obtained following the experimental design are grouped in Table 3.

#### 3.1. Fitting the response surface model

Response surface methodology approach was used to determine the optimum extraction process parameters that yield higher essential oil from *P. lentiscus* ripe berries. The response variable could be expressed in terms of uncoded levels according to the quadratic polynomial equation as follows:

$$Y = 0.61 + 0.065*A + 0.048*B + 0.030*C - 0.020*AB - 0.01*AC + 0.015*BC - 0.044A^2 - 0.019*B^2 - 0.019*C^2 \quad (2)$$

Where Y extraction yield of *P. lentiscus* berries essential oil (expressed in g per 100 g of dry weight) (%), A extraction time (min); B ultrasonic power (W); C plant material to water ratio (g: ml).

The sign and magnitude of the coefficients allows interpreting the effect of the variable on the response. The negative sign of coefficient indicates that when the level of the variable increases the response decreases, while the positive sign indicates an increase in the response. The quadratic model indicated that the linear variables A–C and BC demonstrated positive effects on the extraction yield, whereas the, the quadratic variables A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> and the variable interactions AB, AC, showed negative effects.

#### 3.2. Analysis of variance (ANOVA) evaluation

From the *P* value of each model term, it could be concluded that the

independent variables studied; linear effects of the three variables (A–C) and the quadratic effect of extraction time (A<sup>2</sup>) appear to be highly significant. The quadratic effects of the ultrasonic power (B<sup>2</sup>), and plant material to water ratio (C<sup>2</sup>), the variable interactions AB, AC and BC were also significant but less important than the linear ones. It could be seen from Table 3 that the *P* value of extraction yield for lack-of-fit were ( $P > 0.05$ ).

Results on this study shows that the coefficient of determination R<sup>2</sup> was 0.9956 for the regressed model predicting the extraction yield, This implies that the sample variation of 99.56% could be attributed to the independent variables and the model did not explain only 0.44% of the total variations, thus ensuring a close agreement of the fitting of the regression models to the experimental data. A high R<sup>2</sup> indicates that the variation could be accounted by the data satisfactorily for fitting the model. The predicted model seemed to reasonably represent the observed values. Thus, the response was sufficiently explained by the model. R<sup>2</sup> is not considered as the main point to imply the accuracy of the model, because in addition of the variable to the model will increase the value of R<sup>2</sup>. Due to this matter, adj-R<sup>2</sup> is more appropriate to evaluate the model if its value is more than 90% (Tan et al., 2012). The adjusted R<sup>2</sup> was a corrected value for R<sup>2</sup> after elimination of the unnecessary model terms. If there were many non-significant terms have been included in the model, the adjusted R<sup>2</sup> would be remarkably smaller than the R<sup>2</sup> (Chan et al., 2009). In our study, the adjusted R<sup>2</sup> was very close to their corresponding R<sup>2</sup> value (0.9899). This value indicates a high degree of correlation between observed and predicted data. High values of adjusted R<sup>2</sup> also advocated significance of the model for response. Result for Pre R2 shows value of 0.9834. All those data obtained will strengthen the accuracy of the model. The model F-value, 174.80, implied that the model was significant. The model's p-value of < 0.0001 was less than 0.05 implying that the model is significant.

Lack of fit was also given in Table 3. The “fitness” of the model was investigated through the lack-of-fit test ( $P > 0.05$ ), which indicated the suitability of models to accurately predict the variation (Prasad et al., 2011). Lack-of-fit is measuring how well the models fit the data. Base on the result in Table 3, it showed that the lack of fit with p-value (0.8660) is higher than 0.05 (non-significant), suggesting that the predicted model reasonably represent the observed values, meaning that this model was sufficiently accurate predicting the relevant response. Thus the response was sufficiently explained by the model. The coefficient of variation (CV) describes the extent to which the data are dispersed (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005). The coefficient of variation is a measure of residual variation of the data relative to the size of the mean; the small values of CV give better reproducibility. The

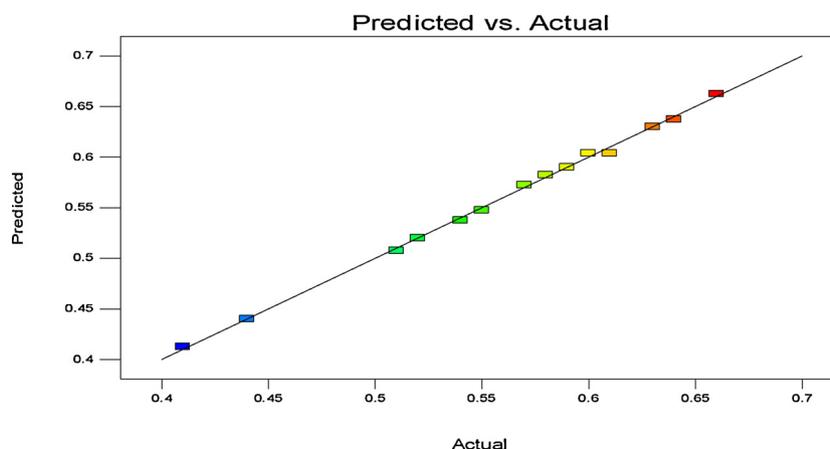


Fig. 1. Experimental extraction yield vs. the predicted extraction yield under optimum extraction conditions.

coefficient of variation (CV) of less than 10 indicated that the model was reproducible (Mason et al., 1989). The small CV indicated that the experimental results were precise and reliable (Table 3). The CV was found to be 1.21%. The Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) for the model, which is a measure of how a particular model fits each point in the design, was 0.001238. A smaller value is desired (Palmer and O'Connell, 2009; Buang et al., 2014), thus the values found in our study for this model is acceptable. Model measurement for accuracy can be achieved by adequate signal of "Adeq Precision" more than 4. Adequate precision measures the signal-to-noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable (Myers and Montgomery, 2002). For the proposed models, this value was 47.474, a very good signal-to-noise ratio. All these statistical parameters show the reliability of the models (Table 3).

### 3.3. Adequacy of the second-order polynomial models

The sufficient approximation of the second-order polynomial model can be checked by comparing experimental value and predicted data by plotting the relationship between the predicted values and the experimental values of essential oil extraction yield. The comparison of this values was performed by generating a fitted-line plot for the results obtained, showing how close it was or how far it deviated from the fitted line. As shown in Fig. 1, the experimental values were close to a straight line of the predicted values, there is in agreement between this values, the determination coefficient  $R^2$  for the essential oil yield extraction of *P. lentiscus* ripe berries was 0.9956, this result indicated that the response surface model in this study was suitable to be used for optimization of the hydro-distillation process and was adequate for predicting the yield of essential oil extraction of *P. lentiscus* ripe berries.

Data were evaluated with the aim of that the fitted model gives a qualified (normal) approximation to the actual values and shows a satisfactory fit. Unless the model shows an adequate fit, proceeding with the investigation and optimization of the fitted response surface likely give poor or misleading results (Li et al., 2004). Also, residual (difference between the observed and the predicted response value) gives poor or misleading results. In addition, the small residual value indicates that model prediction is accurate. The residuals from the least squares fit play an important role in judging model adequacy (Myers and Montgomery, 2002).

### 3.4. Response surfaces and contour plots analysis

The influence of three independent variables towards extraction yield of essential oil of *P. lentiscus* ripe berries was reported through the significant ( $p < 0.05$ ) coefficient of the second-order polynomial regression equation. The best way of expressing the effect of any parameter on the extraction yield within the experimental space under

investigation was to generate response surface plots of the equation. The relationship between independent and dependent variables was graphically represented by 3D response surface and 2D contour plots generated by the model (Fig. 2). 3D response surfaces curves in Fig. 2 demonstrated the effects of the independent variables and their mutual interactions on the extraction yield. A three dimensional response surface graph was plotted indicating the interaction effect of process variables (extraction time, ultrasonic power and plant material to water ratio) on the response (extraction yield) (Fig. 2). The contour plot was constructed to examine the interaction of independent test variables in the response. Fig. 2 depicts the contour plot of the response surface. Different shapes of the contour plots indicated different interactions between the variables, an elliptical contour plot indicated the interactions between the variables were significant while a circular contour plot means otherwise. The contour exhibited an elliptical nature, indicating the interactive effects between extraction time, ultrasonic power and plant material to water ratio. In this study, it was found that increase of extraction time (A), ultrasonic power (B) and plant material to water ration (C) resulted in an increase of essential oil yield of *P. lentiscus* ripe berries.

In this study, extraction yields of essential oil of *P. lentiscus* berries increased when the extraction time was raised. This agreed with the findings of Yingngam and Brantner (2015). The data reported by Nyabaro Obed et al. (2016) on essential oil extraction from Eucalyptus grandis leaves by Clevenger distillation showed that essential oil yields at the shorter distillation times (DT) was low and generally increased with increasing DT with the maximum yields achieved at 150 min. Increasing the extraction time gives more time for the heavier and higher boiling point constituents to diffuse out of the oil pockets in the leaves thereby increasing the yield significantly. However, reduction of essential oil yields was observed when prolonging the duration of distillation time beyond 250 min (Yingngam and Brantner, 2015), but Nyabaro Obed et al. (2016) reported that higher duration time (180 min) suffers minimum oil yields. This is due to evaporation of the oil being collected as a result of inadequate cooling time of the apparatus. The hot apparatus serve as source of heat causing the oil collected to evaporate. Several studies reported that this loss was probably due to the fact that hydro-distillation is generally not a closed system like stream distillation (Gavahian et al., 2012; Wang et al., 2009; Cannon et al., 2013). Also, it should be expected to avoid the decomposition of some heat-labile volatile substances during extraction (Zhang et al., 2012).

From the Fig. 2, it is noted that extraction yield of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries was gradually increasing with increase in the ultrasonic power. Ultrasonication Assisted Extraction (UAE) involves ultrasonic effects of acoustic cavitations. Under ultrasonic action solid and liquid particles are vibrated and accelerated and, because of that

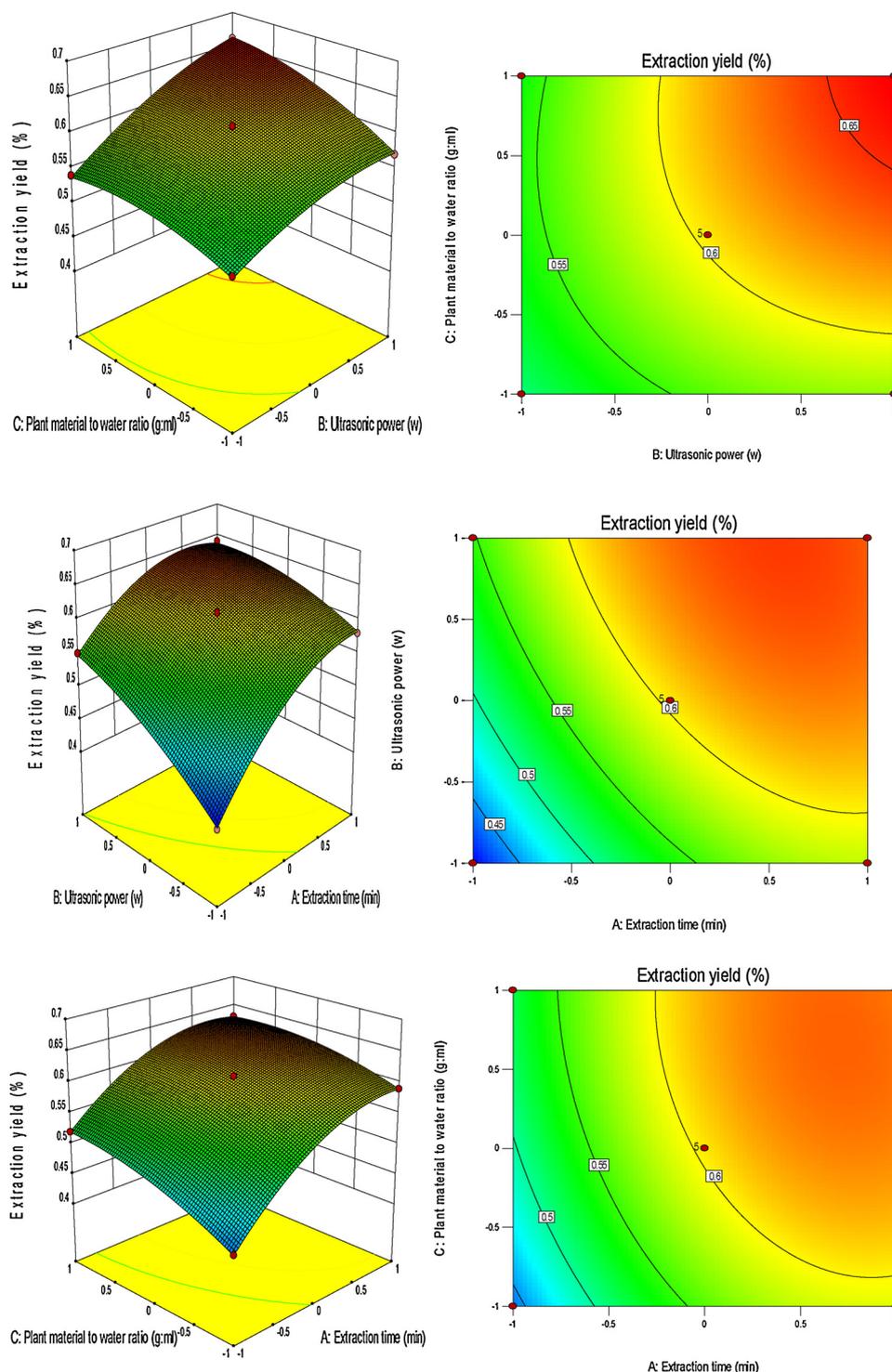


Fig. 2. Response surface and contour plots for the effect of independent variables on extraction yield of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries.

solute quickly diffuses out from solid phase to solvent (Cares et al., 2009). Several probable mechanisms for ultrasonic enhancement of extraction, such as cell disruption, improved penetration, and enhanced swelling, capillary effect, and hydration process have been proposed (Huaneng et al., 2007). As the larger amplitude ultrasonic wave travelled through a liquid medium, more bubbles were created and collapsed (Hemwimol et al., 2006). This agreed with the findings of Krishnan et al. (2015) which reported that the increase of amplitude level of sonication resulted in increase of oil yield from the Rice Bran. Similar results were obtained by Yu et al. (2012) from Pine Wood

essential oil; they reported that increase of ultrasonic power thereby enhancing the yield of the essential oil. However, when the ultrasonic power increases to a certain level, the formation of cavitation bubbles will be unprecedentedly high, which strengthens the energy dissipation between cavitation bubbles and leads to its insufficient collapse, causing reduced energy transfer efficiency and essential oil yield. The Sonication can easily destroy the external glands of plant secretory structures, therefore facilitating the release of components into the extraction solvent. Skin of external glands of plant cell wall is very thin and can be easily destroyed by sonication, and this facilitates release of

essential oil contents into the extraction solvent, thus resulting in reduced extraction time and increased extraction efficiency (Huie, 2002). Ultrasonic pretreatment has also some implications on cell disintegration and thus increasing the mass transfer. Cavitation phenomenon is produced during ultrasonication, in which due to the action of intense sound waves multiple microbubbles are produced at nucleation sites in the fluid, and then they grow and subsequently collapse (Damyeha et al., 2016).

The ratio of plant material to water was also found to have a significant effect on the essential oil yield (Fig. 2). The extraction yields of essential oil increased with increases in this parameter. Our results are in agreement with earlier reports in literature in cases of hydro-distillation and steam distillation of essential oil from other plants (Yingngam and Brantner, 2015; Ammar et al., 2010; Zhang et al., 2012). During hydro distillation process, the water role is the prevention of the thermal degradation of plant material in the solution and serves as a support for *P. lentiscus* essential oil during the evaporation process. However, the usage of large volume of solvent might lead to more energy and time being consumed to condense the extraction solution (Jeyaratnam et al., 2016). Peng et al. (2012) reported that the yield essential oil from *Zingiber cassumunar* increased to a certain point ( $\approx 0.03$  g solid/ml solvent) and subsequently started to drop when the ratio was further increased. As far as the essential oil present in the mixture is concerned, increasing the quantity of solvent will increase the concentration gradient of the interface between *Z. cassumunar* particles and the solvent (water). However, when all of the solute inside *Z. cassumunar* particles has been extracted, the quantity of solvent no longer changed the yield of the essential oil. Yingngam and Brantner (2015) reported that the amount of oil isolated from *Fagraea fragrans* Roxb flowers increased at the beginning stage, followed by a stable and slight decrease when the ratio of water to plant flowers increased higher than 12 ml/g. This was probably due to some volatile components being susceptible to hydrolysis under a high proportion of water (Zhang et al., 2012).

All factors indicated a positive effect on the extraction yield of *P. lentiscus* ripe berries essential oil. When the factor curvature is sharper, the factor effect is more important to the response. It can be seen from Eq. (2) and Table 4 that all the parameters of extraction had significant curvature effect. The steep curvature in extraction time, ultrasonic power and plant material to water ratio behavior demonstrated that the response of extraction yield of *P. lentiscus* ripe berries oil g/100 g was very rapid to these factors. In this manner, the order of positive influence of the individual terms on the obtained extraction yield response extraction time, ultrasonic power than plant material to water ratio.

### 3.5. Optimization of extraction conditions of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries

According to the results of response surface methodology, the optimal conditions to obtain the maximal extraction yield from *P. lentiscus* ripe berries  $0.66 \pm 0.03\%$  were 60 min extraction time, ultrasonic power of 60 W and a plant material to water ratio of 1 g: 12 ml.

**Table 4**

Antioxidant activity expressed in IC<sub>50</sub> (mg/l) of essential oil of *P. lentiscus* ripe berries and BHT.

Essential oil/positive control	IC <sub>50</sub> (mg/l)		
	DPPH assay	ABTS assay	Reduction power assay
<i>P. lentiscus</i> ripe berries essential oil	571.22 ± 1.40	528.87 ± 1.65	244.24 ± 0.41
BHT	28.24 ± 0.20	5.81 ± 0.01	64.14 ± 0.14

Results are given as mean ± standard deviation of three different experiments.

### 3.6. Antioxidant activity of essential oil of *P. lentiscus* ripe berries

#### 3.6.1. DPPH assay

The scavenging activity assayed herein on DPPH radicals is shown in Table 4. The IC<sub>50</sub> values of EO and BHT were estimated at  $571.22 \pm 1.40$  and  $28.24 \pm 0.20$  mg/l respectively, indicating that the DPPH radicals scavenging activity of BHT was much higher than that of EO. For EO and BHT, they showed a concentration-dependent scavenging of the DPPH radicals at some concentrations. There was a reduction in the concentration of DPPH due to the scavenging effect of the essential oil and BHT. The DPPH is decolorized by accepting an electron donated by an antioxidant. The increases in concentration of antioxidants are linked to increasing the scavenging of DPPH. Aouinti et al. (2014) reported that the IC<sub>50</sub> values of the *P. lentiscus* essential oils fruits and leaves from Saidia (Morocco) was 27.65 and 23.79 µg/ml respectively of fruits and leaves essential oil in the DPPH assay. The antioxidant activity of the essential oil was generally ascribed to the terpenes (Hamiani et al., 2016).

#### 3.6.2. ABTS assay

The scavenging activity of EO of *P. lentiscus* ripe berries and BHT on ABTS radicals is shown in Table 4. The profile of scavenging activity of EO on ABTS was similar to the result of the scavenging activity on DPPH radicals with somewhat differently, the IC<sub>50</sub> values on scavenging ABTS radicals  $528.87 \pm 1.65$  and  $5.81 \pm 0.01$  mg/ml for EO and BHT, respectively, the scavenging activity of BHT was significantly higher than that of EO. A higher ABTS radical-scavenging activity is associated with a lower IC<sub>50</sub> values. Similarly, ABTS radicals scavenging activity of EO and BHT increased dose-dependently at concentrations, which may be attributable to its hydrogen-donating ability. In this study, the antioxidant activity of *P. lentiscus* ripe berries essential oil was less efficient than that of positive control (BHT). As far as our literature survey could ascertain, ABTS radical scavenging activity of essential oil obtained from *P. lentiscus* ripe berries have not been reported to compare our results.

#### 3.6.3. Reducing power assay

Reducing power test is also one of the important mechanisms of antioxidant activity. Reducing power is to measure the reductive ability of antioxidant, and it is evaluated by the transformation of Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> in the presence of the sample extracts (Gülçin et al., 2003). The amount of Fe<sup>2+</sup> complex can then be monitored by measuring the absorbance at 700 nm.

The results for reducing power activity of essential oil of *P. lentiscus* fruits berries compared to BHT are reported in Table 1. Although, *P. lentiscus* ripe berries EO was less active than the positive control (BHT), with IC<sub>50</sub> of  $244.24 \pm 0.41$  and  $64.14 \pm 0.14$  mg/l respectively for EO and BHT, their reducing power increased with the increasing of the concentration. Practically, no previous works were found to compare our results. But many authors have investigated the reduction power of extract and essential oil of *P. lentiscus* leaves as Beghlah et al. (2016) and Djidel et al. (2013) who reported interesting reducing capacity. Our results shown that the essential oil of *P. lentiscus* ripe berries possessed a remarkable reducing capacity; it was more effective than DPPH and ABTS free radical scavenger assay (Table.4). These antioxidants properties (DPPH radical-scavenging activity, ABTS radical-scavenging activity, reducing power of essential oils are important for food industry in order to find possible alternatives to synthetic preservatives as BHT and BHA. In fact, *P. lentiscus* essential oil provide interesting results in terms of ability to neutralize free radicals.

## 4. Conclusion

In the present study, the response surface methodology was used to investigate the optimum process parameters that could obtain a maximum yield of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries during the

hydro distillation process. The use of multivariate optimization was of paramount importance in order to select the optimal operating conditions of interrelated variables and achieve the best yields in the extraction process. Second order polynomial model was obtained for predicting extraction yield of essential oil. The quadratic model developed for the yield of the extracted essential oil demonstrated a good agreement between the predicted values and actual values ( $R^2 = 0.9956$ ). Analysis of variance has shown that the effects of the extraction time, ultrasonic power, plant material to water ratio and their interactions were the major process parameters found to be significantly influence the essential oil yield were statistically significant. The optimal conditions determined were: extraction time of 60 min, Ultrasonic power of 60 W, plant material to water ratio of 1 g: 12 ml. At these conditions, the value of extraction yield is ( $0.66 \pm 0.03\%$ , g/100 g dry mater). This work clearly shows that the extraction of essential oil from *P. lentiscus* ripe berries can be improved by optimizing several extraction parameters. The present results also appear to show that essential oil of *P. lentiscus* ripe berries has moderate antioxidant activity, it will be tested for other biological activities and it will be done more *in vivo* studies in the future.

## References

- Alzorzqi, I., Singh, A., Manickam, S., Al-Qrimli, H.F., 2017. Optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of  $\beta$ -D-glucan polysaccharides from *Ganoderma lucidum* for prospective scale-up. *Resource-Efficient Technologies* 3, 46–54.
- Ammar, A.H., Zagrouba, F., Romdhane, M., 2010. Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a  $2^4$  complete factorial design. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 503–507.
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Jamoussi, B., 2012. Chemical composition and herbicidal effects of *P. lentiscus* L. essential oil against weeds. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2, 558–565.
- Aouinti, F., Zidane, H., Tahri, M., Wathélet, J.P., El Bachiri, A., 2014. Chemical composition, mineral contents and antioxidant activity of fruits of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco Fatima. *Journal of Materials and Environmental Science* 5, 199–206.
- Ashengroph, M., Nahvi, I., Amini, J., 2013. Application of Taguchi design and response surface methodology for improving conversion of isoeugenol into vanillin by resting cells of *Psychrobacter* sp. CSW4. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12, 411–421.
- Ayvaz, A., Sagdic, O., Karaborklu, S., Ozturk, I., 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science* 10, 1–13.
- Azirak, S., Karaman, S., 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science* 58, 88–92.
- Bachrouh, O., Msaada, K., Aidi Wannes, W., Talou, T., Ksouri, R., Salem, N., Abderraba, M., Marzouk, B., 2013. Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. *Plant Biosystems* 149, 38–47.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A., 2007. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7093–7098.
- Bas, D., Boyaci, I.H., 2007. Modelling and optimization I. Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78, 836–845.
- Beghlal, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L., Boukili, M., 2016. Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 305–310.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977.
- Buang, F., Jantan, B., Zawani Amran, Arbain, D., 2014. Optimization of ginger (*Zingiber officinale*) oil yield from Malaysia in different hydrodistillation physical parameters via central composite design of response surface methodology (RSM). *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology* 7, 5098–5105.
- Cannon, J.B., Cantrell, C.L., Astakie, T., Zheljazkov, V.D., 2013. Modified of yield and composition of essential oils by distillation time. *Industrial Crops and Products* 41, 214–220.
- Cares, M.G., Vargas, Y., Gaete, L., Sainz, J., Alarcon, J., 2009. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria* Molina. *Physics Procedia* 3, 169–178.
- Cavar, S., Maksimovic, M., Vidic, D., Paric, A., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37, 479–485.
- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.E., Wan Aida, W.M., Ho, C.W., 2009. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from limaupurut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16, 203–213.
- Chotphruethipong, L., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., 2017. Optimization of extraction of antioxidative phenolic compounds from cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry* 41, 1–10.
- Damyeha, M.S., Niakousari, M., Saharkhiz, M.J., 2016. Ultrasound pretreatment impact on *Prangos ferulacea* Lindl. and *Satureja macrosiphonia* Bornm. essential oil extraction and comparing their physicochemical and biological properties. *Industrial Crops and Products* 87, 105–115.
- Dedoussis, V.Z., Kalliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N.G., Andrikopoulos, N.K., 2004. Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSX restoration and downregulation of CD36 mRNA expression George. *Atherosclerosis* 174, 293–303.
- Djerrou, Z., Maamari, Z., Hamdi-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., Boukeloua, A., 2010. Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* 7, 258–263.
- Djidjel, S., Khenouf, S., Ameni, D., Baghiani, A., Arrar, L., Charef, N., 2013. Antioxidant properties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Pharmacognosy Communications* 3, 28–34.
- Ferreira, S.C., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandao, G., da Silva, E.P., Portugal, L., Dos Reis, P., Souza, A., 2007. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of Analytical methods. *Analitica Chimica Acta* 597, 179–186.
- Fuad, F.M., Karim, K.A., Don, M.M., 2016. Ultrasound-assisted extraction of oil from *Calophyllum inophyllum* seeds: statistical optimisation using box-Behnken design. *Journal of Physical Science* 27, 103–121.
- Galketiya, C., Weeraratna, T.S., Punchihewa, J.C., Wickramaratne, M.N., Wickramaratne, D.B.M., 2017. Screening of edible plants in Sri Lanka for antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Studies* 5, 91–95.
- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., Majzoobi, M., 2012. Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 14, 85–91.
- Gülçin, I., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.I., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 83, 371–382.
- Hafse, M., Benbrahim, K.F., FARAH, A., 2017. Biological activities of Taounate's *Pistacia lentiscus* essential oil. *Journal of Advances in Biology* 10, 2039–2043.
- Hamiani, A., Kambouche, N., Bellahouel, S., 2016. Chemical Composition and antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* L. essential oil from Oran (Algeria). *Advances in Bioscience and Biotechnology* 7, 539–544.
- Hashemi, S.M.B., Niakousari, M., Zandi, M., Saharkhiz, M.J., 2016. Application of ultrasonic Ohmic hydrodistillation system in production of essential oil from *Zenyan*. *International Food Research Journal* 23, 135–140.
- Hazziz, M., Baaliouamer, A., Versimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry* 116, 714–721.
- Hemwimol, S., Pavasant, P., Shotipruk, A., 2006. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry* 13, 543–548.
- Huaneng, X., Yingxin, Z., Chaohong, H., 2007. Ultrasonically assisted extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its mathematical model. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 15, 861–867.
- Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 23–30.
- Jennan, S., Farah, A., Mahjoubi, F., 2015. Optimisation of ultrasound assisted extraction of *T. hyemalis* using the response surface methodology. *Journal of Materials and Environmental Science* 6, 773–778.
- Jeyaratnam, N., Nour, A.H., Akindoye, J.O., 2016. Comparative study between hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation for extraction of *Cinnamomum Cassia* oil. *Journal of Engineering and Applied Sciences* 11, 2647–2652.
- Kannan, N., Rajakumar, A., Rengasamy, G., 2004. Optimisation of process parameters for adsorption of metal ions on straw carbon by using response surface methodology. *Environmental Technology* 25, 513–522.
- Khajvand, T., Chaichi, M.J., Nazari, O.L., Golchoubian, H., 2011. Application of Box–Behnken design in the optimization of catalytic behavior of a new mixed chelate of copper (II) complex in chemiluminescence reaction of luminol. *Journal of Luminescence* 131, 838–842.
- Khan, A., Jan, G., Khan, A., Jan, F.G., Bahadur, A., Danish, M., 2017. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Ephedra gerardiana* (root and stem) crude extract and fractions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017, 1–6.
- Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H., Xia, C., 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology* 51, 2006–2013.
- Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E., 2003. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Pitoterapia* 74, 164–167.
- Kowalski, R., Wawrzykowski, J., 2009. Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme *Thymus vulgaris* L. *Flavour and Fragrance Journal* 24, 69–74.
- Krishnan, V.C.A., Kuriakose, S., Rawson, A., 2015. Ultrasound assisted extraction of oil from rice bran: a response surface methodology approach. *Journal of Food Processing and Technology* 6, 1–7.
- Li, Y., Cu, F.J., Liu, Z.Q., Xu, Y.Y., Zhao, H., 2004. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum*ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1381–1388.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., Fan, Z., 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering* 79, 1087–1093.

- Liu, L., Shen, B.J., Xie, D.H., Cai, B.C., Qin, K.M., Cai, H., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cimicifugae rhizoma* with response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine* 11, 682–689.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F., 2005. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2433–2440.
- Lu, M., Yuan, D., Li, Q., Ouyang, T., 2009. Application of response surface methodology to analyze the effects of soil/liquid ratio, pH, and incubation time on the bioaccessibility of PAHs from soil in in vitro method. *Water, Air, & Soil Pollution* 200, 387–397.
- Mason, R.L., Gunst, R.F., Hess, J.L., 1989. *Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science*. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1st ed. John Wiley and Sons, New York.
- Medjkane, M., Allem, R., Medjahed, H., Taleb, F., Merouane, A., Mouffok, F., 2016. Antimicrobial activity of the essential oil isolated from *Pistacia lentiscus* leaves against helicobacter pylori Algerian clinical isolates. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 19, 466–474.
- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., Djebbar, A., 2016. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* 24, 653–669.
- Montgomery, D.C., 2001. *Design and analysis of experiments*, 5th edn. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Montgomery, D.C., 2009. *Design and Analysis of Experiments*, 7th edn. Wiley, New York.
- Morsy, N.F.S., 2015. A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Industrial Crops and Products* 65, 287–292.
- Myers, R.H., Montgomery, R.C., 2002. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Design Experiment*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York Wiley.
- Nyabaro Obed, M., Patrick, T., Rayori Mosoti, D., 2016. Optimization of essential oil extraction from *Eucalyptus grandis* leaves by cleveger distillation. *International Journal of Science and Research* 5, 493–496.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition* 44, 307–315.
- Palmer, P.B., O'Connell, D.G., 2009. Research corner regression analysis for prediction: understanding the process cardiopulmonary. *Physical Therapy Journals* 20, 23–26.
- Pellecuer, J., Jacob, M., Simeon, D.M., Dusart, G., Attisto, M., Barthez, M., Gourgas, L., Pascal, B., Tomei, R., 1980. Essais d'utilisations d'huiles essentielles de plantes aromatiques Méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plantes Médicinales et phytotherapie* 14, 83–98.
- Peng, T.Y., Don, M.M., Tahrel, M.A., 2012. Optimisation and kinetics studies on the extraction of essential oil from Zingiber Cassumunar. *Journal of Physical Science* 23, 65–82.
- Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., Chemat, F., 2013. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A* 1305, 41–47.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chema, F., 2014. An improved ultrasound cleveger for extraction of essential oils. *Food Analytical Methods* 7, 9–12.
- Prasad, K.N., Hassan, F.A., Yang, B., Kong, K.W., Ramanan, R.N., Azlan, A., Ismail, A., 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. Peels. *Food Chemistry* 128, 1121–1127.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II, Ed. CNRS, Paris 1170 pp.
- Rodrigues, S.P., Gustavo, A.S., 2007. Ultrasound extraction of compounds from coconut (Cocosnucifera) shell powder. *Journal of Food Engineering* 80, 869–872.
- Salehan, N.A.M., Sulaiman, A.Z., Ajit, A., 2016. Effect of temperature and sonication on the extraction of gallic acid from *Labista pumila* (KACIP FATIMAH). *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 11, 2193–2198.
- Sereshti, H., Rohanifar, A., Bakhtiari, S., Samadi, S., 2012. Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* maton essential oil. *Journal of Chromatography A* 1238, 46–53.
- Spingo, G., Faveri, D.M.D., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering* 93, 210–217.
- Stappen, I., Tabanca, N., Ali, A., Wedge, D.E., Wanner, J., Kaul, V.K., Lal, B., Jaitak, V., Gochev, V.K., Schmidt, E., Jirovetz, L., 2015. Chemical composition and biological activity of essential oils from wild growing aromatic plant species of *Skimmia laur-eola* and *Juniperus macropoda* from Western Himalaya. *Natural Product Communications* 10, 1071–1074.
- Tan, Q.L.P., Kieu, X.N.T., Kim, N.H.T., Hong, X.N.T., 2012. Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24, 25–30.
- Tanyildizi, M.S., Ozer, D., Elibol, M., 2005. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry* 40, 2291–2296.
- Tavallali, V., Rahmati, S., Bahmanzadegan, A., 2017. Antioxidant activity, polyphenolic contents and essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. as affected by zinc fertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 4883–4889.
- Tilay, A., Bule, M., Annapure, U., 2010. Production of biovanillin by one-step biotransformation using fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4401–4405.
- Velu, M., Lee, J.H., Chang, Woo-Suk, Lovanh, Nanh, Park, Yool-Jin, Jayanthi, Palaniyappan, Palanivel, V., Oh, B.T., 2017. Fabrication, optimization, and characterization of noble silver nanoparticles from sugarcane leaf (*Saccharum officinarum*) extract for antifungal application. *3 Biotech* 7, 1–9.
- Wang, R., Wang, R., Yang, B., 2009. Extraction of essential oils from five Cinnamon leaves and identified of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 289–292.
- Wang, Y., Liu, Y., Hu, Y., 2014. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 111, 324–332.
- Wyllie, S.G., Brophy, J.J., Sarafis, V., Hobbs, M., 1990. Volatile components of the fruit of *Pistacia lentiscus*. *Journal of Food Science* 55, 1325–1326.
- Yildirim, H., 2012. Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. *Scientia Horticulturae* 137, 29–35.
- Yingngam, B., Brantner, A.H., 2015. Factorial design of essential oil extraction from *Fagraea fragrans* Roxb. flowers and evaluation of its biological activities for perfume and cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science* 37, 272–281.
- Yu, X.C., Sun, D.L., Li, X.S., 2012. Ultrasound-enhanced supercritical co2 extraction of Masson Pine Wood essential oil. *Asian Journal of Chemistry* 24, 409–412.
- Zhang, X., Gao, H., Zhang, L., Liu, D., Ye, X., 2012. Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products* 39, 162–169.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23, 283–333.

**Résumé : Etude phytochimique des extraits de *P. lentiscus* (L.). Activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide.**

Les extraits de plantes contiennent une grande variété de composés du métabolisme secondaire (substances phénoliques et huiles essentielles) qui ont des capacités antimicrobiennes, antioxydantes et insecticides.

Les huiles essentielles des branches/feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *Pistacia lentiscus* (L.) ont été extraites par hydro distillation assistée par ultrasons. La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) a été utilisée d'une part, pour évaluer les effets des principales variables au cours du processus d'extraction des huiles essentielles des différents organes de *P. lentiscus* (L.) influençant le rendement et d'autre part, pour déterminer les conditions optimales d'extraction de l'huile essentielle. Les valeurs optimales du rendement obtenues sont de **0.330±0.001%** pour les feuilles/branches. Ce rendement est atteint pour une durée d'extraction de **90 min** en appliquant un prétraitement par ultrasons d'une puissance de **60 W** et un ratio matériel végétal/eau de **1/8 (g.mL<sup>-1</sup>)**. Pour les fruits rouges et fruits noirs un rendement optimal de **0.69±0.01%** et **0.66±0.03%**, respectivement est obtenue pour une durée d'extraction de **60 min** en appliquant un prétraitement par ultrasons d'une puissance de **60 W** et en utilisant un ratio matériel végétal/eau de **1/12 (g.mL<sup>-1</sup>)**.

Le criblage phytochimique a mis en évidence les principaux métabolites secondaires (Saponines, tanins catéchiques, tanins galliques, phénols totaux, flavonoïdes, protéines, terpenoïdes, composés réducteurs et huiles essentielles) se trouvant dans les différents organes de *P. lentiscus* (L.).

L'analyse par CG/MS a révélé une richesse de l'huile essentielle des feuilles/branches en monoterpènes hydrocarbonés et monoterpènes oxygénés avec des pourcentages respectifs de **46,31%** et **42,54%**. Par contre, l'huile essentielle des fruits rouges et fruits noir est constituée essentiellement de monoterpènes hydrocarbonés (**88,28%** et **84,94%**), les sesquiterpènes hydrocarbonés étant présents avec un faible taux de (**9,20%** et **9,63%**), respectivement.

L'huile fixe des fruits de *P. lentiscus* (L.) analysée par CPG se compose principalement de trois acides gras (les acides palmitique, oléique et linoléique) avec des pourcentages de **22.74%**, **48.18%**, **25.20%** et **29.59%**, **49.70%** et **17.38 %** respectivement pour l'huile extraite des fruits rouges et des fruits noirs. La teneur en composés phénoliques des différents extraits des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) varie de **30.03±0.14** à **1351±0.69 mg EAG.g<sup>-1</sup> d'extrait**. La teneur en flavonoïdes varie de **3.82±0.14** à **47.701±0.020 mg Eq Q.g<sup>-1</sup> d'extrait**.

L'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes (le test DPPH, ABTS et le test du pouvoir réducteur). Les résultats montrent que les extraits des branches, feuilles, fruits rouges et fruits noirs de *P. lentiscus* (L.) présentent un pouvoir antioxydant plus puissant que celui des huiles essentielles.

L'effet antimicrobien des huiles essentielles et des extraits sur les souches microbiennes testées, se révèle très intéressant avec des diamètres des zones d'inhibitions allant de **10.03±0.05** à **23,32 ± 0,82mm** et **10.16±0.76** à **27,03±0.05mm** respectivement.

L'effet insecticide étudié sur le *Tribolium castaneum* par contact et par inhalation, a révélé un fort potentiel biocide. Un taux de mortalités allant de **0.0±0.0** à **96.25± 2.16%** pour les huiles essentielles et de **0.0±0.0** à **100±0.0 %** pour les extraits dans le test par contact. Pour le test d'inhalation, un taux de mortalité allant de **41.25±2.16** à **100±0.0%** est enregistré pour les huiles essentielles et un taux allant de **40±3.53** à **96.25±2.16%** est obtenu pour les huiles fixes.

**Mots clés** : *P. lentiscus* (L.), rendement, huile essentielle, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante, effet antimicrobien, effet insecticide.

**Abstract: Phytochemical study of *P.lentiscus* (L.) extracts. Antioxidant, Antimicrobial and Insecticidal activities.**

Plant extracts contain a wide variety of secondary metabolic compounds (phenolic substances and essential oils) that have antimicrobial, antioxidant and insecticidal abilities.

The essential oils of the branches, leaves, red fruits and black fruits of *Pistacia lentiscus* (L.) were extracted by ultrasonically assisted water distillation. The Response Surface Methodology (MSR) was used on the one hand to evaluate the effects of the main variables during the process of extracting essential oils from the different parts of *P. lentiscus* (L.) influencing the yield and on the other hand to determine the optimum conditions for extraction of the essential oil. The optimum yield values obtained are **0.330 ± 0.001%** for leaves / branches. This efficiency is achieved for an extraction time of **90 min** by applying ultrasonic pre-treatment with a power of **60 W**, and a plant / water material ratio of **1/8 (g.mL<sup>-1</sup>)**. For red fruits and black fruits an optimal yield of **0.69 ± 0.01%** and **0.66 ± 0.03%**, respectively, is obtained for an extraction time of **60 min** by applying ultrasonic pre-treatment with a power of **60W** and using a ratio plant material / water **1/12 (g.mL<sup>-1</sup>)**.

Phytochemical screening revealed the main secondary metabolites (saponins, catechin tannins, gallic tannins, total phenols, flavonoids, proteins, terpenoids, reducing compounds and essential oils) found in the various organs of *P. lentiscus* (L.).

The GC/MS analysis revealed a richness of the essential oil of the leaves/branches in monoperpenes hydrocarbon and oxygenated monoterpenes with percentages of **46.31%** and **42.54%**, respectively. On the other hand, the essential oil of the red and black fruits is essentially monocarpene hydrocarbons (**88.28%** and **84.94%**), the sesquiterpene hydrocarbons being present with a low rate (**9.20%** and **9.63%**), respectively.

The fixed oil of *P. lentiscus* (L.) fruit analyzed by GPC is composed mainly of three fatty acids (palmitic, oleic and linoleic acids) with percentages of **22.74%**, **48.18%**, **25.20%** and **29.59%**, **49.70 %** and **17.38%**, respectively for oil extracted from red fruits and black fruits.

The phenol content of the various extracts of the branches, leaves, red fruits and black fruits of *P. lentiscus* (L.) varies from **30.03 ± 0.14** to **1351 ± 0.69** mg EAG.g<sup>-1</sup> extract. The content of flavonoids varies from **3.82 ± 0.14** to **47.701 ± 0.020** mg Eq Q.g<sup>-1</sup> extract.

Antioxidant activity was evaluated by three methods (the DPPH test, ABTS and the reductive power test). The results show that extracts of the branches, leaves, red fruits and black fruits of *P. lentiscus* (L.) have a stronger antioxidant power than that of essential oils.

The antimicrobial effect of the essential oils and extracts on the microbial strains tested, reveals very interesting with diameters of the zones of inhibition ranging from **10.03 ± 0.05** to **23.32 ± 0.82** mm and **10.16 ± 0.76** to **27.03 ± 0.05**mm, respectively.

The insecticidal effect studied on the *Tribolium castaneum* by contact and by inhalation, revealed a strong biocidal potential. A mortality rate ranging from **0.0 ± 0.0** to **96.25 ± 2.16%** for essential oils and from **0.0 ± 0.0** to **100 ± 0.0%** for extracts in the contact test. For the inhalation test, a mortality rate ranging from **41.25 ± 2.16** to **100 ± 0.0%** is recorded for essential oils and a rate ranging from **40 ± 3.53** to **96.25 ± 2.16%** is obtained for fixed oils.

**Key words:** *P. lentiscus* (L.), yield, essential oil, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial effect, insecticidal effect.

## **ملخص: دراسة نباتية كيميائية لمستخلصات *Pistacia lentiscus* (L.) نشاط مضاد للأوكسدة ومضاد للميكروبات و مضاد للحشرات.**

المستخلصات النباتية تحتوي على مجموعة واسعة من المركبات الأيضية الثانوية (المواد الفينولية والزيوت الأساسية) التي لديها قدرات مضادة للميكروبات ومضادة للأوكسدة ومضادة للحشرات.

تم استخراج الزيوت الأساسية من الاغصان /الأوراق، الفواكه الحمراء والفواكه السوداء من *Pistacia lentiscus* (L.) عن طريق التقطير بمساعدة الموجات فوق الصوتية. تم استخدام طريقة استجابة السطح (MSR) لتقييم آثار المتغيرات الرئيسية خلال عملية استخراج الزيوت الأساسية من الأجزاء المختلفة من *P. lentiscus* (L.) التي تؤثر على المردود من ناحية و من ناحية أخرى لتحديد الظروف المثلى لاستخراج الزيت الاساسى . القيم المثلى للمردود التي تم الحصول عليها هي  $0.330 \pm 0.001\%$  بالنسبة لأوراق الاغصان. تم الحصول على هذا المردود في مدة استخلاص 90 دقيقة من خلال تطبيق المعالجة بالموجات فوق الصوتية بقدرة 60 واط ، ونسبة مادة نباتية / ماء 8/1 ( $\text{g.mL}^{-1}$ ). بالنسبة للفواكه الحمراء والفواكه السوداء، تم الحصول على المردود الأمثل من  $0.69 \pm 0.01\%$  و  $0.66 \pm 0.03\%$  على التوالي، في وقت استخلاص 60 دقيقة من خلال تطبيق المعالجة بالموجات فوق الصوتية بقدرة 60 واط واستخدام نسبة مادة النباتية / ماء 12/1 ( $\text{g.mL}^{-1}$ ).

كشف الفحص النباتي الكيميائي عن المركبات الثانوية الرئيسية (السابونين ، التانينات الكاتشين ، التانينات قالك ، الفينولات الكلية ، الفلافونويد ، البروتينات ، التريونويد ، المركبات المختزلة والزيوت الأساسية) الموجودة في الاعضاء المختلفة من *P. lentiscus* (L.).

وكشف تحليل GC/MS عن ثراء الزيت العطري للأوراق / اغصان بأحاديات التاربان الهيدروكربونية واحاديات التاربان الأوكسجينية مع النسب المئوية 46.31% و 42.54%. من ناحية أخرى، يتكون الزيت الأساسي للفواكه الحمراء والفواكه السوداء أساساً من أحاديات التاربان الهيدروكربونية (88.28% و 84.94%)، السيسسكيتاغابان الهيدروكربونية فهي موجودة بنسبة صغيرة (9.20% و 9.63%) على التوالي.

يتكون الزيت الثابت لفاكهة *P. lentiscus* (L.) التي تم تحليلها عن طريق GPC تتكون بشكل رئيسي من ثلاثة أحماض دهنية (أحماض البالمتيك ، الاوليك و اللينوليك) بنسب مئوية تقدر ب 22.74% ، 48.18% و 25.20% ، 29.59% ، 49.70% و 17.38% على التوالي للزيت المستخرج من الفواكه الحمراء و السوداء.

محتوى المركبات الفينولية للمستخلصات المختلفة للاغصان ،الأوراق ،الفواكه الحمراء والفواكه السوداء ل *P. lentiscus* (L.) يتراوح من  $0.14 \pm 30.03$  إلى  $0.69 \pm 1351$  ( $\text{mg EAG.g}^{-1}$ ) مستخلص. تتراوح محتوى الفلافونويد من  $0.14 \pm 3.82$  إلى  $47.701 \pm 0.020$   $\text{mg Eq Q.g}^{-1}$  مستخلص.

تم تقييم نشاط مضاد الأوكسدة من خلال ثلاث طرق (اختبار DPPH ، ABTS واختبار الطاقة الاختزالية). أظهرت النتائج أن مستخلصات الاغصان، الأوراق والفواكه الحمراء والفواكه السوداء من *P. lentiscus* (L.) لها قوة مضادة للأوكسدة أقوى من تلك الخاصة بالزيوت الأساسية.

إن التأثير المضاد للميكروبات للزيوت الاساسية والمستخلصات على السلالات الميكروبية التي تم اختبارها هام مع أقطار مناطق المنع تتراوح من  $0.05 \pm 10.03$  إلى  $0.82 \pm 23.32$  mm و  $0.76 \pm 10.16$  إلى  $0.05 \pm 27.03$  mm على التوالي.

أظهر تأثير ضد الحشرات الذي تم دراسته على *Tribolium castaneum* عن طريق الاتصال والاستنشاق، إمكانات قوية للمبيد البيولوجي. معدل الوفيات يتراوح من  $0.0 \pm 0.0$  إلى  $2.16 \pm 96.25\%$  بالنسبة للزيوت الأساسية ومن  $0.0 \pm 0.0$  إلى  $100 \pm 0.0\%$  للمستخلصات في اختبار الاتصال بالنسبة لاختبار الاستنشاق، تم تسجيل معدل وفيات يتراوح بين  $2.16 \pm 41.25$  إلى  $100 \pm 0.0\%$  بالنسبة للزيوت العطرية ومعدل يتراوح من  $3.53 \pm 40$  إلى  $2.16 \pm 96.25\%$  تم الحصول عليه بالنسبة للزيوت الثابتة.

**الكلمات المفتاحية:** *P. lentiscus* (L.) ، مردود،الزيت العطري ، البوليفينول الكلي ،فلافونيدات ، نشاط مضاد للأوكسدة ، تأثير مضاد للميكروبات ، تأثير مضاد الحشرات.