

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida – 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire de fin d'études

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Génomique et Biotechnologie Végétale

Thème :

**Activité pharmacologique des fractions issues des
résidus des fruits de *Pistacia lentiscus L.***

Soutenue le 29 septembre 2016

Présenté par :

Melle DILMI Imene

Mr HAMLAMohamed

Devant le jury :

| | | | |
|-----------------|-----------|-------|---------------|
| Mr BESSAAD A. | MCB / BPO | UBD1 | Président |
| Mme FAIDI H. | MAB / BPO | UBD1 | Examinatrice |
| Mr CHEMAT S. | DR | CRAPC | Promoteur |
| Mme ZERKAOUI A. | MAA / BPO | UBD1 | Co-Promotrice |

Année Universitaire : 2015 – 2016

Remerciements

*A*vant tout, nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à bien ce travail.

*N*ous tenons à remercier les personnes qui ont accepté de juger notre travail :

*N*ous sommes particulièrement reconnaissantes à **Mr BESSAAD M A.** maitre conférence B au département de Biologie des Populations et Organismes pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté la présidence du jury. Qu'il soit assuré de notre respectueuse considération.

*N*os reconnaissances vont également à **M^{me} FAIDI H.** maitre assistante B au département de Biologie des Populations et Organismes qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail. Veuillez accepter nos plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

*N*ous tenons à remercier sincèrement notre promoteur **Mr CHEMAT S.** directeur de recherche au Centre de Recherche en Analyse Physico – Chimique (CRAPC), pour avoir proposé le thème et encadré ce travail. Nous tenons à vous remercier pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils, votre objectivité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Il m'est aussi d'un agréable devoir de vous adresser un grand merci pour la sympathie, la confiance et la liberté d'action dont nous avons bénéficié tout au long de ce mémoire. Soyez assuré de nos sincères estimations.

A notre Co-promotrice **Mme ZERKAOUI A.** maitre assistante A au département de Biologie des Populations et Organismes, nous adressons notre plus vifs remerciements pour son aide, sa gentillesse au quotidien, tous ces encouragements et son soutien dans les moments difficiles

Un grand merci pour l'équipe des laboratoires de Centre de Recherche en Analyse Physico – Chimique (CRAPC) BOUISMAIL.

Nous voudrions adresser nos remerciements au personnel de laboratoire d'hygiène de la wilaya de BLIDA pour leur aide.

Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes du l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) Bainem Alger, pour leur accueil au sein de leur unité.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude aux nombreuses personnes qui nous ont apporté leur aide précieuse avec beaucoup de gentillesse et en particulier : **Mr wahid, Mr ABOU MUSTAPHA, Mr ABDELHAMIDE, Melle KARAOUI F, Melle CHAMI A, Mr ABDELLAH.**

Nous remercions aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance.



Dédicace

Je dédie cet œuvre à :

*Mes très **chers parents** qui n'avaient ménagés aucun effort pour me donner une meilleure éducation, pour me guider avec rigueur mais aussi avec amour, ils ont été toujours présents devant moi par leur amour, leur persévérance, leur soutien et exhortation. Toutes les expressions ne suffisent pas pour exprimer ma gratitude.*

*Je t'aime **papa**, je t'aime **maman**, que dieu vous récompense et vous garde longtemps.*

*Mes deux frères **Azzedine, Slimane**, leur souhaitant une bonne réussite dans leur vie.*

*Ma tendre sœur **Asma***

*Mon cher binôme et amie **Mohamed**, pour sa présence à mes côtés dans les bons comme dans les moments plus difficiles, et ses encouragements.*

*A mes très cher amis **Nacera** par son aide précieux, **Hafidha, Fatima, Omar, Mourad, Rahim**, sans oublié **Rachid**.*

Tout ce qui j'aime et qui se reconnaissent.

Imene



Dédicace

Par le biais de cet humble et modeste travail synonyme de concrétisation l'année de formation, de labeur et d'efforts, je dédie le fruit de ma persévérance, de ma patience :

***A mon père** en reconnaissance de tout ce qu'il a fait pour moi tout au long de mon existence, pour son soutien moral, ses encouragements continuels.*

***A ma mère** ma fleur de vie, symbole d'amour, d'affection et de bienveillance, pour sa patience, ses sacrifices, sa conscience, ses conseils qui ont éclairé mon chemin.*

***A Mon cher frère** pour son encouragement indéfectible.*

***Mes adorables sœurs : Leïla, Fatiha et Soraya** pour leur soutien moral et leurs sacrifices tout au long de ma formation.*

***A mon binôme Imene** et à toute sa famille.*

***A mes chers collègues** de la promotion de Génomique et Biotechnologie Végétale (2015-2016)*

A toute ma famille.

A mes meilleurs amis.

A tous mes camarades.

Aux gens qui m'aiment et m'estiment.

Mohamed

Résumé

Cette étude a porté sur l'identification des différents composés actifs et de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Le résidu a été extrait par plusieurs solvants lesquels sont méthanol (MeOH), chloroforme (CHCl₃), acétate d'éthyle (AcOEt) et n-butanol (n-buOH) et par chromatographie sur colonne. Les extraits et les fractions obtenus ont été criblés pour leur propriété antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé contre certaines bactéries Gram + et Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia spp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), ainsi que trois souches fongiques (*Aspergillus Niger*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*).

Le rendement obtenu est 0,84 % chez l'extrait CHCl₃ suivi par l'extrait AcOEt 0,44% puis l'extrait n-buOH a donné le plus faible rendement avec 0,39%.

Les fractions ont été soumises à l'identification de composés bioactifs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS. Dix-neuf phyto-constituants ont été identifiés, la majorité de ces composés sont des esters méthyliques des acides gras et d'acide palmitique, l'acide oléique et 9,17-octadécadiénel, (Z) -. Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques.

Les résultats des tests antibactériens montrent que nos extraits et nos fractions ont témoigné d'une forte action antibactérienne vis-à-vis des souches étudiées, et l'évaluation de l'activité antifongique révèle une activité plus importante vis-à-vis des deux espèces *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* chez les extraits AcOEt et n-buOH

Mots clés :

Pistacia lentiscus L., activité antibactérienne, GC-MS, activités biologiques, principes actifs.

Abstract

This study concerned the identification of different active compounds and evaluation of the antimicrobial activity of extracts and chromatographic fractions of wastes of the fruits of *Pistacia lentiscus*.

The residue was extracted with several solvents which are methanol (MeOH), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (AcOEt) and n-butanol (n-buOH) and column chromatography. The extracts and the fractions obtained were screened for its antibacterial property by the middle agar diffusion method against some Gram + and Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia spp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), and three fungal strains (*Aspergillus Niger*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*)

The yield obtained was 0.84% in the CHCl₃ extract followed by AcOEt extract 0.44% and the extract n-buOH gave the lowest yield with 0.39%.

The fractions were subjected to the identification of bioactive compounds by gas chromatography coupled to GC / MS mass spectrometry. Nineteen phyto-components were identified majority of these compounds are methyl esters of fatty acid and palmitic acid, oleic acid and 9,17-octadecadienal, (Z) -. These major active ingredients possess various biological activities.

The results of antibacterial test show that our extracts and fractions displayed a strong antibacterial action for the strains tested, and evaluating the antifungal activity shows higher activity for the two species *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* in AcOEt extracts and n-buOH

Keywords:

Pistacia lentiscus, antibacterial activity, GC-MS, biological activities, active ingredients.

الملخص

هذه الدراسة تركز على تحديد المركبات النشطة وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات و العينات الكروماتوغرافية من بقايا فاكهة *Pistacia lentiscus*

تم استخراج بقايا الفاكهة مع العديد من المذيبات التي هي الميثانول (MeOH)، والكلوروفورم (CHCl₃)، خلات الإيثيل (AcOEt) و n-بيوتانول (n-buOH) والعمود اللوني .

المستخلصات و العينات الكروماتوغرافية التي تم الحصول عليها يتم عليها اختبار المضاد للبكتيريا، بطريقة الانتشار على سطح جيلوز ضد سلالات من غرام ايجابي (Gram+) والسلبى (Gram-)

(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia spp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*)

وثلاثة فطريات (*Aspergillus Niger*, *Candida albicans et Saccharomyces cerevisiae*).

وكان العطاء المتحصل عليه من مستخلص CHCl₃ 0.84% يليه مستخلص AcOEt 0.44% بينما مستخلص n-buOH أعطى أدنى عائد مع 0.39%.

يتم عرض الكسور الكروماتوغرافية على GC/MS لتحديد المكونات النشطة. تم تحديد تسعة عشر مكون نشط معظمها أسترات الميثيل الأحماض الدهنية حمض البالمتيك، حمض الأوليك (acide oléique) و

17,9-octadécadiénal (Z) -

تشير النتائج إلى أن المستخلصات و العينات الكروماتوغرافية أعطت نتائج إيجابية ضد سلاسل الاختبار، ويظهر نشاط مضاد للفطريات نشاطا عالي ضد كل من *Candida albicans et Saccharomyces cerevisiae* في مستخلصات n-buOH و ACOEt

الكلمات المفتاحية:

Pistacia lentiscu، المفعول المضاد الحيوى، GS/MS، الأنشطة البيولوجية، المكونات النشطة

Liste des abréviations

| | |
|-------------------------|---|
| ATCC : | Collection américaine des cultures type |
| AcOEt : | Acétate d'éthyle |
| CCM : | Chromatographie sur couche mince |
| CHCl₃ | Chloroforme |
| DMSO: | Diméthylsulfoxyde |
| DZI : | Diamètre de la Zone d'Inhibition |
| GC-MS : | Chromatographie Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse |
| LPS: | Lipopolysaccharides |
| MeOH: | Méthanol |
| MH: | Muller-Hinton |
| n-BuOH: | n- butanol |
| NCCLS: | National Committee For Clinical Laboratory Standards |
| NIST : | National Standard Institute et de la technologie |
| nm: | Nanometer |
| OMS : | Organisation mondiale de la santé |
| R_f : | Rapport frontale |
| SAB: | Sabouraud |

Liste des tableaux

| Tableaux | Titres | Pages |
|---------------------|---|--------------|
| Tableau I | Certaines applications de micro-ondes pour le recouvrement des composés précieux des résidus agro-alimentaires | 13 |
| Tableau II | Certaines applications de la distillation à la vapeur sur le recouvrement des composés précieux de déchets alimentaires | 15 |
| Tableau III | Conditions opératoires des analyses en CG/SM | 21 |
| Tableau IV | Origine et références des souches testées. | 22 |
| Tableau V | Rendements des extraits | 25 |
| Tableau VI | Résultats du fractionnement de l'extrait CHCl ₃ par la chromatographie sur colonne. | 28 |
| Tableau VII | Proportions des composés majoritaires de l'extrait CHCl ₃ | 29 |
| Tableau VIII | Proportions des composés majoritaires de la fraction F1 | 30 |
| Tableau IX | Proportions des composés majoritaires de la fraction F2 | 31 |
| Tableau X | Proportions des composés majoritaires de la fraction F3 | 33 |
| Tableau XI | Proportions des composés majoritaires de la fraction F9 | 34 |
| Tableau XII | Résultats de l'activité antibactérienne les extraits des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> | 35 |
| Tableau XIII | Résultats de l'activité antibactérienne des fractions des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> | 40 |
| Tableau XIV | Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de l'activité anti fongique | 42 |
| Tableau XV | Diamètres des zones d'inhibition (mm) des fractions de l'activité anti fongique | 44 |

Liste des figures

| Figures | Titres | Pages |
|------------------|--|--------------|
| Figure 1 | Arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i> L. | 3 |
| Figure 2 | Description botanique du <i>Pistacia lentiscus</i> | 5 |
| Figure 3 | Résidus de fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> | 16 |
| Figure 4 | la séparation des phases de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante A. Extrait CHCl ₃ B. Extrait AcOEt C. Extrait n-buOH | 17 |
| Figure 5 | Différentes étapes d'extraction et de séparation des phases issus de l'extrait méthanolique du <i>Pistacia lentiscus</i> | 18 |
| Figure 6 | Schéma représentatif du dispositif de la chromatographie sur couche mince. | 19 |
| Figure 7 | Schéma représentatif du dispositif la chromatographie sur colonne. | 20 |
| Figure 8 | Chromatogramme de l'extrait CHCl ₃ par le système dichloroforme / méthano (9 :1) | 26 |
| Figure 9 | Chromatogramme des deux extraits CHCl ₃ et AcOEt par le meilleure système cyclohexane / acétone (3:2) | 26 |
| Figure 10 | Chromatogramme de différentes fractions issues de l'extrait CHCl ₃ | 27 |
| Figure 11 | Chromatogramme GC/MS de l'extrait CHCl ₃ | 29 |
| Figure 12 | Chromatogramme GC/MS de la fraction F1 | 30 |
| Figure 13 | Chromatogramme GC/MS de la fraction F2 | 31 |
| Figure 14 | Chromatogramme GC/MS de la fraction F3 | 32 |
| Figure 15 | Chromatogramme GC/MS de la fraction F9 | 33 |
| Figure 16 | L'effet de l'extrait AcOEt des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur : <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter freundii</i> et <i>Serratia spp.</i> par la méthode d'aromatogramme | 36 |
| Figure 17 | L'effet de l'extrait AcOEt des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur : <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>bacillus cereus</i> par la méthode d'aromatogramme | 37 |
| Figure 18 | L'effet de l'extrait MeOH des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> | 37 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| | sur : <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>baccillus cereus</i> par la méthode d'aromatogramme | |
| Figure 19 | L'effet de l'extrait CHCl ₃ des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur : <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode d'aromatogramme | 37 |
| Figure 20 | L'effet de l'extrait n-buOH des résidus des fruits de <i>Pistacia Lentiscus</i> sur : <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>baccillus cereus</i> et par la méthode d'aromatogramme | 38 |
| Figure 21 | L'effet de l'extrait n-but des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Bacillus cereus</i> | 41 |
| Figure 22 | L'effet de l'extrait n-buOH des résidus des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur <i>Candida albicans</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 |

SOMMAIRE

| | |
|------------------------------|---|
| Introduction générale | 1 |
|------------------------------|---|

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Données générales sur l'espèce *Pistacia lentiscus*

| | |
|---|---|
| I.1. Introduction..... | 3 |
| I.2. Description botanique | 4 |
| I.3. Systématique et noms vernaculaires | 6 |
| I.4. Origine | 6 |
| I.5. Constituants chimiques | 7 |
| I.6. Utilisation | 8 |

Chapitre II : Valorisation des résidus agro-alimentaires

| | |
|--|----|
| II.1. Généralité | 10 |
| II.2. Techniques d'extraction des composés bioactifs issus des résidus agroalimentaires..... | 11 |

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| III.1. Matériel | 16 |
| III.2. Méthodes..... | 16 |
| III.2.1. Protocole d'extraction des métabolites secondaires | 16 |
| III.2.2. Séparation des métabolites secondaires de l'extrait chloroforme | 19 |
| III.2.2.1 Chromatographie sur couches minces..... | 19 |
| III.2.2.2 Fractionnement sur colonne de l'extrait chloroforme..... | 20 |
| III.2.3. Identification des composés majoritaires dans les fractions..... | 21 |
| III.2.4. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> | 22 |

Chapitre IV : Résultats et discussions

| | |
|--|----|
| IV.1. Rendement d'extraction..... | 25 |
| IV.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique..... | 26 |
| IV.3. Identification par GC-MS..... | 28 |
| IV.4. Résultat de l'activité antimicrobienne..... | 35 |
| IV.5. Discussion générale de l'activité antibactérienne..... | 45 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| Conclusion générale | 48 |
|----------------------------|-----------|

Références bibliographiques



Introduction générale

Introduction générale

L'utilisation des plantes médicinales s'inscrit dans le mouvement le plus large du développement de la médecine traditionnelle vue leurs nombreuses propriétés, et leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antimicrobiens (**Robard, 2004**).

Plusieurs espèces végétales sont connues depuis longtemps pour leurs effets antimicrobiens. De ce fait, les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur (**Ouraini et al., 2007**).

L'usage des extraits de plantes contenant des constituants bioactifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive (**Keita et al., 2004**).

Les résidus agro-alimentaires ont longtemps été considérés comme une question de minimisation de traitement et de prévention en raison des effets environnementaux induits par leur élimination. De nos jours, les déchets alimentaires représentent une source de nutraceutiques précieuses (**Schieber et al., 2001**).

En outre, le déchet est différent d'un matériau à l'autre. Par exemple, les résidus des fruits, les pelures et les grains peuvent être utilisés comme une source de pigments et de flavonoïdes qui peuvent trouver des applications comme des colorants et des antioxydants naturels, respectivement. En général, les résidus agro-alimentaires sont des sources importantes de composés de valeur, tels que les polyphénols, les caroténoïdes et les hydrates de carbone dans le cas des déchets végétaux. (**Galanakis, 2012; Rahmanian et al., 2014; Heng et al., 2015**).

Au cours des dernières années, un grand effort a été fait pour la valorisation des résidus et des déchets alimentaires et agricoles en créant des bio-produits à valeur ajoutée, les biocarburants ou ingrédients alimentaires (**Makris et al., 2007**).

Est-il possible d'engager un processus de valorisation des sous-produits qui pourrait déboucher à long terme sur une meilleure valorisation économique, environnementale et sociale ?

Introduction générale

C'est dans ce contexte, nous sommes intéressés à l'identification des différents composés actifs et de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Les principaux volets de cette étude comportent essentiellement :

- ✓ Extraction des résidus avec plusieurs solvants.
- ✓ Séparation des fractions par partage solvant / solvant et par chromatographie sur colonne.
- ✓ Test pharmacologiques sur quelques souches microbiennes pour évaluation de l'activité.
- ✓ Caractérisation chimiques des composés actifs.



Partie bibliographique



CHAPITRE I:

Données générales sur l'espèce

Pistacia lentiscus

I.1. Introduction :

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, on retrouve le lentisque (*Pistacia lentiscus*) qui est un arbuste connu pour l'usage de ses feuilles et fruits en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques. En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (Quezel P. et Santa S., 1962).

Pistacia lentiscus est un arbuste à feuilles persistantes de la famille des anacardiées pouvant atteindre 3 à 4 m de hauteur, allant jusqu'à 6 à 7 m dans les conditions favorables (Reig Armiñana et al., 2004). Il se développe dans des régions arides et caractéristiques des pays méditerranéens (Castola et al., 2000).

En méditerranée, cet arbuste a la capacité de se développer le long d'un gradient d'humidité et de température (Bandera et al., 2008) où les composés volatils des différentes parties de cette plante (les feuilles, les fruits et le mastic) ont fait l'objet de plusieurs études (Fernández et al., 2000).



Figure 1 : Arbuste de *Pistacia lentiscus* L. (Belfadel, 2009)

I.2. Description botanique :

Pistacia lentiscus, connu aussi comme l'arbre au mastic, est décrite comme l'une des espèces ligneuses les plus importantes dans le bassin méditerranéen (Cortina et al., 2008).

C'est un arbuste ou arbrisseau résineux à odeur très prononcée buissonnant et touffu de quelques mètres de hauteurs (1 à 3 mètres) (Baba- Aissa, 1999) et de nombre chromosomique de $2n = 24$ (Al Saghir et al., 2010). D'après More D. et White. J (2005), elle est caractérisée par :

➤ Appareil végétatif :

- **Ecorce:** rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Lors de l'incision de l'écorce, la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée et à odeur forte.
- **Feuilles :** persistantes, composées, paripennées, 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.
- **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.

➤ Appareil reproducteur :

- **Fleurs :** Les fleurs sont unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe, et très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles.

On distingue les fleurs femelles des fleurs mâles grâce à leur couleur, vert jaunâtre pour les femelles et rouge foncé pour les mâles.

D'après Somson (1987), la plante est dioïque :

- **La fleur femelle** ♀: à un calice comportant 3 ou 4 lobes et un 1 ovaire de 3 carpelles concrescents et 3 stigmates arqués en dehors.
- **La fleur mâle** ♂: à un calice comportant 5 sépales au fond duquel sont insérées 5 étamines, à filets courts soudés à la base et anthères rouges, tétragones.
- **La formule florale :** $5S + 5 E + 3C$.
- **Fruit :** est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme, d'abord rouges puis noirs à la maturité (Abdelwahed et al., 2007 ; Charef, et al., 2008 ; More D. et White. J, 2005)

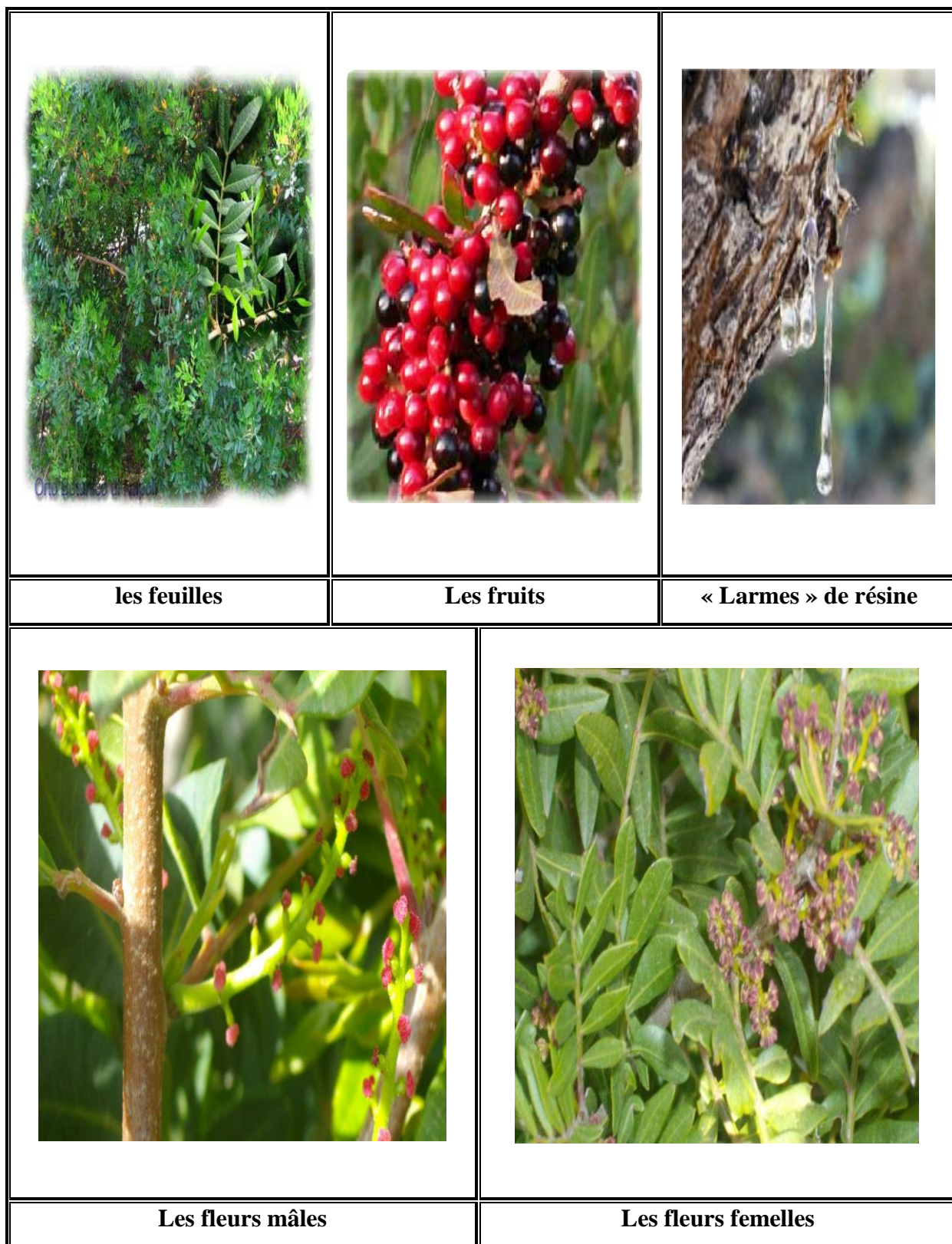


Figure 2 : Description botanique du *Pistacia lentiscus*. (Belfadel, 2009)

I.3. Systématique et noms vernaculaires

I.3.1. Classification systématique

La systématique du *Pistacia lentiscus* a été décrite par **emberger et al, (1989)** comme suit :

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Règne : | Plantae, (végétal) |
| Embranchement : | Spermaphyte |
| Sous-embranchement : | Angiosperme |
| Classe : | Magnoliopsida |
| Ordre : | Sapindales. |
| Famille : | Anacardiaceae. |
| Genre : | <i>Pistacia</i> . |
| Espèce : | <i>Pistacia lentiscus</i> |

I.3.2. Les noms vernaculaires

En langue anglaise, on peut trouver les noms vernaculaires suivants : Mastic et chios mastic tree (**Garnier et al., 1961**). Par ailleurs, on retrouve en langue française plusieurs dénominations tels que: Arbre au mastic, pistachier lentisque, restringe lentisque d'Espagne (**Garnier et al., 1961**).

Pour la langue arabe, les noms vernaculaires les plus répandus sont : Drew, darw (**Baba-Aissa, 1999**), ou *Sareys* (**El beyrouthy, 1999**) tandis que pour le berbère : *amadagh*, et le fruit se dénomme *Tidekt* (**Baba-Aissa, 1999**) ; et il se dénomme en dialecte local dans la région de Jijel (Algérie) : *tro* ou *troo*.

I.4. Origine

Pistacia lentiscus est largement distribuée dans les écosystèmes extrêmes du bassin méditerranéen, notamment dans les régions ensoleillées à basse altitude, et constitue, avec les myrtes et les cistes, d'immenses broussailles appelées maquis.

C'est une espèce thermophile très vigoureuse prospérant dans tous les terrains secs et arides et sur les sols en friches où sa souche repousse abondamment et drageonne facilement (**Bhouri et al., 2010**).

Le lentisque se rencontre dans toutes les parties chaudes de la méditerranée de l'Europe, de l'Asie, de l'Afrique jusqu'au Canaries (Al-Saghir, 2006).

En Algérie, *Pistacia lentiscus* est très répandue dans tout le littoral et le bassin de la soummam, les régions sub-littorales et jusqu'au Sahara (Belhadj, 2002).

I.5. Constituants chimiques

Comme d'autres plantes du genre *Pistacia*, le lentisque contient des centaines de substances chimiques actives. L'analyse phytochimique de la composition chimique des feuilles indique la présence de composés phénoliques à savoir les acides phénoliques notamment l'acide gallique et ses dérivés glycosylés, les flavonoïdes dont les flavones (luteoline) (Djeridane et al., 2007; López-Lázaro, 2009), (le tricine et chysolérol), les flavonols (le myricétine, la quercétine et le kaempférol), des hétérosides (l'orientine, l'isoorientine, la vitexine et la rutine) et des anthocyanins (delphinidin 3-O-glycoside et cyaniding 3-O-glucoside) (Benhammou et al., 2008; Hamlat et Hassani, 2008), mais aussi des tannins (Wei et al., 2002; Addelwahed et al., 2007; Rogosic et al., 2008).

En outre, il a été rapporté que les parties aériennes sont extrêmement riches en monoterpènes, tels que le myrcène, α -pinène, Terpinen-4-ol, limonène, longifolène, β -caryophellène, D-germacrène, δ -caryophyllène, δ -cadinène, α -cadinol, β -bisabolène, β -bourbonène et oxyde de caryophyllène (Castola et al., 2000; Amhamdi et al., 2009) mais aussi β -pinène, α -phellandrène, sabinène, para-cymène et γ -terpinène (Castola et al., 2000; Fernandez et al., 2000; Dogan et al., 2003; Duru et al., 2003; Benhammou et al., 2008; Gardeli et al., 2008).

De même, les fruits sont aussi riches en tannins, en monoterpènes (myrcène, α -pinène et limonène) (Baba-Aïssa, 1999; Castola et al., 2000), en flavonoïdes et les dérivés de galloyl incluant galloyl-glucosides, ellagitannins et acide galloyl-quinic (Bhourri et al., 2010) et en acides phénoliques, notamment l'acide gallique (Addelwahed et al., 2007). On trouve aussi les acides gras insaturés comme l'acide oléique et linoléique (Charaf et al., 2008).

La résine d'odeur forte, en forme jaune qui est obtenue par incision du tronc est formée de 80 à 90% d'acide mastique et de 10 à 20% de masticine (Garnier et al., 1961). L'huile essentielle de mastic est un liquide incolore, d'odeur balsamique très prononcée, cette essence est formée principalement de α -pinène et de β -cymène (Castola et al., 2000) et triterpénoides (Assimopoulou et al., 2005).

I.6. Utilisation

Le lentisque est une plante exsude qui se spécifie par l'utilité de toutes ses parties (feuilles, écorces, graines et résines), elle est utilisée, soit par voie interne, en transcutanée soit en diffusion (Dogan et al., 2003; Ljubuncic et al., 2005; Delille 2007).

I.6.1. Utilisation thérapeutique traditionnelle

Pistacia lentiscus est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité.

La décoction des racines séchées est connue pour son efficacité contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Ouelmouhoub, 2005).

Par ailleurs, la partie aérienne de *Pistacia lentiscus* est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (Scherrer et al., 2005). En plus, les feuilles sont pourvue d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato-protective, expectorante et stimulante (Kordali et al., 2003). Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (Said et al., 2002).

Par ailleurs, la résine obtenue de *Pistacia lentiscus* est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (Abdel Rahman et Soad, 1975; Magiatis et coll, 1999; Dedoussis et coll, 2004; Prichard, 2004).

En Algérie, les feuilles sont mâchées puis appliquées sur des blessures, ses fruits, employés contre les irritations (Baba-Aissa, 1999). Quant aux huiles essentielles, elles sont utilisées dans le traitement des troubles respiratoires (Tounes et al., 2008).

I.6.2. Utilisations industrielles

Cette espèce présente un intérêt économique particulier du fait que les huiles essentielles extraites à partir des feuilles et des rameaux sont utilisées dans la parfumerie, en alimentation et en para-pharmacie (**Longo et al., 2007 ; Amhamdi et al., 2009**).

Pour la résine de *Pistacia*, elle est utilisée dans certains mélanges de cosmétiques et de parfumeries; mais aussi comme ingrédient de matériau de remplissage en dentisterie et en production de dentifrice ; car elle possède, entre autre, la propriété de purifier l'haleine, blanchir les dents et traiter les problèmes de gingivites (**Dogan et al., 2003**).



CHAPITRE II:

Valorisation des résidus agro-alimentaire

II.1.Généralités

Les résidus agro-alimentaires ont longtemps été considérés comme une aubaine nécessitant soit leurs traitements ou bien leurs minimisations en raison des effets environnementaux induits par leur présence. De nos jours, les déchets alimentaires représentent une source de nutraceutiques précieuses (**Schieber et al., 2001**).

Toutefois, le terme "sous-produits alimentaires" est plus utilisé parmi la communauté scientifique pour tenir compte de leur potentiel comme source pour des applications diverses. Par exemple, des phénols et des caroténoïdes à partir de sous-produits de fruits peuvent être appliqués comme agents de conservation des aliments naturels ou de boisson, pouvant prolonger la durée de vie du produit en retardant le rancissement et la formation de saveurs (**Oreopoulou et Tzia, 2007**).

D'autre part, la pectine pourrait être utilisée comme agent gélifiant dans la confiserie ou bien remplaçant sous forme de graisse dans les produits carnés (**Galanakis et al., 2010**). Quant aux fibres insolubles dans l'eau (à savoir l'hémicellulose); ils sont en mesure d'améliorer la régulation intestinale (**Rodriguez et al., 2006**).

En règle générale, les résidus issus de la transformation des fruits et des légumes renferment des teneurs importantes d'antioxydants et de fibres alimentaires.

On peut citer le genre Citrus étant parmi la plus grande récolte de fruits dans le monde entier et des substrats comme les sous-produits de citron ont été appliqués pour la production de la pectine et des flavonoïdes (narirutin) en même temps (**Kim et al., 2004; Masmoudi et al., 2008**).

La peau d'orange a également été utilisée pour la récupération des flavonoïdes (à savoir l'hesperidine), les huiles essentielles et les caroténoïdes (**Chedea et al., 2010; Di Mauro et al., 1999; Farhat et al., 2011**). D'autres sources de caroténoïdes ont été identifiées comme les pelures de carottes, la purée de tomates et de sa peau (**Chantaro et al., 2008; Strati et Oreopoulou, 2011**).

II.2. Techniques d'extraction des composés bioactifs issus des résidus agroalimentaires

La littérature rapporte plusieurs études concernant l'extraction de composés bioactifs à partir des résidus de l'industrie agro-alimentaire à l'aide de plusieurs techniques d'extraction. Il est important de noter que chaque technologie requiert son évaluation vis-à-vis de chaque matière première séparément afin d'aboutir à un rendement optimal avec des coûts plus ou moins économiques (**Patsioura et al., 2011; Galanakis, 2013; Galanakis et al., 2014**).

II.2.1. Extraction par solvant

En général, les résidus de l'industrie agro-alimentaire représentent des sources importantes des composés à haute valeurs ajoutées tels que les polyphénols, les caroténoïdes. L'extraction par solvant se présente comme une technique pratique où le solvant constitue un support physique pour transférer des molécules entre les différentes phases (à savoir solide, liquide et vapeur).

Par exemple, les phénols sont facilement solubilisés dans des solvants protiques polaires tels que des mélanges hydro-alcooliques. En effet, les différentes fractions peuvent être obtenues en faisant varier la concentration d'alcool sur la base de la polarité. En parallèle, les caroténoïdes (à savoir lycopène de la tomate) sont en général hydrophobes et lipophiles, préférant ainsi des solvants aprotiques polaires ou non polaire comme l'acétate d'éthyle ou l'acétone. Dans ce cas, le solvant doit être complètement éliminé de l'extrait pour que ce dernier soit utilisé dans des produits alimentaires (**Galanakis, 2012**).

Au-delà du solvant utilisé, d'autres facteurs sont importants pour l'efficacité d'extraction. Par exemple, la taille des particules impliquées dans le cas d'une extraction solide/liquide, le rapport solvant/solide (S/F) et l'utilisation de plusieurs cycles d'extraction.

Diankov et al., (2011) a rapporté que l'extraction des ressources naturelles antioxydants de zestes de citron est plus rapide avec un rendement plus élevé en utilisant une taille de particule de 1 au lieu de 2 mm.

Rajha et al., (2014) a également conclu que la diminution de la taille des particules augmente la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits obtenus à partir de résidus de jus de raisin. En outre, une augmentation de l'éthanol et le rapport eau / échantillon a entraîné une diminution de la teneur en composés phénoliques dans les extraits.

Lorsque **Stamatopoulos et al., (2014)** ont trouvé qu'une taille de particules inférieure à 0,2 mm diminue le rendement d'extraction des polyphénols de feuilles d'olivier blanchies.

Ce résultat a été attribué au fait que les petites particules ont tendance à s'agglomérer ce qui rends la pénétration du solvant plus lente. En effet, la succession de plusieurs cycles d'extraction pourraient augmenter de manière significative le rendement des polyphénols (**Galanakis, 2012; Tsakona et al., 2012**).

II.2.2. L'extraction par l'enzyme combinée avec de l'acide ou l'alcali

L'application des enzymes au cours des processus d'extraction est devenue de plus en plus populaire en raison de leur aptitude à améliorer le rendement en composés cibles. Ces enzymes agissent sur la paroi cellulaire des déchets végétaux, ce qui augmente la perméabilité de la paroi cellulaire et permet de faciliter le lessivage des composants cellulaires de haute valeur ajoutée comme les pigments.

Dans l'industrie du jus de raisin et de jus de fruits (traitement des baies), de la peau ou de l'écorce, les résidus sont très riches en anthocyanes pouvant être récupérés à partir en utilisant du méthanol/eau acidifié. Son application avant le traitement enzymatique permet d'améliorer l'efficacité de l'extraction de ces pigments. Les complexes enzymatiques les plus étudiés concernent Pectinex BE3-L (pectinesterase, pectinolyase, hémicellulase...), Vinozyme C (pectinase ...), et Vinozym G (pectinolyase, polygalacturonase,...) (**Munoz et al., 2004**).

II.2.3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique récente développée dans le but de réduire le temps d'extraction, de diminuer la consommation de solvants, d'augmenter le rendement en extraction et d'améliorer la qualité des extraits (**Chemat et al., 2013**)

Plusieurs études utilisant l'extraction par solvant assistée par micro-ondes « *Microwave-assisted solvent extraction* » (MASE) pour la récupération des déchets alimentaires ont été rapportées dans le tableau suivant (Tableau II):

Tableau I: Certaines applications de micro-ondes pour le recouvrement des composés précieux des résidus agro-alimentaires

| Déchets alimentaires | composé cible | Rendement (Composé cible par extrait total) | Références |
|--|---|--|---------------------------|
| Graines <i>Vitis vinifera</i> | total des poly phénols (TP) o- diphénols (OD) Total des flavonoïdes (TF) | Aspirateur micro-ondes hydro diffusion et gravité (VMHG) 500 W pour 500 g de matériel végétal (1 W / g) TP : 108,3 gallique mg équivalent acide / g OD: 47,0 gallique mg équivalent acide / g TF : 47,2 catéchine mg équivalent / g DPPH piégeant une capacité de 78,6 ml d'extrait / mg DPPH | (Alessandro et al., 2010) |
| Oignon jaune (<i>Allium cepa L.</i>) déchets | Quercétine total | 662,27 mg / 100 g de déchets secs DPPH piégeant capacité avec IC50 la valeur de 4,39 mg / mL | (Huma et al., 2011) |
| café filtré | Polyphénoles totale | 398,95 mg de l'acide gallique équivalent / g DPPH piégeant capacité avec IC50 La valeur de 3,75 mg / ml | (Pavlovic' et al., 2013) |
| déchets de pépins de raisin (<i>Vitis vinifera</i>) | Total des composés phénoliques (TP) Total des flavonoïdes (TF) Total pro anthocyanidines (TPA) | TP: 82.7 mg/g TF: 52.6 mg/g TPA: 30.7 mg/g | (Dang et al., 2013) |
| couennes de fruits <i>Citrullus lanatus</i> | Pectine | 25,79 g de pectine sèche pour 100 g de C. <i>lanatus</i> déchets de couennes de fruits | (Prakash et al., 2014) |
| Déchets issus de : - asperges - cauliflower - céleri - chicorée | total des composés phénoliques | Contenu (gallique mg équivalent acide / kg de matériel frais) : - Asperges : 245 ± 16 - Cauliflower: 486 ± 8 - Céleri : 155 ± 13 - Chicorée : 392 ± 32 | (Baiano et al., 2014) |
| pelures de fruits (<i>passiflora edulis f. flavicarpa</i>) | Pectine | - Exprimée en g / 100 g passion écorces de fruits - L'acide nitrique : 13 - Acide acétique : 12,9 - Acide tartrique : 18.2 | (Seixas et al., 2014) |

Dans ce cas, l'énergie des micro-ondes est utilisée pour produire le mouvement et la rotation des dipôles moléculaires, ce qui provoque un échauffement rapide du solvant ou de l'échantillon, ou les deux.

Les principaux exemples comprennent le total des composés phénoliques à partir de déchets végétaux (Alessandro *et al.*, 2010; Baiano *et al.*, 2014; Pavlovic' *et al.*, 2013) et de la pectine (Prakash *et al.*, 2014; Seixas *et al.*, 2014).

II.2.4. Vapodistillation et hydrodistillation

La distillation par la vapeur est un processus utilisé pour la récupération des composés volatils des matrices inertes et complexes, solide ou liquide, utilisant la vapeur saturée ou surchauffée comme agent de séparation et d'énergie (Cerpa *et al.*, 2008).

Elle se présente comme la méthode la plus utilisée pour obtenir une huile essentielle à partir de sources naturelles. Ces huiles essentielles sont utilisées comme additifs alimentaires, les arômes naturels et / ou des agents de conservation, et dans le domaine cosmétique et pharmaceutique, en raison de leur antimicrobienne remarquable, un antioxydant, et des propriétés anti-inflammatoires (Imelouane *et al.*, 2009;).

Peu d'études ont exploré l'extraction d'huile essentielle à partir de déchets d'agrumes par diffusion de vapeur d'eau seule ou en combinaison avec une autre technique, comme les micro-ondes. Le limonène (un hydrocarbure monoterpène) est le composant le plus abondant présent dans l'huile essentielle extraite de peaux d'agrumes et ayant des propriétés antibactériennes (Farhat *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009).

Le tableau suivant montre que les rendements de la diffusion de la vapeur seule sont comparables à ceux réalisés en combinaison avec une technique plus coûteuse et complexe (comme l'extraction sous micro-ondes) pour récupérer l'huile essentielle à partir d'agrumes.

Tableau II: Certaines applications de la distillation à la vapeur sur le recouvrement des composés précieux de déchets alimentaires

| Résidus | Composé cible | Conditions opérationnelles | Rendement (%) | Références |
|--|-------------------------------|--|--|------------------------------|
| La peau d'orange (<i>Citrus sinensis</i> <i>L.Osbeck</i>) | Huile essentielle Limonène | Distillation accélérée par micro-onde (MAD) 1000 W, 100°C, 30 min Hydrodistillation (HD) – 2 L of water, 180 min | MAD: 0.42 ± 0.02% HD: 0.39 ± 0.02% MAD: 76.7% HD: 78.5% | (Ferhat et al., 2006) |
| La peau d'orange (<i>Citrus sinensis</i> <i>L.Osbeck</i>) | Huile essentielle Limonène | Distillation par la vapeur de micro-onde (MSD) – 1000 W, 100°C, 12 min Distillation par la vapeur sèche (SD) – 40 min | MSD: 1.54% SD: 1.51% MSD: 94.88% SD: 95.03% | (Farhat et al., 2011) |

(MAD): Microwave accelerated distillation (MSD): Microwave steam distillation (SD): Dry steam distillation



Partie expérimentale



CHAPITRE III:
Matériels et méthodes

Notre travail a été effectué au sein des laboratoires de Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), institut de recherche à Bou Ismaïl, Algérie, et les tests microbiologique ont été effectués au niveau de laboratoire d'hygiène de wilaya de BLIDA durant une période de 6 mois allant de 1 Mars jusqu'à 1 Septembre 2016.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel végétal

L'objectif de cette étude étant la valorisation des résidus des fruits de lentisque (*Pistacia lentiscus*) issus de la production de l'huile. Les baies mûres de *Pistacia lentiscus* ont été récoltées en novembre 2015 dans les régions aux environs immédiat de l'oued djendjen de la région de Taher, située à l'est de Jijel (Algérie).



Figure 3: Résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*

III.2. Méthodes :

III.2.1. Protocole d'extraction des métabolites secondaires

Dans cette étude, une quantité de 800g de matériel végétal est mise à macérer à température ambiante dans du méthanol. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant chaque 24 heure. Après concentration à une température n'excédant pas 35°C, l'extrait MeOH est dilué avec de l'eau distillée.

Cette dernière subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le CHCl_3 , puis l'AcOEt et en dernier le n-buOH avec des quantités de 3x250mL (Figure 5).

Les trois phases organiques ainsi obtenues (CHCl_3 , AcOEt et *n*-buOH) sont séchées, puis filtrées. Après, elles sont concentrées à sec sous pression réduite.

Nous remarquons l'obtention de cristaux : une couche de produits tapissant la paroi de l'ampoule à décanter après l'extraction avec le CHCl_3 . Ils sont insolubles dans le CHCl_3 et solubles dans le MeOH.

Pour la suite, nous nous sommes intéressés seulement à l'extrait au CHCl_3 .

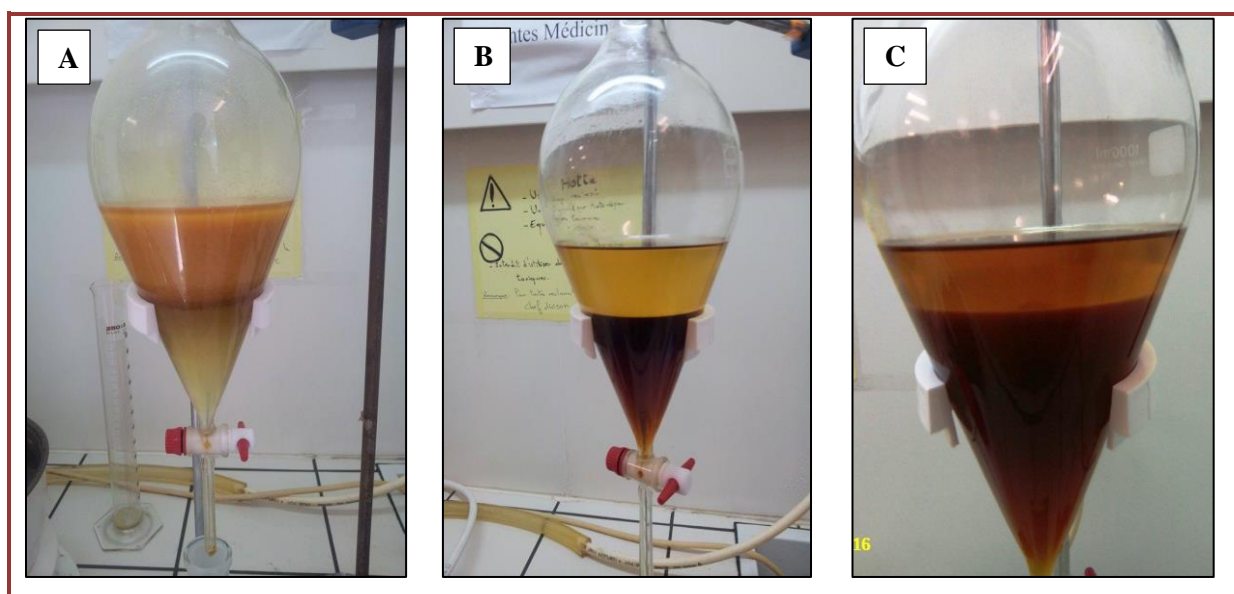


Figure 4: La séparation des phases de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. A. Extrait CHCl_3 . B. Extrait AcOEt. C. Extrait *n*-buOH.

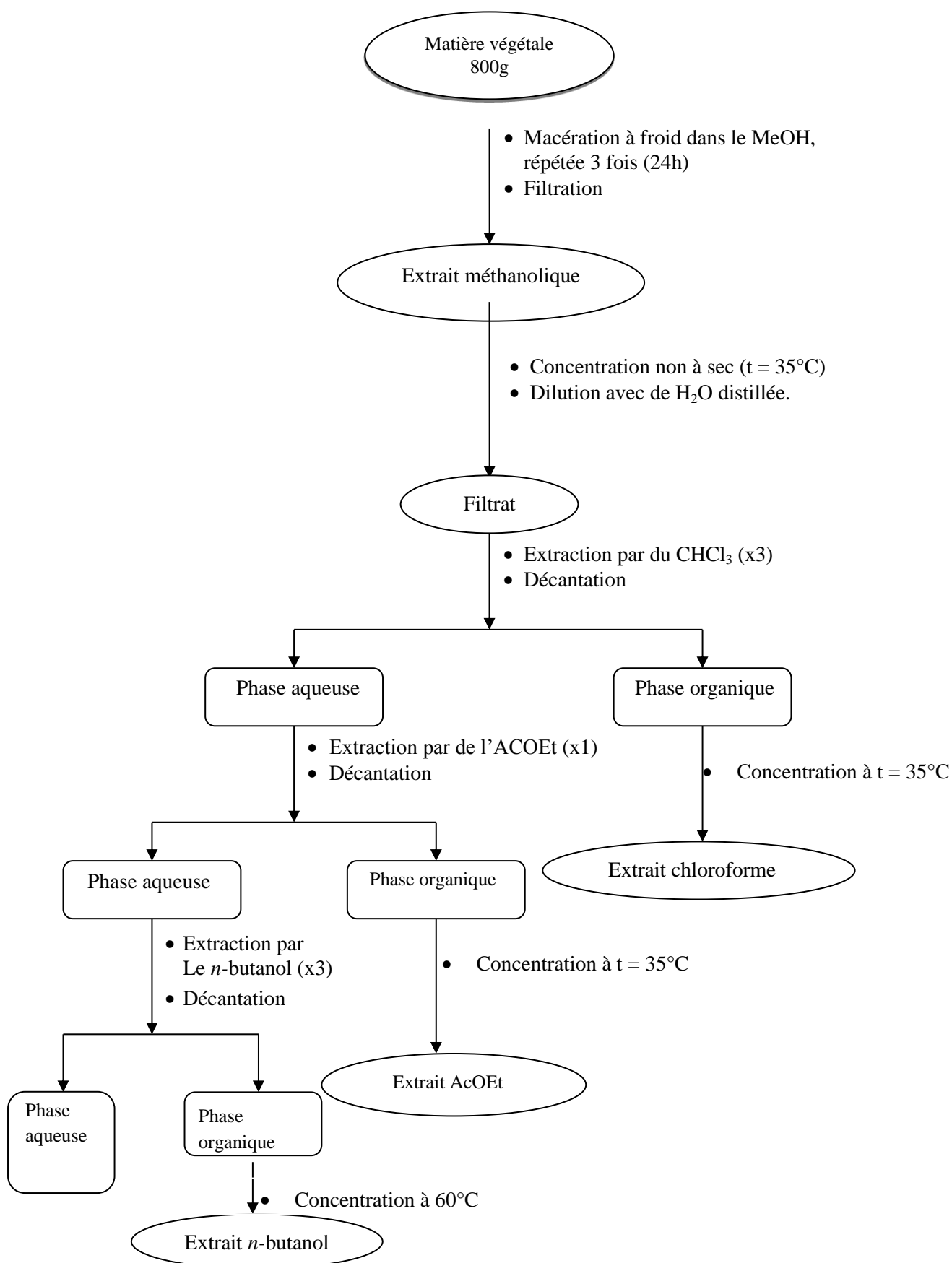


Figure 5: Différentes étapes d'extraction et de séparation des phases issus de l'extrait méthanolique des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*

III.2.2. Séparation des métabolites secondaires de l'extrait chloroforme

L'extrait au CHCl_3 est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolation des molécules pures.

III.2.2.1. Chromatographie sur couches minces (CCM)

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de gel de cet extrait, nous avons procédé à des tests CCM de gel de silice pour choisir le meilleur système d'élution. Pour cette étape, plusieurs systèmes solvants ont été testés. Nous avons choisi ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

Les systèmes testés :

Dichloroforme / acétone (9 :1) (6 :1)

Ether de pétrole / méthanol (3 :1)

Dichloroforme / méthanol (9 :1)

Le système choisi :

Dichloroforme / méthanol (9 :1)

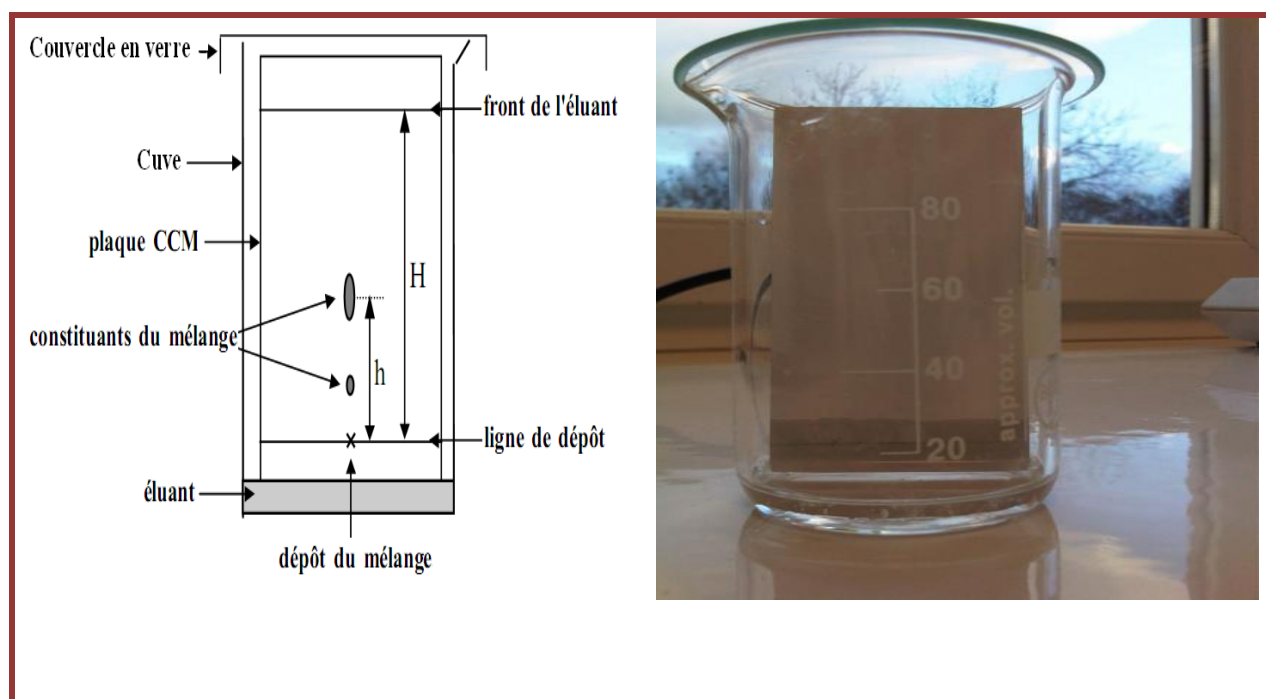


Figure 6: Schéma représentatif du dispositif de la CCM.

III.2.2.2. Fractionnement sur colonne de l'extrait chloroforme

Un premier fractionnement de l'extrait CHCl_3 de *Pistacia lentiscus* 6g a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice de granulométrie la plus fine (0.04mm - 0.063mm). Dans notre cas, la colonne utilisée a les dimensions suivantes : diamètre = 2,4cm / hauteur = 43cm / Volume exacte de la colonne = 194cm^3 (Figure 7)

Préparation de la colonne

Un mélange homogénéisé de la silice et du chloroforme est versé lentement dans la colonne pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche homogène de 40 à 41cm de hauteur. L'extrait sec au CHCl_3 est dissout dans de l'acétone et est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le dichloroforme. La masse de silice utilisée correspond approximativement à 30 fois le poids de l'extrait à séparer (180g). L'élution a été réalisée par du dichloroforme enrichi progressivement en MeOH.

Le robinet de la colonne est alors ouvert et le solvant s'écoule lentement pour favoriser le tassement de l'adsorbant car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulles d'air.

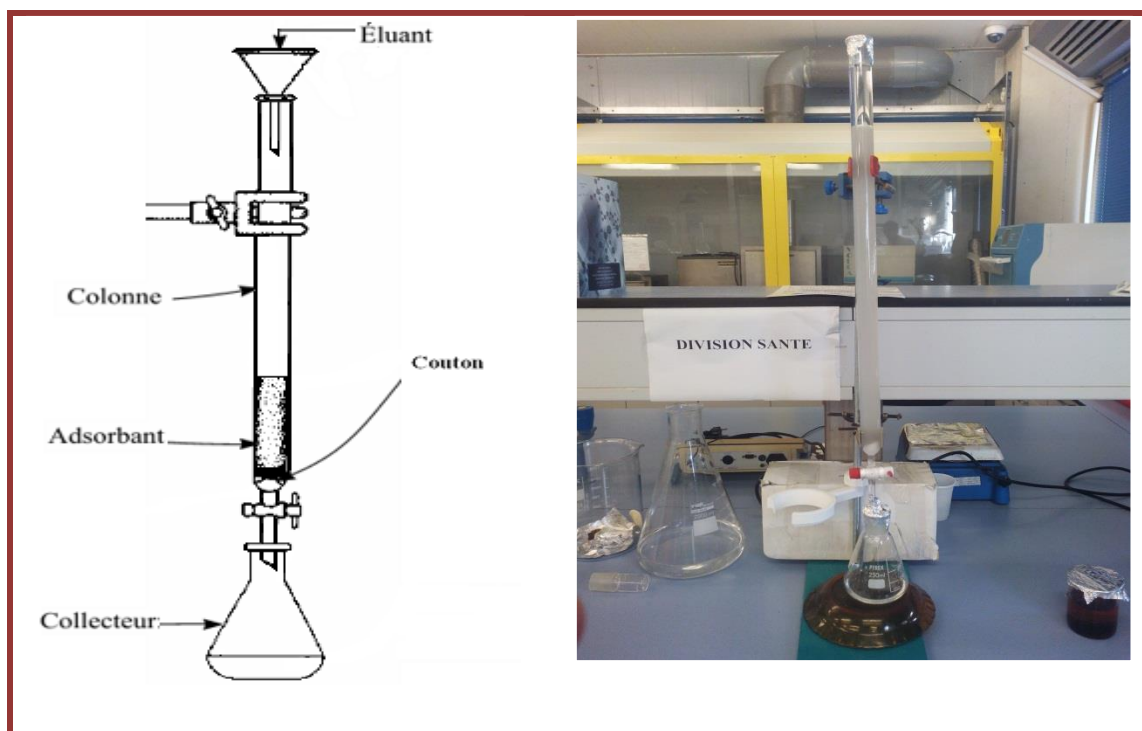


Figure 7: Schéma représentatif du dispositif de la chromatographie sur colonne.

Les fractions obtenues sont ensuite évaporées à sec à l'aide d'un évaporateur rotative (Rotavapor) ; puis ces fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil CCM de gel de silice (visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm).

Les systèmes testés

Chloroforme / acétone (3 :2) (3 :1) (10 :1) (9 :1)

Dichloroforme / acétone (3 :1) (4 :1) (6 :1) (9 :1)

Cyclohexane / acétone (1 :1) (2 :1) (3 :1) (3 :2)

Le système choisi:

Cyclohexane / acétone (3 :2)

III.2.3. Identification des composés majoritaires dans les fractions

Dans cette étude, nous avons pu réaliser l'identification de plusieurs fractions à l'aide de l'analyse chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) muni d'une banque de données de spectres SM facilitant l'identification des composés présents dans ces fractions. Cette technique est réservée à l'analyse de molécules aisément vaporisables et thermiquement stables, c'est-à-dire en première approximation de composés de poids moléculaires faible à moyen. Dans la présente étude, les conditions opératoires d'analyse utilisées sont représentées au tableau III

Tableau III : Conditions opératoires des analyses en CG/SM

| | |
|---------------------------------------|---|
| - Nom de la méthode | HE-DN 5MS |
| - Température Injecteur | 250°C |
| - Mode d'injection | Split 80:1 |
| - Volume injecté | 0.2 µL |
| - Type Colonne | DN-5-MS |
| - Dimensions | longueur 30 m, diamètre interne 0.25 mm, épaisseur film 0.25 µm |
| - Phase stationnaire | 5% phényle, méthyle polysiloxane |
| - Température du four | 60°C pendant 8 min, palier °C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min |
| - Temps d'analyse | 113 min |
| - Gaz vecteur | Hélium pur |
| - Débit GV | 0,5 mL/min |
| - Mode d'analyse (détecteur de masse) | Scan (de 35 à 550) |
| - Solvant utilisé | Heptane |
| - Délai du solvant | 3.5 min |
| - Température de l'interface | 280°C |
| - Type d'ionisation : | Impact électronique |
| - Intensité du filament | 70 eV |
| - Type de l'analyseur de masse | Temps de vol |

III.2.4. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits de *Pistacia lentiscus*

L'étude de l'activité consiste à tester les effets antimicrobiens des extraits après évaluation par l'aromatogramme. Ceci a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ; suivant les recommandations de NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards) et recommandé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en utilisant des disques stériles de 9mm.

Principe de la méthode de diffusion sur milieu gélose:

La méthode consiste à déposer un disque en papier absorbant de 09 mm de diamètre imprégné de la substance à tester sur une boîte de géloseensemencée de culture microbienne à étudier.

Cette substance au cours de l'incubation diffuse sur la surface de la gélose à partir du disque et un gradient décroissant de concentration s'établit autour du disque donnant à la fin de l'incubation un halo clair autour du ce dernier ; c'est la zone d'inhibition

Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en mm est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon

➤ Souches microbiennes:

Les bactéries, levures et moisissures utilisées sont représentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Origine et références des souches testées.

| Les souches microbiennes | Origine | Gram | Provenance |
|---------------------------------|------------|------|--|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ECBU | - | ECBU et les germes hospitalier (laboratoire d'hygiène Blida) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Eau | - | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | Eau | - | |
| <i>Serratia spp.</i> | Eau | - | |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 6633 | + | laboratoire d'hygiène (Blida). |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | + | laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire (Frantz Fanon) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | - | |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | - | |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC2091 | | laboratoire d'hygiène (Blida). |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Miel | | |
| <i>Aspergillus Niger</i> | | | |

ATCC: American Type Culture Collection

➤ **revivification des souches bactériennes**

La purification se fait par l'ensemencement de ces souches sur des milieux spécifiques qui ont été ensemencés par la méthode des stries afin d'obtenir des colonies isolées pourront servir à préparer l'inoculum bactérien.

➤ **Préparation des suspensions bactériennes :**

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile, racler 2 à 3 colonies bien isolés et identiques à partir d'une culture pure de 24 heures d'incubation sur milieu d'isolement.
- Diluer dans 05 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.
- Il faut noter que l'inoculum bactérien peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort, et il doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

➤ **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée.
- L'essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, à la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur périphérique de la boîte de Pétri.
- Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes

➤ **Préparation des extraits à tester**

A l'aide d'une micropipette, on prélève un volume de chaque extrait ou fraction préparée et furent dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (1%).

Notes: Les volumes additionnés sont:

- Pour les extraits : deux concentrations (200mg ; 500mg) ont été testées pour les extraits MeOH, CHCl₃ et celui d'AcOEt.
- Pour les fractions: une seule concentration de 100mg a été testée

➤ Dépôt des disques :

- A l'aide d'une pince stérile, nous avons prélevé à chaque fois un disque stérile. Ce dernier est imbibé avec l'extrait en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'extrait. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Nous avons déposé les disques sur la surface du milieu de culture.
- Des répétitions ont été réalisées pour chaque essai.
- Les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

➤ Expression des résultats

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 9 mm).



CHAPITRE IV:

Résultats et discussions

IV.1. Rendement d'extraction :

Les rendements d'extraction des différents solvants à partir des résidus de fruits obtenus par la méthode sélectionnée pour la présente étude sont rapportés dans le tableau suivant:

Tableau V: Rendements des extraits

| Matière végétative | Extraits | Masse (g) | Rendement (%) |
|--------------------|------------------|-----------|---------------|
| 800g | Chloroformique | 6,7452 | 0,84 |
| | Acétate d'éthyle | 3,5309 | 0,44 |
| | n-butanol | 3,1210 | 0,39 |

D'après les résultats obtenus (tableau V), l'extrait CHCl_3 de *Pistacia lentiscus* représente le rendement le plus élevé (0,84 %), ceci peut être attribué au fait que la grande majorité des composés de ces résidus sont solubles dans l'acide CHCl_3 et ce qui signifie sa richesse en composés apolaires et que la majeure partie des composés de l'extrait MeOH des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* se retrouvent dans l'extrait aqueux CHCl_3 suivi par l'extrait AcOEt qui représente un rendement de (0,44%) et pour l'extrait n-buOH on a enregistré un rendement de (0,39%).

Nous constatons aussi d'après nos résultats que les extraits apolaires (CHCl_3 et AcOEt) ont donné des proportions élevées en comparaison avec les extraits polaires (n-buOH).

Selon nos résultats nous remarquons que le rendement des extraits des résidus fruits de *Pistacia lentiscus* est acceptable, cela est dû à la richesse des fruits en composés extractibles. Selon **Maha Hafez, (2010)** la nature de l'organe utilisé dans l'extraction de l'huile essentielle et les extraits influence son rendement et sa composition chimique.

IV.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique

Nous avons réalisé un fractionnement de l'extrait par chromatographie sur colonne de silice. L'éluent utilisé qui donne la meilleure séparation est composé de dichloroforme / méthanol (9 :1).

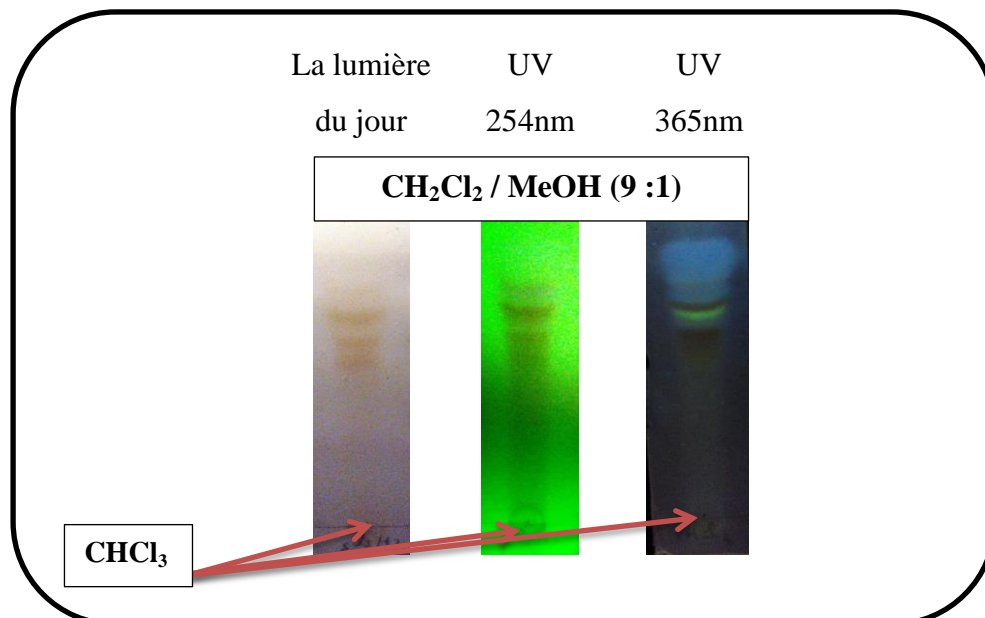


Figure 8 : Chromatogramme de l'extrait CHCl₃ par le système dichloroforme / méthanol (9 :1).

Les fractions chromatographiques de l'extrait CHCl₃ ont été séparées par CCM, ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm.

Le développement de la CCM commence par le choix de la phase mobile de séparation. Un système solvant a été utilisé qui donne la meilleure séparation c'est le système cyclohexane / acétone (3 :2)

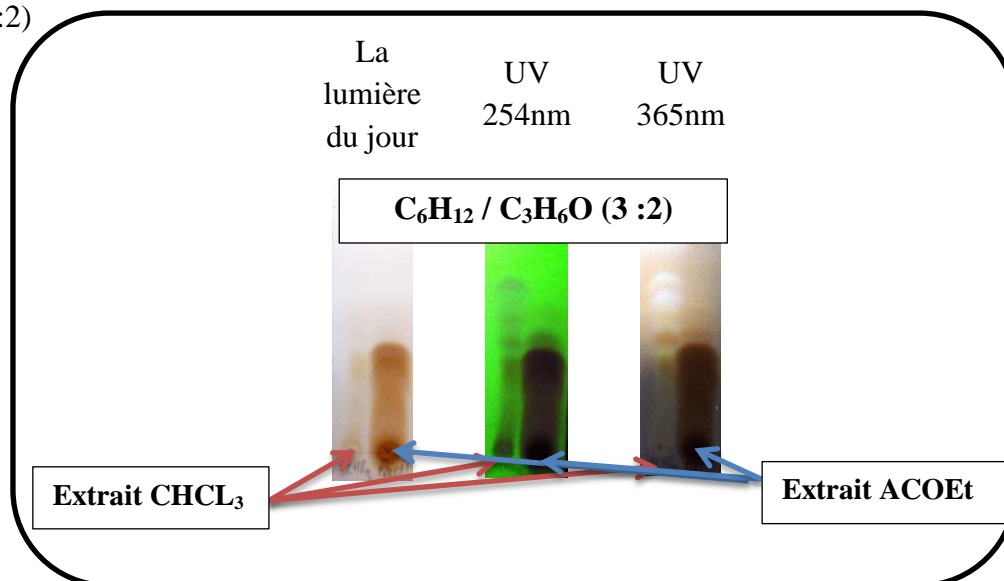


Figure 9: Chromatogramme des deux extraits CHCl₃ et AcOEt par le meilleur système cyclohexane / acétone (3:2).

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure ci-après:

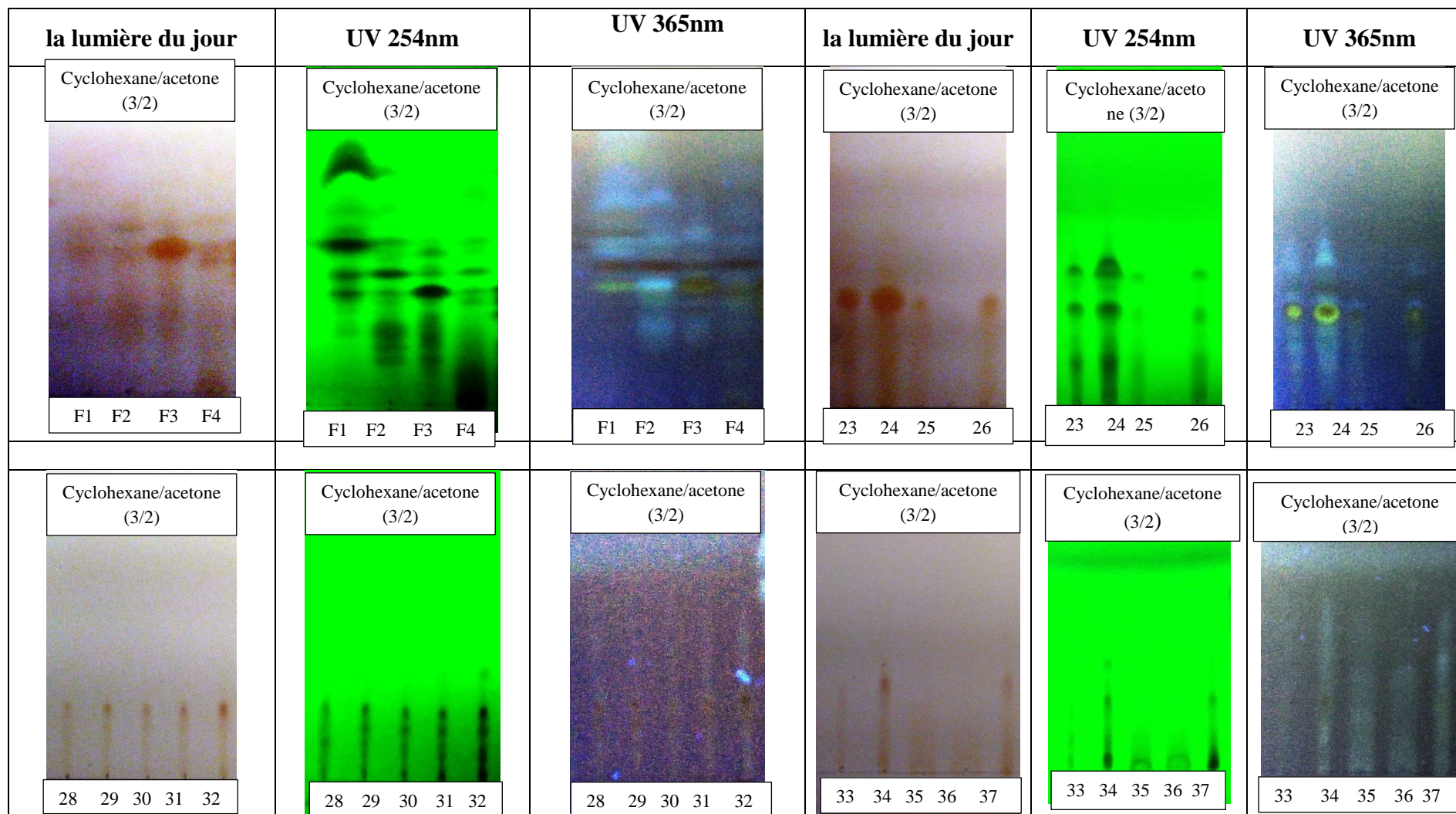


Figure 10: Chromatogramme de différentes fractions issues de l'extrait CHCl_3

Selon la figure (10) ; Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice donc nous avons recherché les différents lots testés qui migrent au même niveau et sont séparés dans le même ordre en révélant différentes taches, donc le profil chromatographique de ces lots est remarquablement similaire ou presque identique.

D'après cette comparaison des chromatogrammes, nous avons récupéré 18 fractions présentées ci-dessous :

Tableau VI: Résultats du fractionnement de l'extrait CHCl_3 par la chromatographie sur colonne.

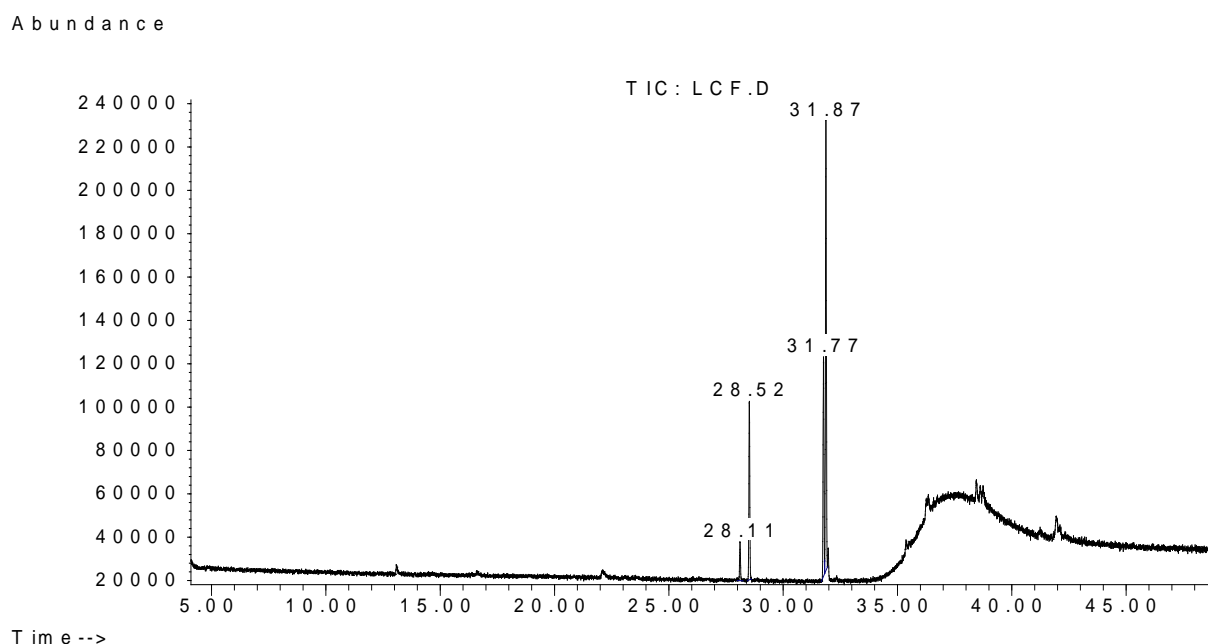
| Lots 50ml | Fractions | Système d'élution | | Lots 50ml | Fractions | Système d'élution | |
|--------------|----------------|----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2\%$ | $\text{MeOH}\%$ | | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2\%$ | $\text{MeOH}\%$ |
| 1-8 | F ₁ | 98 | 2 | 38-43 | F ₁₀ | 90 | 10 |
| 9-12 | F ₂ | 98 | 2 | 44-54 | F ₁₁ | 85 | 15 |
| 13-15 | F ₃ | 98 | 2 | 55-64 | F ₁₂ | 75 | 25 |
| 16-19 | F ₄ | 98 | 2 | 65-68 | F ₁₃ | 50 | 50 |
| 20-22 | F ₅ | 98 | 2 | 69 | F ₁₄ | 50 | 50 |
| 23-26 | F ₆ | 98 | 5 | 70-72 | F ₁₅ | 0 | 100 |
| 27-30 | F ₇ | 95 | 5 | 73 | F ₁₆ | 0 | 100 |
| 31-33 | F ₈ | 95 | 5 | 74-81 | F ₁₇ | 0 | 100 |
| 34-37 | F ₉ | 90 | 10 | 82-88 | F ₁₈ | 0 | 100 |

IV.3. Identification par GC-MS :

La composition chimique des extraits et des fractions été établie par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS.

Interprétation sur le spectre de masse GC-MS a été réalisée en utilisant la base de données du National Standard Institute et de la technologie (NIST).

Les tableaux et les chromatogrammes suivants résumant l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions.

➤ **Extrait CHCl₃ :****Figure 11:** Chromatogramme GC/MS de l'extrait CHCl₃**Tableau VII:** Proportions des composés majoritaires de l'extrait CHCl₃

| TR min | Nom du composé | MM | Formule brute | Prob% | aire de pic % |
|--------|---|-----|--|-------|---------------|
| 28.520 | Acide pentadécanoïque, 14-méthyl-, ester méthylique | 270 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 97 | 20.555 |
| 31.764 | Acide 9,12-octadécadiénoïque, ester méthylique, (E, E)- | 294 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 99 | 25.465 |
| 31.875 | acide 6-octadécénoïque, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 99 | 53.980 |
| | Acide 8-octadécénoïque, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 99 | 53.980 |

TR : Temps de Rétention ; Prob : Probabilité ; MM : Masse Moléculaire

L'analyse GC-MS a fourni différents pics déterminant la présence de trois composés phytochimiques différents à savoir l'acide pentadécanoïque, 14-méthyl-, ester méthylique (20.555%) ; l'acide 9,12-octadécadiénoïque, ester méthylique, (E, E)- (25.465%) et nous avons trouvé de même indice de similarité (99%) avec acide 6-octadécénoïque, ester méthylique et l'acide 8-octadécénoïque, ester méthylique (53.98%).

Identification des fractions :

➤ F1

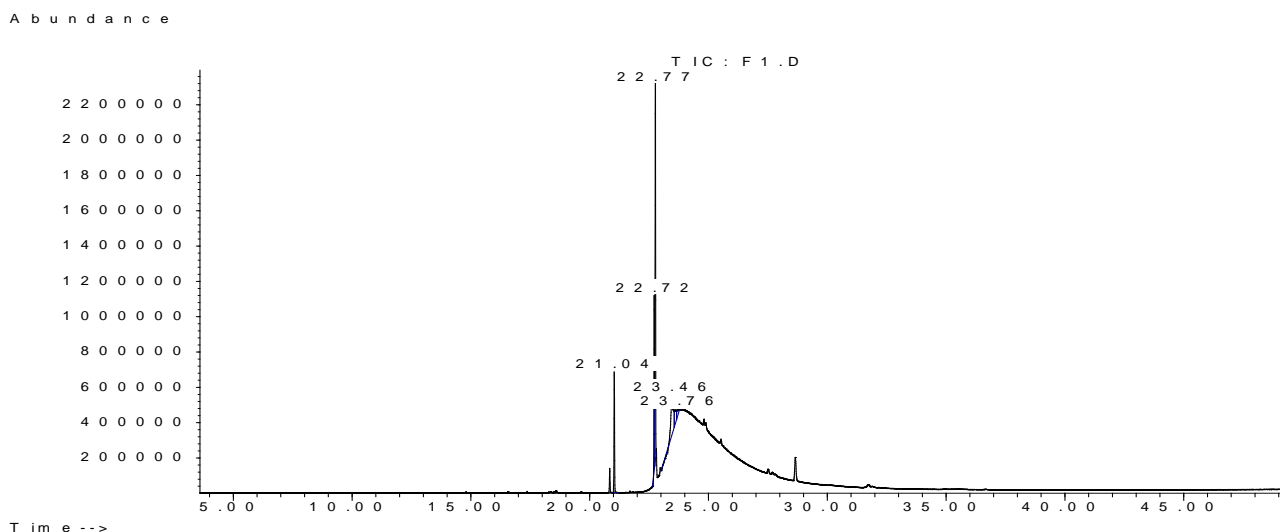


Figure 12: Chromatogramme GC/MS de la fraction F1

Tableau VIII : Proportions des composés majoritaires de la fraction F1

| TR min | Nom du composé | MM | Formule moléculaire | Prob % | aire de pic % |
|--------|--|-----|--|--------|---------------|
| 20.844 | acide 7-hexadécénoïque, ester méthylique, (Z)- | 268 | C ₁₇ H ₃₂ O ₂ | 99 | 0.380 |
| 21.037 | acide hexadécénoïque, ester méthylique | 270 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 97 | 1.680 |
| 22.714 | acide 8,11-octadécadiénoïque, ester méthylique | 294 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 99 | 1.105 |
| 22.767 | acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 99 | 9.653 |
| 23.456 | 9,17-octadécadiénel, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 93 | 12.389 |
| 23.596 | acide oléique | 282 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 89 | 3.481 |
| 23.760 | 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) - | 280 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 92 | 0,866 |
| 23.881 | 9,17-octadécadiénel, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 91 | 9.750 |
| 23.948 | acide oléique | 282 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 95 | 27.418 |
| 24.811 | 9,17-octadécadiénel, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 91 | 3.002 |
| 24.888 | 9,17-octadécadiénel, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 95 | 13.859 |
| 25.529 | 9,17-octadécadiénel, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 93 | 16.176 |
| 27.510 | 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) - | 294 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 91 | 0.239 |

TR : Temps de Rétention ; Prob : Probabilité; MM : Masse Moléculaire

Analyse de la fraction F1 par GC-MS a permis l'identification de 7 composés différents. Liste des identifiés sont présentés dans le tableau VIII. Les principaux composés détectés dans la fraction F1 étaient acide 7-hexadécénoïque, ester méthylique, (Z)- (0.380%); acide hexadécénoïque, ester méthylique (1.680%); acide 8,11-octadécadiénoïque, ester méthylique (1.105%); acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique (9.653%) ; 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) - (1.105%) suivi par 2 composés majoritaire l'acide oléique (30.899%) et 9,17-octadécadiénel, (Z) - (55,176%).

➤ F2

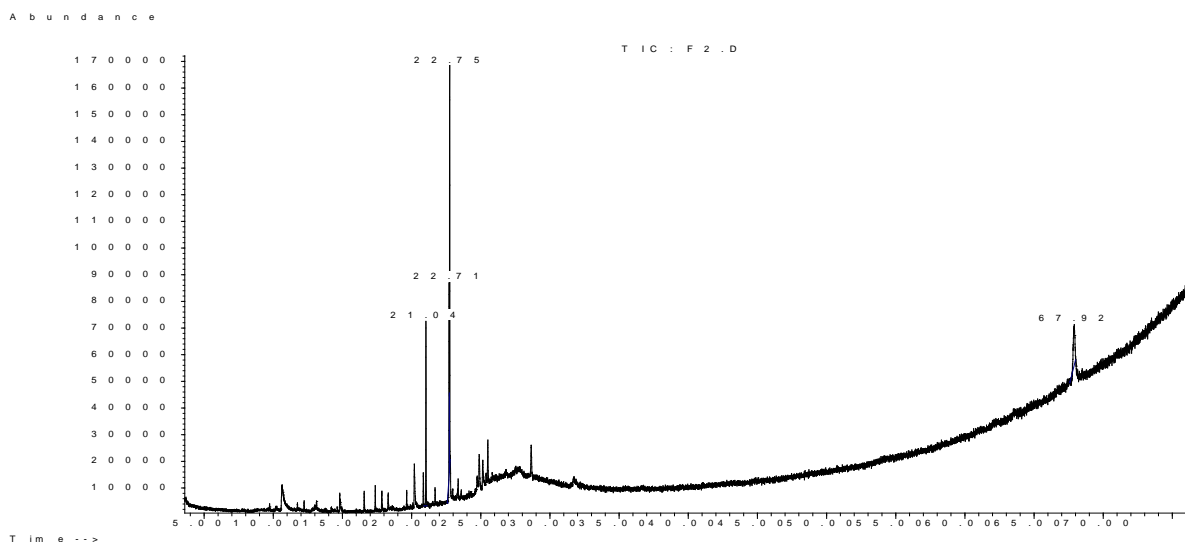


Figure 13: Chromatogramme GC/MS de la fraction F2

Tableau IX : Proportions des composés majoritaires de la fraction F2

| TR min | Nom du composé | MM | Formule moléculaire | Prob % | aire de pic % |
|--------|---|-----|--|--------|---------------|
| 21.035 | Acide pentadécanoïque, 14-méthyl-, ester méthylique | 270 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 97 | 12.130 |
| 22.707 | acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) -, ester méthylique | 294 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 98 | 4.535 |
| | acide 9,12-octadécadiénoïque, ester méthylique, (E, E)- | 294 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 98 | 4.535 |
| 22.751 | acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 99 | 45,447 |
| | acide 7-octadécénoïque, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 99 | 45,447 |

TR : Temps de Rétention ; Prob : Probabilité; MM : Masse Moléculaire

Nos résultats a permis identifié 3 composés majoritaire , l'ester méthylique d'acide à savoir deux composés acide 9-octadécénoïque (Z) -, acide 7-octadécénoïque, ester méthylique de même indice de similarité (99%) suivi par acide pentadécénoïque , 14-méthyl-, ester méthylique se sont révélés être important dans cette fraction de 45.447% et 12.13% de surface de pic, respectivement et contient aussi avec même IS (98%) acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) -, ester méthylique et acide 9,12-octadécadiénoïque, ester méthylique, (E, E)- (4.535%).

➤ F3

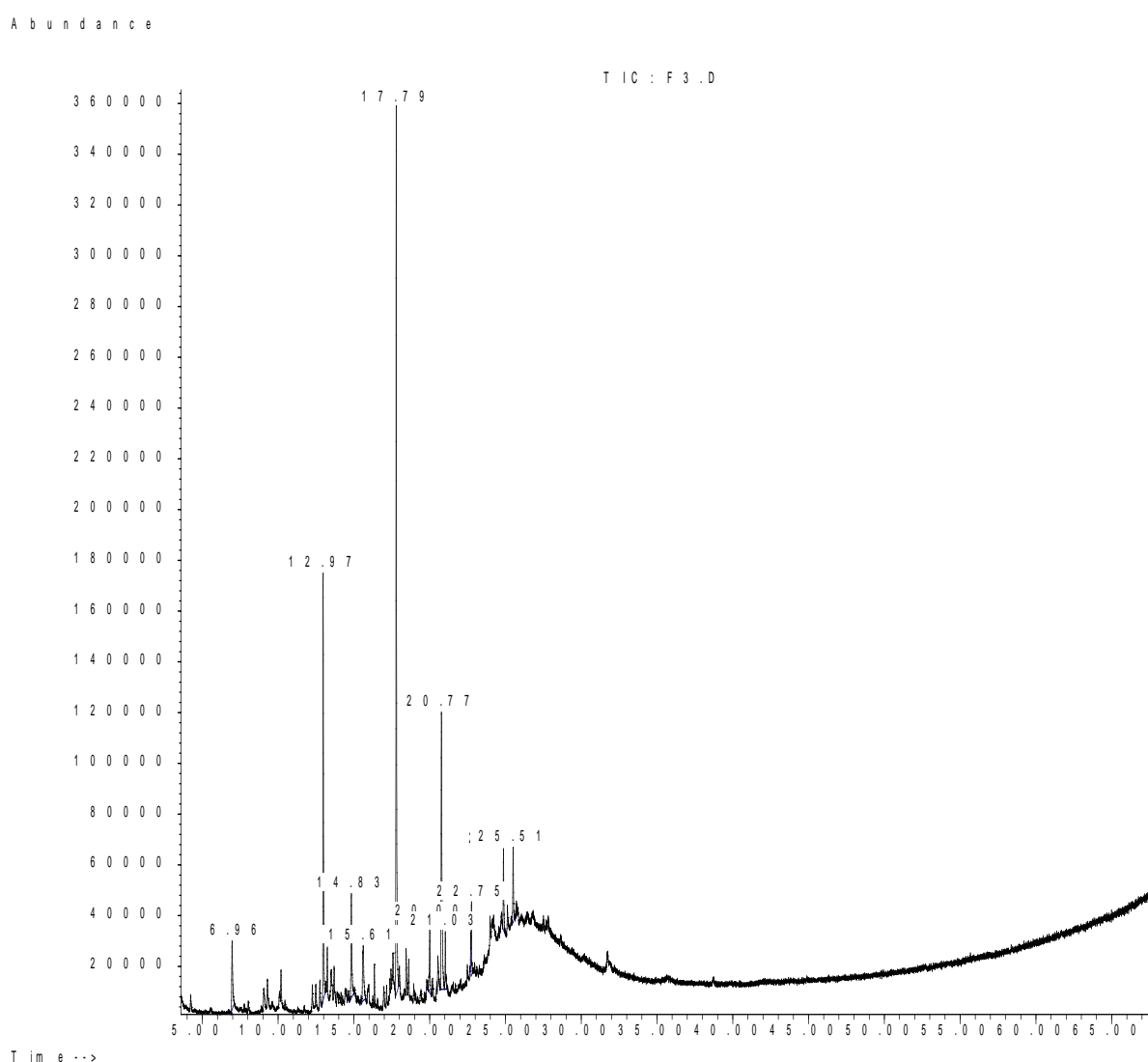


Figure 14: Chromatogramme GC/MS de la fraction F3

Tableau X : Proportions des composés majoritaires de la fraction F3

| TR min | Nom du composé | MM | Formule moléculaire | Prob % | aire de pic % |
|--------|---|-----|--|--------|---------------|
| 6.966 | 2-heptéнал, (Z) - | 112 | C ₇ H ₁₂ O | 64 | 3.276 |
| 17.796 | Tétrahydrofuran-2-one, 5- [1-hydroxyhexyl] - | 186 | C ₁₀ H ₁₈ O ₃ | 91 | 25.068 |
| 20.003 | 2-cyclohexène-1-one, la 4-hydroxy-3, 5,5-triméthyl-4- (3-oxo-1-butényl) - | 222 | C ₁₃ H ₁₈ O ₃ | 86 | 3.334 |
| 21.034 | acide hexadécénoïque, ester méthylique | 270 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 93 | 2.515 |
| 22.750 | 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 94 | 2.678 |
| 24.871 | acide 9-hexadécénoïque, ester méthylique, (Z)- | 268 | C ₁₇ H ₃₂ O ₂ | 52 | 3.18 |

TR : Temps de Réention ; Prob : Probabilité; MM : Masse Moléculaire

Les résultats ont révélé que la présence de 6 composés, un composé majoritaire Tétrahydrofuran-2-one, 5- [1-hydroxyhexyl] - (25.068%) et 5 constituants mineurs ont également été identifiés comme: 2-cyclohexène-1-one, la 4-hydroxy-3,5,5-triméthyl-4- (3-oxo-1-butényl) - (3.334%) 2-heptéнал, (Z) - (3.276%); acide 9-hexadécénoïque, ester méthylique, (Z)- (3.18%); 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique (2.678%) et acide hexadécénoïque, ester méthylique (2.515%)

➤ F9

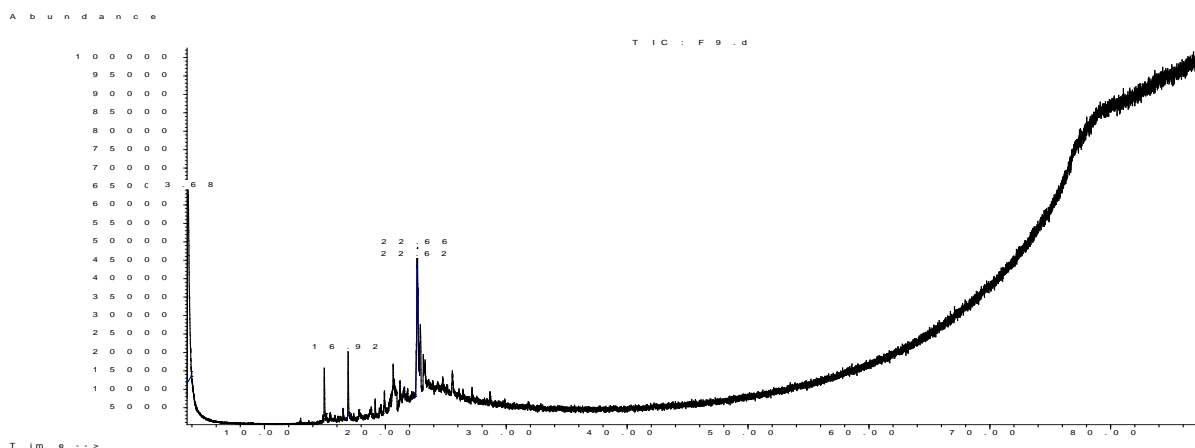
**Figure 15**: Chromatogramme GC/MS de la fraction F9

Tableau XI : Proportions des composés majoritaires de la fraction F9

| RT min | Nom du composé | MM | Formule moléculaire | P% | aire de pic % |
|-----------|--|-----|--|----|------------------|
| 16.924 | E-2-tétradécén-1-ol | 212 | C ₁₄ H ₂₈ O | 83 | 5.141 |
| 22.625 | acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique de | 296 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 70 | 3.858 |
| 22.654 | 9,17-octadécadiénal, (Z) - | 264 | C ₁₈ H ₃₂ O | 95 | 25.856 |
| 22.895 | acide heptadécanoïque, 16-propénoate de méthyle | 298 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 93 | 6.851 |

TR : Temps de Rétention ; Prob : Probabilité; MM : Masse Moléculaire

L'analyse chromatographique de la fraction F9 a permis d'identifier 4 composés. 9,17-octadécadiénal, (Z) - se représente la majorité des pics identifiés (25.856%) suivi par 3 constituants mineurs sont l'acide heptadécanoïque, 16-propénoate de méthyle (6.851%) ; E-2-tétradécén-1-ol (5.141%) et acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique de (3.858%).

Selon les profils chromatographiques des fractions (F5, F6, F8, F10, F16 et F17) (annexe II) nous ne marquons aucun résultat.

La comparaison de ces résultats avec ceux trouvés dans la littérature a montré quelques différences au niveau des composés majeurs constituant de l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus* et du pourcentage des différents constituants identifiés à partir leurs résidus. La plupart des composés identifiés ont été signalés à posséder des activités biologiques intéressante, ces activités sont indiqués dans le tableau (annexe III)

IV.4. Résultat de l'activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus* et les fractions de l'extrait CHCl₃ effectué par la méthode aromagramme a été réalisée sur plusieurs souches microbiennes. Au total, 06 bactéries à Gram - et 02 à Gram+ ainsi que 03 champignons (02 levures et 01 moisissure) ont été utilisées lors de ce screening.

Les résultats de ce test antimicrobien sont diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits expliquent les variations de leurs compositions chimiques.

A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul du Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI). Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une activité antibactérienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à (10mm). (Ponce et al., 2003).

➤ Résultats des différents extraits :

Les résultats de l'activité des extraits sont rapportés successivement dans le tableau, et leurs aspects sont illustrés dans les figures 16, 17, 18, 19 et 20.

Tableau XII: Résultats de l'activité antibactérienne les extraits des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*

| Extraits Souche bactériennes | | ACOEt | | n-buOH | MeOH | | CHCl ₃ | | |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----|--------|------|-----|-------------------|-----|--|
| | | Concentration des extraits (mg/ml) | | | | | | | |
| | | 200 | 500 | | 200 | 500 | 200 | 500 | |
| Gram- | <i>E. coli</i> | 12 | 20 | 15 | - | - | - | - | |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 20 | 22 | 16 | - | - | 15 | 18 | |
| | <i>K. pneumoniae</i> | 15 | 17 | 14 | - | - | - | - | |
| | <i>C. freundii</i> | 17 | 21 | 15 | - | - | - | - | |
| | <i>Serratia spp.</i> | 15 | 18 | - | - | - | - | - | |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | 16 | 18 | - | - | - | - | - | |
| Gram + | <i>B.cereus</i> | 13 | 18 | 12 | 12 | 17 | - | - | |
| | <i>S. aureus</i> | 12 | 13 | 16 | 19 | 20 | 13 | 15 | |

(-) : aucune zone d'inhibition

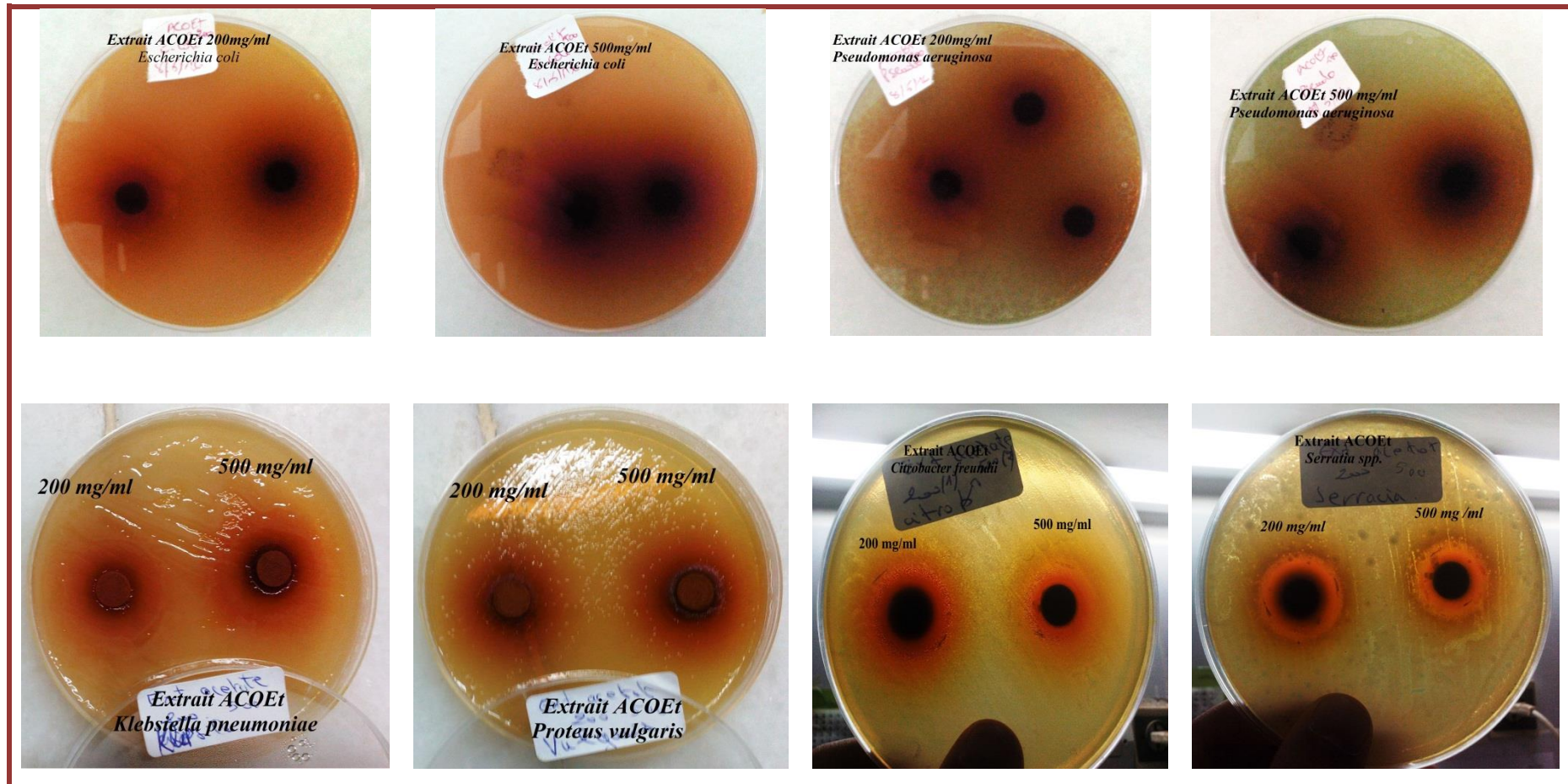


Figure 16: L'effet de l'extrait AcOEt des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii* et *Serratia spp.*

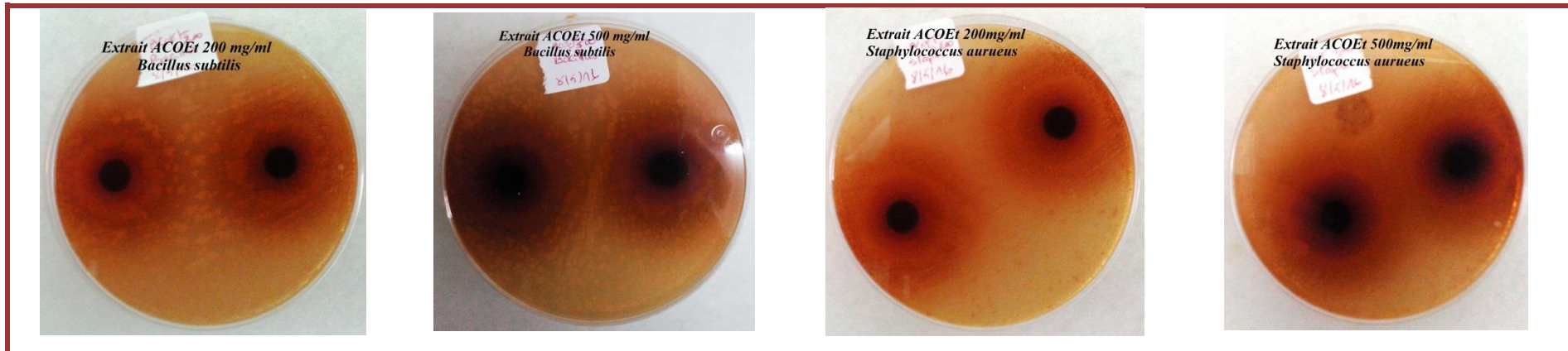


Figure 17: L'effet de l'extrait AcOEt des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur : *Staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*

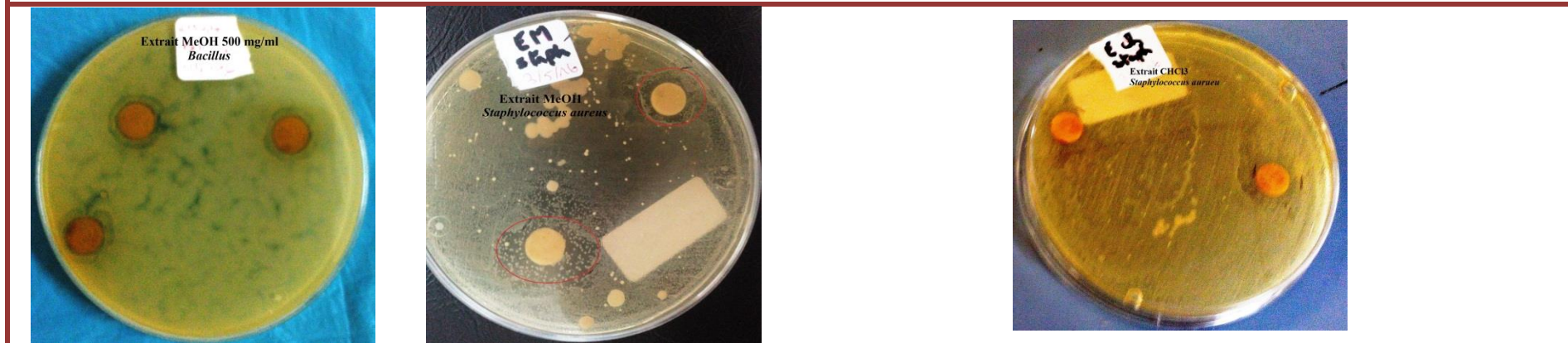


Figure 18: L'effet de l'extrait MeOH des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur : *Staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*

Figure 19: L'effet de l'extrait CHCl_3 des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur : *Staphylococcus aureus*

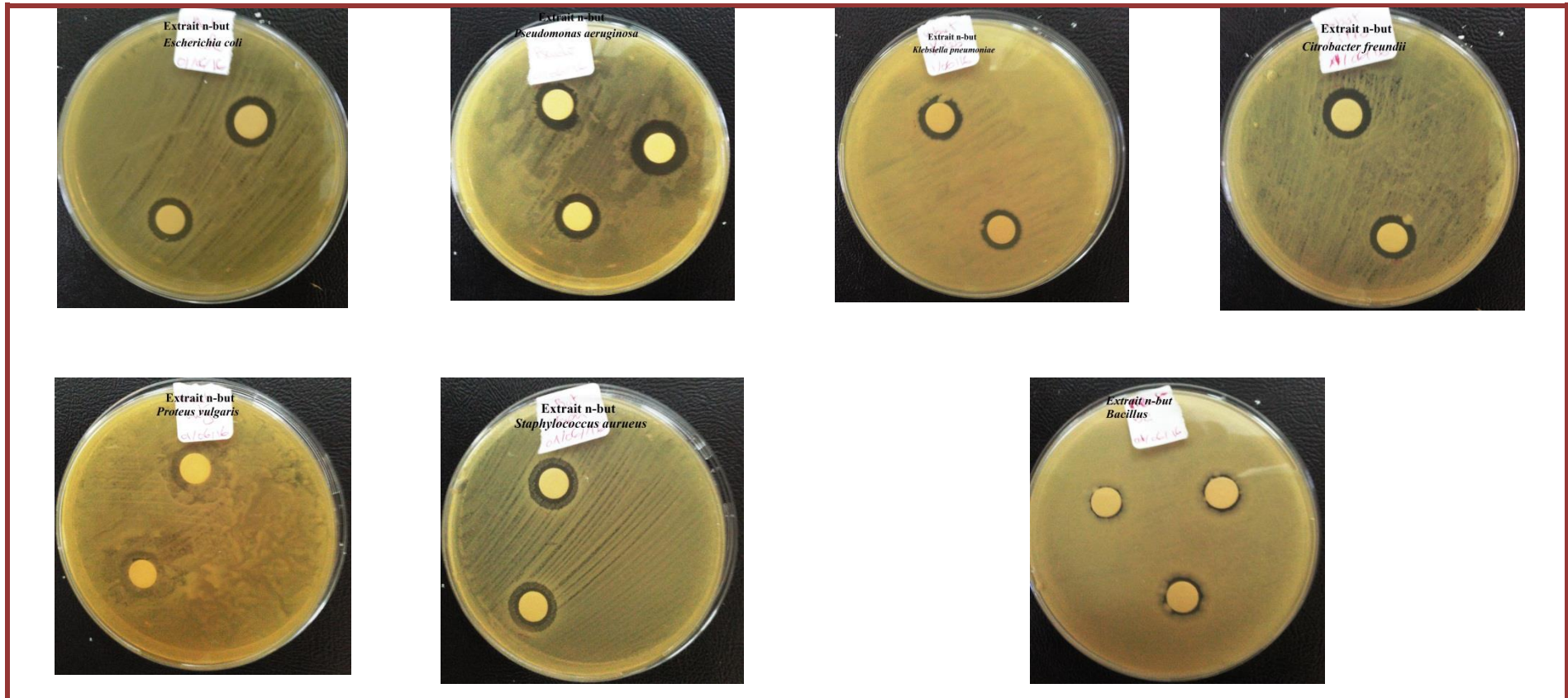


Figure 20: L'effet de l'extrait n-buOH des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*

D'après les résultats montrés dans le tableau, on remarque que toutes les bactéries sont sensibles à l'extrait AcOEt. Le plus grand diamètre de la zone d'inhibition est enregistré par la souche *Pseudomonas aerogenosa* (22mm), suivie par *Citrobacter freundii* (21mm), *Escherichia coli* (20mm) et *Serratia spp*, *Proteus vulgaris* et *baccillus cereus* enregistrée même DZI (18mm) dans la plus grande dose (500mg/ml).

Nous avons constaté que l'augmentation de la concentration s'est accompagnée d'une augmentation significative du diamètre de la zone d'inhibition.

L'extrait n-buOH a montré une activité inhibitrice sur la majorité des souches bactériennes.

En termes de diamètre de la zone d'inhibition, l'extrait n-buOH est le moins actif que l'extrait ACOEt, ce qui confirme le faible pouvoir antibactérien de cet extrait, donc l'efficacité optimal d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composée de l'origine de cet extrait (**Essawi et Srour, 2000**), pour cela l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui lorsqu'ils sont séparés deviendraient inactifs individuellement (**Rios and Recio, 2005**).

Les analyses des résultats montrent que l'extrait MeOH inhibe seul les grams +, suggérant que l'activité observée est le seul effet de l'extrait MeOH, comme rapporté par **Meral et Karabay (2002)** qui ont démontré que le méthanol pur ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Cette activité antibactérienne de l'extrait MeOH est peut être attribuée principalement à ses constituant majoritaires.

En revanche, les bactéries sont légèrement moins sensibles à l'extrait CHCL₃, nous remarquons que *Pseudomonas aerogenosa* est la plus sensible à l'extrait CHCL₃ avec un diamètre d'inhibition de (18mm), suivi de *Staphylococcus aureus* (15mm) avec une concentration 500 mg/ml.

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que le résidu des fruits de *Pistacia lentiscus* est doué de propriétés antimicrobiennes.

➤ **Résultats des fractions :**

Après fractionnement l'extrait CHCL₃, ont montré une petite amélioration de l'activité au niveau de leurs fractions résultantes.

Les fractions issues des extraits CHCL₃ se sont montrées plus actives que leurs extraits correspondants sur ces souches testées, ce qui signifie que l'activité initiale observée avec leurs extraits n'est pas due à un effet synergique.

Nous rapportons dans le tableau les diamètres des zones d'inhibition des fractions de l'extrait CHCL₃ aux souches microbiennes testées.

Tableau XIII : Résultats de l'activité antibactérienne des fractions des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*

| Les fractions | | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₅ | F ₆ | F ₈ | F ₉ | F ₁₀ | F ₁₆ | F ₁₇ |
|---------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Gram - | <i>E.coli</i> | 25 | 14 | 13 | - | - | - | 18 | - | | - |
| | <i>P. aerogenosa</i> | 18 | 27 | 13 | - | - | - | - | - | | - |
| | <i>K.pneumoniae</i> | 11 | 11 | 11 | - | - | - | 11 | - | | - |
| | <i>C. freundii</i> | 12 | 12 | 12 | - | - | - | 12 | - | | - |
| | Serratia | 12 | 12 | 12 | - | - | - | 12 | - | | - |
| | Vulgarice | - | - | - | - | - | - | - | - | | - |
| Gram + | <i>B. cereus</i> | - | - | 12 | - | - | - | 14 | - | | - |
| | <i>S. aureus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | | - |

(-) : aucune zone d'inhibition

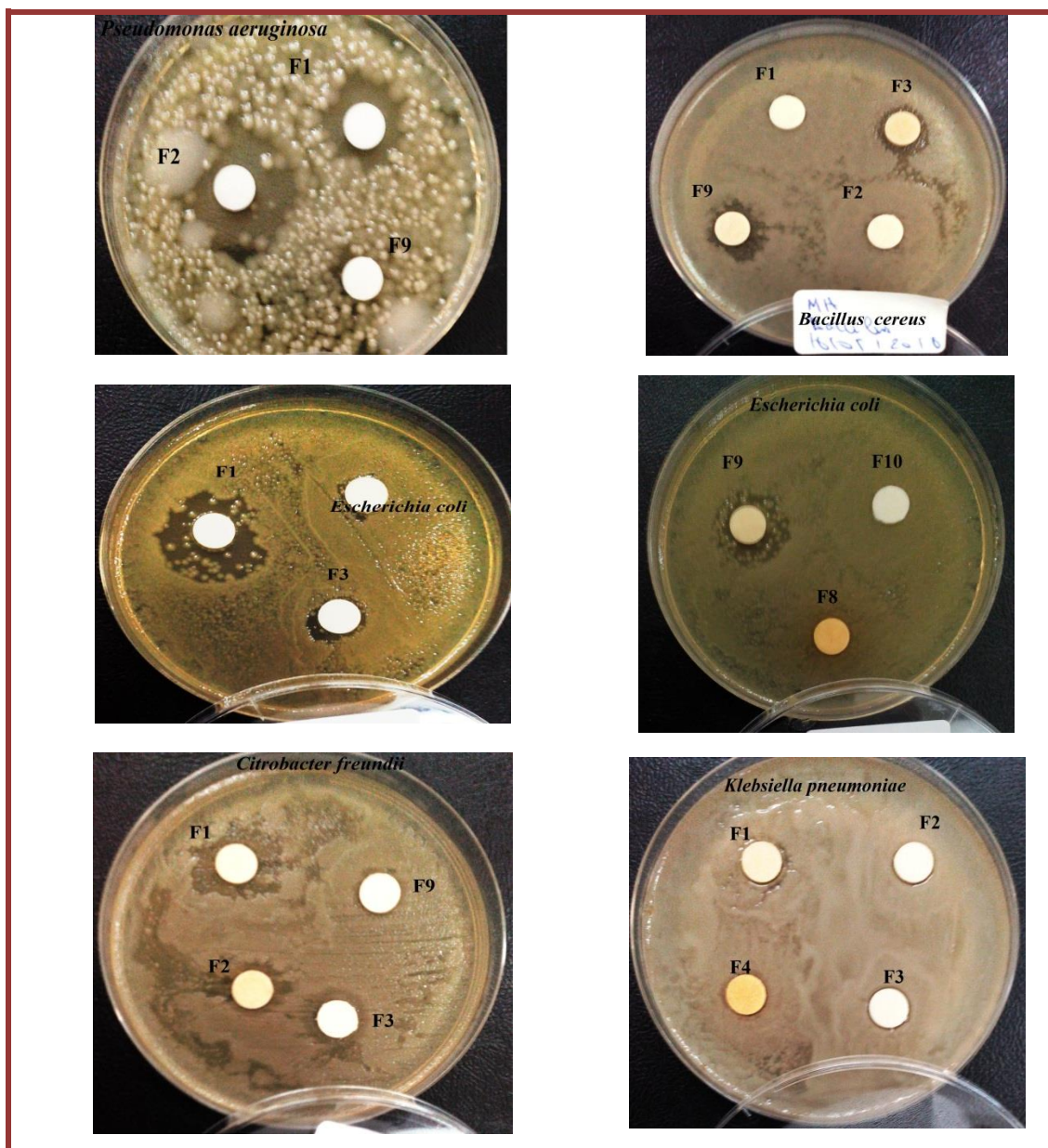


Figure 21: L'effet des fractions de l'extrait CHCl_3 des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus cereus*

Les fractions F1, F2, F3 et F9 ont été les seules fractions actives issues du fractionnement de l'extrait chloroforme des résidus des fruits, puisqu'elles ont montré un effet inhibiteur significatif sur la croissance des bactéries.

D'après l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que :

F1 et F9 sont plus efficace vis-à-vis d'*E.coli* avec des diamètres d'inhibition respectifs de 25mm et 18mm.

P. aerogenosa est la plus sensible à la F2 avec un DZI de (27mm) puis à la F1 avec un DZI de (18mm).

La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail composé organiques (Ferhat *et al.*, 2010).

Les souches *C. freundii*, *Serratia spp* et *K. pneumoniae* ont manifesté une résistance relative vis-à-vis des fractions F1, F2, F3 et F9 malgré les faibles zones d'inhibitions observées (12, 12, 11) mm respectivement, en revanche elles sont totalement inactive vis-à-vis de *Proteus vulgaris*.

Une absence totale de l'activité est observée dans le cas des fractions F1, F2, F3 et F9 vis-à-vis de l'ensemble des souches bactériennes gram + testées, à l'exception de *B. cereus* qui montre une sensibilité moyenne 14 et 12mm chez le F9 et F3 respectivement.

➤ Résultats de l'activité anti fongique des extraits:

Les résultats de l'activité anti fongique des extraits sont regroupés dans le tableau

Tableau XIV: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de l'activité anti fongique

| Extraits | AcOEt | | n-buOH | MeOH | | CHCl ₃ | |
|---------------------------------|------------------------------------|-----|--------|------|-----|-------------------|-----|
| | Concentration des extraits (mg/ml) | | | | | | |
| | 200 | 500 | 500 | 200 | 500 | 200 | 500 |
| <i>Candida albicans</i> | 22 | 23 | 13 | – | – | – | – |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 25 | 25 | 15 | – | – | – | – |
| <i>Aspergillus braziliensis</i> | – | – | 14 | – | – | – | – |

(-) : aucune zone d'inhibition

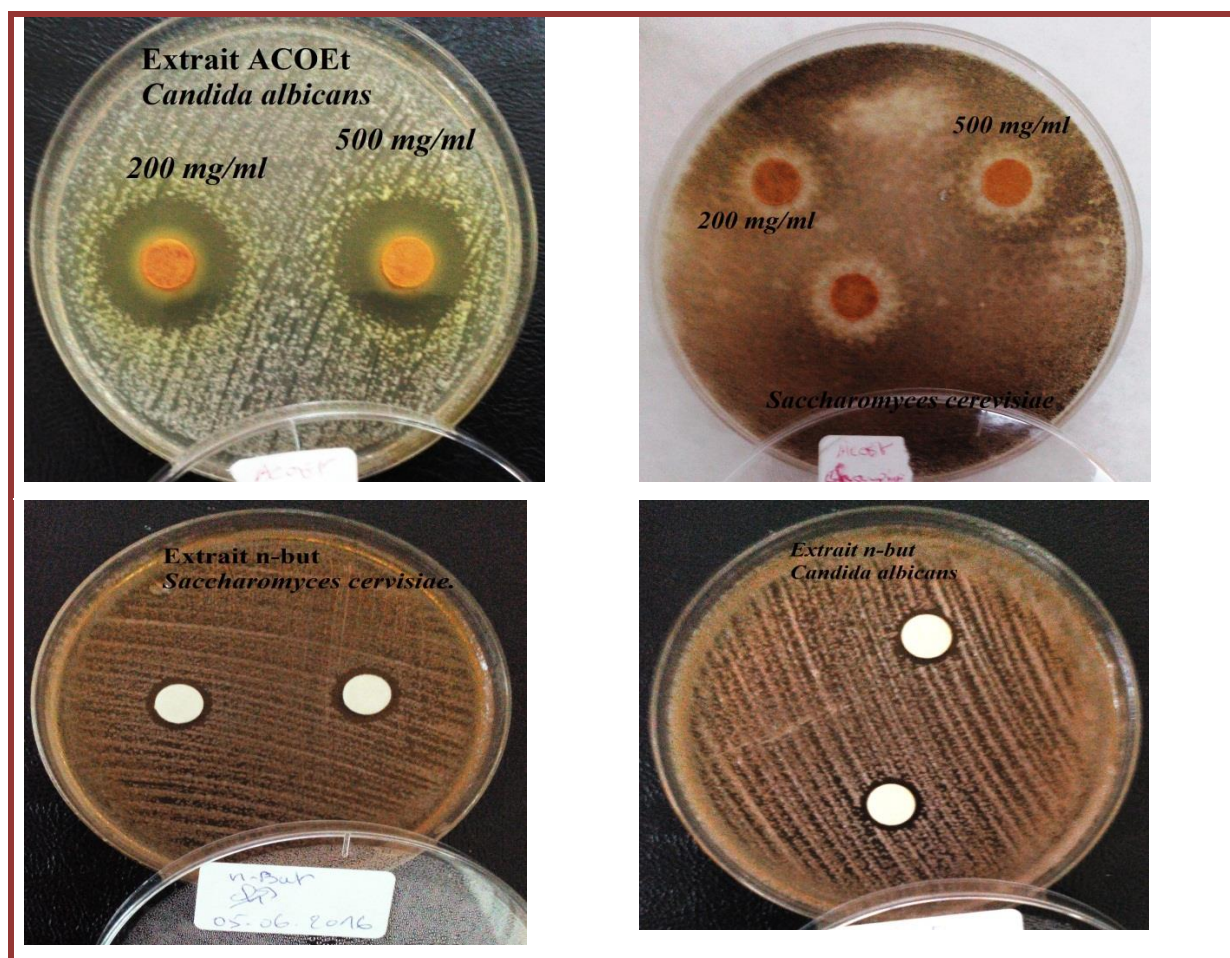


Figure 22: L'effet des extraits AcOEt et n-buOH des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus* sur *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*

Pour les résultats obtenus en aromatoigramme, les souches fongiques demeurent les plus sensibles à l'action inhibitrice des deux extraits AcOEt et n-buOH. *Saccharomyces cerevisiae* est le plus sensible à l'action inhibitrice de l'extrait AcOEt avec un DZI égal à 25 mm, suivi par *Candida albicans* avec un DZI égal à 23mm. *Aspergillus brasiliensis* est résistante à l'action inhibitrice de l'extrait AcOEt et sensible à l'action inhibitrice de l'extrait n-buOH avec un DZI de 14mm.

Les deux extraits MeOH et CHCl₃ ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur avec les souches fongiques malgré qu'on ait augmenté la concentration des extraits.

➤ **Résultats de l'activité anti fongique des fractions :**

Les résultats de l'activité anti fongique des fractions sont résumés dans le tableau ci-après :

Tableau XV: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des fractions de l'activité anti fongique

| | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₅ | F ₆ | F ₈ | F ₉ | F ₁₀ | F16 | F17 |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----|-----|
| <i>Candida albicans</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Aspergillus braziliensis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(-) : aucune zone d'inhibition

D'après les résultats obtenus, toutes les fractions ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur avec les souches fongiques testées ce qui signifie que l'efficacité optimal peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composée.

IV.5. Discussion générale de l'activité antimicrobienne

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antimicrobienne et de la phytochimie des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus L.*

Les résultats montrent que les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition sur les souches correspondantes.

Les extraits AcOEt et n-buOH ont été efficaces vis-à-vis des Gram+ et des Gram-, avec une activité importante contre *P. aeruginosa* et *C. freundii*, et une activité plus au moins importante contre les autres souches, ceci montre que les molécules responsables de l'activité sont plus extractibles par l'AcOEt et n-buOH que par les autres solvants.

Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (Deba et al., 2008)

Les autres souches microbiennes se sont révélées résistantes dans chacun des extraits CHCl₃ et MeOH. Cela s'explique soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes soit par la faible capacité des composés antibactériens, présents dans les différents extraits, à diffuser de manière uniforme à travers l'agar (Rauha et al., 2000), soit due à une modification des propriétés de la substance responsable de l'activité en présence d'autres composés de l'extrait (Pereira et al., 2007 ; Estevinho et al., 2008), aboutissant à une combinaison de deux composants actifs (majeur ou mineur) agissant en synergie (Figueiredo et al., 2010 ; Nenaah, 2010).

Selon nos résultats, *B.cereus* et *S. aureus* sont les souches les plus sensibles à la plupart des extraits étudiés. Zaika (1988) et Ali Shtayeh et al., (1988) ont affirmé que les bactéries à Gram+ sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram-.

La différence dans la structure de la paroi bactérienne joue un rôle important dans la susceptibilité des bactéries (Shan et al., 2007 ; Tian et al., 2009). Selon plusieurs auteurs, les bactéries Gram- ont une membrane externe constituée de lipopolysaccharides (LPS) qui limite la diffusion des composés hydrophobes (Yoda et al., 2004 ; Tian et al., 2009 ; Lacombe et al., 2010). De plus, le périplasme contient des enzymes capables de détruire les molécules étrangères introduites de l'extérieur (Klančnik et al., 2010), ce qui rend ces bactéries généralement moins sensibles aux extraits de plantes que les bactéries Gram+ (Chan et al., 2007 ; Estevinho et al., 2008 ; Šamec et al., 2010).

D'autres résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (**Cosentino et Tuberoso, 1999, De-Billerbeck, 2002**) ayant montré que les bactéries à Gram- sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram+.

La différence d'activité entre les fractions pourrait s'expliquer par la nature des molécules contenues dans chacune d'elles.

Les constituants des fractions de l'analyse phytochimique pourraient donc être mis à profit comme agent antimicrobien puissant.

Acide pentadécanoïque, 14-méthyl-, ester méthylique, l'ester méthylique d'acide palmitique possède des propriétés antioxydantes, antifongiques et antimicrobiennes (**Bashir et al., 2012**).

Les propriétés antibactériennes et antifongiques de l'acide 7-octadécénoïque, ester méthylique (**Al-Shammara et al., 2012**).

L'acide 8-octadécénoïque, ester méthylique est efficace comme antioxydant et antimicrobienne.

L'acide oléique peut être responsable de l'activité antibactérienne (**Awa et al., 2012**). Le composé alcool insaturé, 9,17-octadécadiénal, (Z) -, est rapporté que la propriété antimicrobienne (**Rajeswari et al., 2012**).

L'acide hexadécénoïque, ester méthylique (l'ester méthylique d'acide palmitique) présentait un large spectre d'activités biologiques et peut être utilisé comme antimicrobienne, antifongique, antioxydant, hypocholestérolémiant et nématicide (**Hema et al., 2011**).

Toutefois il faut indiquer que la différence d'activité entre l'extrait CHCl_3 et ces fractions est également liée à la concentration du principe actif. Ceci permet de comprendre que les fractions bien qu'elles contiennent plus de composés avec des concentrations élevées en principe actif en comparaison avec l'extrait CHCl_3 .

Par ailleurs, l'absence d'effet bactérien sur les différentes souches testées pourrait être due soit à la résistance de celles-ci ou bien à l'insuffisance de la concentration utilisées.

De tels résultats qui ont été rapportés pour la plupart des extraits étaient probablement dus à la méthode d'extraction et/ou aux solvants utilisés (**Eloff, 1998 ; Majhenič et al., 2007 ; Pesewu et al., 2008 ; Salama et Marraiki, 2010**), au matériel végétal et/ou aux différentes souches bactériennes étudiées (**Eloff, 1998 ; Pesewu et al., 2008**), à la tolérance intrinsèque

des microorganismes et à la nature des composés phytochimiques présents dans l'extrait (Aqil et Ahmad, 2003) et aux différentes méthodes de vérification de l'activité antibactérienne (Lindberg et al., 2004 ; Landete et al., 2008).

Dans notre étude, l'évaluation de l'activité antifongique révèle une faible activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus braziliensis* mais une activité plus importante vis-à-vis des deux espèces *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* chez les extraits ACOEt et n-buOH, ce qui laisse supposer l'existence d'un ou plusieurs principes actifs aux propriétés antifongiques. Toutes les fractions ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur avec les souches fongiques testées ce qui signifie que l'activité antifongique due à l'action synergie de différents composés.

En généralité, Les variations dans la composition et dans la structure chimique de ces composés conduisent à des effets aux sites d'action différents dans leur action antimicrobienne (Savoia, 2012).



Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail avait pour but l'étude phytochimique et biologique des extraits issues des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*.

L'objectif était d'apporter des éléments pour la validation de certaines propriétés des résidus étudiées, l'identification de leurs principes actifs et la mise au point d'évaluation des activités antimicrobienne. Ce travail est une contribution à la valorisation des résidus agro-alimentaires en vue de leur application dans les domaines de la santé et de l'alimentation.

L'extraction est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs, pour cela la préparation des extraits des résidus des fruits est réalisée suivant une macération et l'extraction successive de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante.

Le plus fort rendement a été obtenu avec l'extrait chloroformique avec de pourcentage 0,84 %, suivi de l'extrait AcOEt 0,44%. L'extrait n-buOH a donné le plus faible rendement avec 0,39%.

L'extrait chloroforme est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures.

L'identification CG/SM menée sur les fractions de l'extrait chloroformique a permis de caractériser les principaux composés d'acides gras qui semblent avoir des effets protecteurs pour la santé humaine. Ils ont des constituants une bonne source alternative de composition chimique, tels que Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester ; Hexadecanoic acid, methyl ester ; 8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester ; 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester ; 9,17-Octadecadienal, (Z)- ; acide oléique ; 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester ; 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)- ; 7-Octadecenoic acid, methyl ester. Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques parmi agent antimicrobien.

Concernant l'activité antimicrobienne, les résultats indiquent que toutes les bactéries testées sont sensibles à l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait n-but a montré une activité inhibitrice sur la majorité des souches bactériennes, en revanche que l'extrait MeOH inhibe seul les grams + et l'extrait CHCl₃ possèdent une activité antimicrobienne sur *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*.

Conclusion générale

En outre, Les fractions F1, F2, F3 et F9 ont été les seules fractions actives issues du fractionnement de l'extrait chloroforme des résidus des fruits, puisqu'elles ont montré un effet inhibiteur significatif sur la croissance des bactéries.

D'autre part, l'évaluation de l'activité antifongique révèle une faible activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus brasiliensis* mais une activité plus importante vis-à-vis des deux espèces *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* chez les extraits AcOEt et n-buOH

D'une façon générale, la plus part de nos extraits et nos fractions ont une activité antibactérienne qui varie d'une souche à une autre qui due aux variations dans la composition ou la présence de synergie entre un nombre de composants.

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'évaluation des résidus des fruits de *Pistacia lentiscus*. Mais ces résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antimicrobiens naturels, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de ce résidu.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antimicrobienne des extraits de ce résidu.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdelwahed, A.; Bouhlel, I.; Skamdrani, I.; Valenti, K.; Kadri, M.; Guirand, P.; Steiman, R.; Mariotte, A. M.; Gherdia, K.; Laporte, F.; Dijoux, F.; Ranca, M. G.; and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6 pentagalloylglucose from *Pistacia Lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter.* 165:1-13.

AL-Saghir M-G. (2006). Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Blacksburg, Virginia. *Thèse de doctorat*, p:37

AL-Saghir, M. G. (2010). Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) based on morphological data. *Asia Journal of Plant Sciences*, 9(1): 28-35.

Al-Shammaria LA., Hassanab WHB. and Al-Youssefa HM., 2012: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and lipid content of *Carduus pycnocephalus* L. growing in Saudi Arabia. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 4: 1281-1287

Alessandro A., Casazza B.A., Mantegna S., Cravotto G. and Perego, P., 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional technique. *J. Food Eng.* 100, 50–55.

Amhamdi, H.; Aouinti, F.; Wathelet, J.P. ; and Elbachiri, A. (2009). Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec. Nat. Prod.* 3(2): 90- 95.

Assimopoulou, A.N. ; Zlatanov, S.N. and Papageorgiou, V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, 92: 721–727

Awa EP., Ibrahim, S., Ameh DA., 2012: GC/MS analysis and antimicrobial activity of diethyl ether fraction of methanolic extract from the stem bark of *Annona senegalensis* Pers. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 4213–4218.

Baba-Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles, *Flore d'Algerie et du Maghreb*, p: 1-218.

Bashir A., Ibrar K., Shumaila B. and Sadiq Azam, 2012: Chemical composition and antifungal, phytotoxic, brine shrimp cytotoxicity, insecticidal, and antibacterial activities of the essential oils of *Acacia modesta*. *Journal of Medicinal plants Research*, 6(31), 4653-4659.

Références bibliographiques

- Baumgard LH., Corl BA, Dwyer DA., Saebø A. and Bauman DE.,** 2000: Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278(1), 179-84.
- Belfadel F.Z** (2009). Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* –Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques. Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Magister en chimie organique, Université Mentouri Constantine, 2009, 139p.
- Belhadj, S.** (2002). Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation. *Centre Universitaire de Djelfa*, 107-109
- Benhammou, N.; Bekkara, F.A and Panovska, T.K.** (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 22-28.
- Bhourri ,W.; Derbel , S.; Skandrani ,I.; Boubaker,J.; Bouhleb, I.; B. Sghaier, M.; Kilani , S.; Mariotte , A. M. ; Dijoux-Franca, M. G.; Ghedira , K. and 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.
- Baiano A., Bevilacqua L., Terracone C., Contò F. and Del Nobile M.A.,** 2014. Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *J. Food Eng.* 120, 135–145.
- Bruneton, J.**(1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation*, p : 1120.
- Castola,V.; Bighelli,A. and Casanova, J.** (2000) . Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 79 88.
- Chan, E. W. C. ; Lim, Y. Y. et Mohammed Omar.** (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, **104**: 1586–1593.
- Chantaro P., Devahastin S. and Chiewchan N.**(2008).Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrots peels.*LWT-Food Science and Technology*,41,1987 et1994.
- Charef, M.; Yousfi, M.; Saidi, M. and Stocker, P.** (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc.* 85:921–924.
- Cerpa M.G., Rafael B., Mato M., Cocero J., Ceriani R., Meirelles A.J.A., Prado J.M., Patrícia F.Leal., Takeuchi T.M. and Meireles M.A.A.,** 2008. Steam distillation applied to

Références bibliographiques

the food industry. In: Meireles, M.A.A. (Ed.), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

Chedea V.S., Kefalas P. and Socaciu C. (2010). Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel wastes (valencia and navel var.). *Journal of Food Biochemistry*, 34, 101-110.

Chemat S., Esveld E.D.C., 2013. Contribution of microwaves or ultrasonics on carvone and limonene recovery from dill fruits (*Anethum graveolens* L.). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 17, 114–119.

Cortina, J.; Green J.J.; Baddeley, J.A. and Watson, C.A. (2008). Root morphology and water transport of *Pistacia lentiscus* seedlings under contrasting water supply: A test of the pipe stem theory. *Environmental and Experimental Botany*, 62:343–350.

Dang Y.Y., Zhang H., Xiu Z.K. 2013. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (10), 1576–1581. doi: 10.1002/jctb.4241.

Diankov S., Karsheva M., Hinkov I., 2011. Extraction of natural antioxidants from lemon peels. Kinetics and antioxidant capacity. *J. Univ. Chem. Technol. Metal.* 46, 315–319.

Di Mauro A., Fallico B., Passerini A., Rapisarda P. and Maccarone E. (1999). Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of extracts on styrene-divinylbenzene resin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4391-4397.

Djeridane, A.; Yousfi, M.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Journal of Food Chemistry*, 97: 654-660.

Dogan, Y.; Baslar, S.; Aydin, A. and Mert, A.H. (2003). A Study Of The Soil-Plant Interactions Of *Pistacia Lentiscus* L. Distributed In The Western Anatolian Part Of Turkey. *Acta Bot. Croat.* 62 (2), 73–88,

Duru, M.E.; Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Harmandar, M.; Izumi, S. and Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74: 170–176.

El beyrouthy, M. (1999). Contribution à l'étude de quelques familles médicinales de la flore libanaise. Université Saint-Esprit de Kaslik Faculté des Sciences Agronomiques.

Références bibliographiques

Eloff JN., Katerere DR. and McGaw LJ., 2008: The biological activity and chemistry of the southern African *Combretaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*; 119: 686-699

Estevinho, L. ; Pereira, A. P. ; Moreira, L. ; Dias, L. G. et Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 3774–3779.

Ferhat M.A., Meklati B.Y., Smadja J. and Chemat, F., 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatog. A* 1112, 121–126.

Farhat A., Fabiano-Tixier A.-S., Maataoui M.E., Maingonnat J.-F., Romdhane M. and Chemat, F., 2011. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*. 125, 255–261.

Fernandez, A.; Camacho, A.; Fernandez, C. and Altarejos, J. (2000). Composition of the Essential Oils from Galls and Aerial Parts of *Pistacia lentiscus* L. *Essent. Oil Res.* 12:19-23

Figueiredo, N. L. ; de Aguiar, S. R. M. M. ; Falé, P. L. ; Ascensão, L. ; Serralheiro, M. L. M. et Lino, A. R. L. (2010). The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, **119**: 664–668.

Galanakis C.M., Tomberg E. and Gekas V.(2010).A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction.*LWT- Food Science and Technology*,43,1009 et 1017.

Galanakis C.M., 2012: Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*. 26, 68–87.

Galanakis C.M., 2013. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a viewpoint of opportunities and challenges. *Food Bioprod. Process.* 91, 575–579.

Galanakis C.M., Schieber A., 2014. Editorial. Special Issue on Recovery and utilization of valuable compounds from food processing by-products. *Food Res. Int.* 65, 230–299.

Galanakis C.M., 2015. Separation of functional macromolecules and micromolecules: from ultrafiltration to the border of nanofiltration. *Trends Food Sci. Technol.* 42 (1), 44–63.

Références bibliographiques

Garnier, G.; Bézanger-Beauquesne, L. and Debraux, G. (1961). Ressources médicinales de la flore française. *Edition, Vigot Frères Editeurs*, p : 665-666.

Gardeli, C.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Theodosios Kibouris, T.; Michael. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107 :1120–1130.

Ha YL., Storkson J. and Pariza MW., 1990: Inhibition of benzo (a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research* 50(4):1097-1101.

Hamlat N. et Hassani A. 2008. Analyse des flavonoïdes présents dans les feuilles du lentisque par les méthodes chromatographiques. XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie.

Hema R., Kumaravel S. and Alagusundaram K., 2011: GC/MS Determination of Bioactive Components of *Murraya koenigii*. *Journal of American Science*, 7(1), 80-83.

Heng W.W., Xiong, L.W., Ramanan R.N., Hong T.L., Kong K.W., Galanakis, C.M., and Prasad K.N., 2015. Two level factorial design for the optimization of phenolics and flavonoids recovery from palm kernel by-product. *Industrial Crops and Products*. 63, 238–248.

Huma Z., Abert-Vian M., Elmaataoui M., Chemat F., 2011. A novel idea in food extraction field: study of vacuum microwave hydrodiffusion technique for by-products extraction. *J. Food Eng.* 105, 351–360.

Imelouane B., Elbachiri A., Ankit M., Benzeid H., Khedid K., 2009. Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 113–118.

Jones PJ., 2002: Clinical nutrition: 7. Functional foods -more than just nutrition. *CMAJ*, 166: 1555-1563.

Klančnik, A. ; Piskernik, S. ; Jeršek, B. et Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, **81**: 121–126.

Références bibliographiques

- Keita, Y.; Koné, O.; Ly, K. A. et Häkkinen V., 2004 :** Étude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes Rendus Chimie*, **7**: 1095-1100.
- Kim J.Y., Oh T.H., Kim B.J., Kim S.S., Lee N.H. and Hyun C.-G., 2008.** Chemical composition and antiinflammatory effects of essential oil from *Farfugium japonicum* flower. *J. Oleo Sci.* **57**, 623–628.
- Kordali S., Cakir A., Zengin H. et Duru M.E., 2003.** Antifungal activities of the leaves of tree *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia, Short report*, **74**: 164-167.
- Lacombe, A. ; Wu, V. C. H. ; Tyler, S. et Edwards, K. (2010).** Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, **139**: 102–107.
- López-Lázaro, M.(2009).** Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **9**, 31-59.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007.** Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 125–132.
- Masmoudi M., Besbes S., Chaaboouni M., Robert C., Paquot M., Blecher C., (2008).** Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology carbohydrate polymers, **74**, 185 et 192.
- Munoz O., Sepulveda M. and Schwartz M., 2004.** Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grape skin from Chilean wine. *Food Chem.* **87**, 487–490.
- Nenaah, G. (2010).** Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, **xxx**: xxx–xxx. (Article in press)
- Okwu DE and Ighodaro BU, 2010:** GC-MS Evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of the oil fraction from the leaves of *Alstonia boonei* De Wild. *Der Pharma Chemica*; **2**: 261-272.
- Ouelmouhoub, S., 2005.** Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie).
- Ouraïni, D. ; Agoumi, A. ; Ismaïli-Alaoui, M. ; Alaoui, K. ; Cherrah, Y. ; Alaoui, M.A. et Belabbas, M.A., 2007:** Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de

Références bibliographiques

Thymus saturejoides L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 1: 6–14.

Patsioura A., Galanakis C.M., Gekas V., 2011. Ultrafiltration optimization for the recovery of b-glucan from oat mill waste. *J. Membr. Sci.* 373, 53–63.

Pavlovic' M.D., Buntic' A.V., Šiler-Marinkovic' S.S. and Dimitrijevic'-Brankovic' S.I., 2013. Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee. *Separ. Purif. Technolo.* 118, 503–510.

Pereira, A. P. ; Ferreira, I. C. F. R. ; Marcelino, F. ; Valentão, P. ; Andrade, P. B. ; Seabra, R. ; Estevinho, L. ; Bento, A. et Pereira, J. A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, **12**: 1153-1162.

Prabhadevi V, Sahaya SS, Johnson M, Venkatramani B, Janakiraman N., 2012: Phytochemical studies on *Allamanda cathartica* L. using GC-MS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2):S550–S554.

Prakash M.J., Sivakumar V., Thirugnanasambandham K., Sridhar R., 2014. Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydr. Polym.* 101, 786–791.

Quezel P.et Santa S., (1962) : Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Rrcherche Scientifique, p 611

Rahmanian N.; Jafari S.M. and Galanakis C.M., 2014: Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 91, 1–18.

Rajeswari G., Murugan M. and Mohan V.R., 2012: GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, vol. 29, no. 29, pp. 818–824.

Rajha H., El Darra N., Hobaika H., Boussetta N., Vorobiev E., Maroun R. and Louka N., 2014. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food Nutr. Sci.* 5, 397–409.

Références bibliographiques

- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K. Vuorela, H. et Vuorela, P. (2000).** Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, **56**: 3–12.
- Reitz RC., Lands WE., Christie WW. and Holman RT.,** Effects of ethylenic bond position up on acyltransferase activity with isomeric cis, cis – octadecadienoyl coenzyme Athiol esters *Journal of Biological Chemistry*
- Robard I.,** 2004 : Plantes médicinales d’outre-mer et pharmacopées : aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie*, 1: 16-21.
- Rodriguez R., Jimener A, Fernandez-Bolanos J., Guillen R. and Heredia A.,** (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Tends in Food Science and Technology*, 17,315.
- Rogosic , J. ; Estell , R.E. ; Ivankovic, S. , Kezic , J. ; Razov, J. (2008)** Potential mechanisms to increase shrub intake and performance of small ruminants in Mediterranean shrubby ecosystems. *Small Ruminant Research*, 74: 1–15
- Šamec, D. ; Gruz, J. ; Strnad, M. ; Kremer, D. ; Kosalec, I. ; Jurišić Grubešić, R. ; Karlović, K. ; Lucic, A. et Piljac-Zegarac, J. (2010).** Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 113–119.
- Seixas F.L., Fukud D.L., Turbiani F.R.B., Garcia P.S., Petkowicz C.L.O., Jagadevan, S. and Gimenes M.L.,** 2014. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloid*. 38, 186–192.
- Schieber A.; Stintzing F. C.; and Carle R.,** 2001: By-products of plant food processing as a source of functional compounds e recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401-413.
- Shan B.; Cai Y.-Z.; Brooks J. D. et Corke H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**: 112–119.

Références bibliographiques

Sonja D.; Canadanovic-Brunet J. and Cetkovic G., 2009: By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 15, 191-202.

Stamatopoulos K., Chatzilazarou A. and Katsoyannos, E., 2014. Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times. *Foods* 3, 66–81.

Strati I.F., Oreopoulou I.F., 2011. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chem.* 129, 747–752.

Syeda F.A; Habib -Ur- Rehman; Choudahry M.I.; and Atta -Ur- Rahman, 2011: Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of petroleum ether extract (oil) and bioassays of crude extract of *Iris germanica*. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(7), 95-100.

Tian, F. ; Li, B. ; Ji, B. ; Yang, J. ; Zhang, G. ; Chen, Y. et Luo, Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, **113**: 173-179.

Tsakona S., Galanakis C.M. and Gekas V., 2012. Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food Bioprocess. Technol.* 5, 1384–1393.

Wei, T.; Sun, H.; Zhao, X.; Houa, J.; Hou, A.; Zhao, Q and Xin, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, Pistafolia A. *Life Sciences*, 70: 1889-899.

Yang E.-J., Kim S.-S., Oh T.-H., Baik J.S., Lee N.H. and Hyun C.-G., 2009. Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 791–794.

Yoda, Y.; Hu, Z.-Q.; Zhao, W.-H. et Shimamura, T. (2004). Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J Infect Chemother*, **10**: 55-58.

Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, and Kim WG, 2005: Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*; 579(23):5157-5162.



Appareillage, verrerie

- **Appareillage**

- Agitateur
- Autoclave
- Bain marie
- Balance de précision
- Bec bunsen
- Etuve
- Hotte à flux laminaire avec lampe UV
- Incubateur bactériologique (25°C, 37°C)
- Réfrigérateur
- Rotavapor
-

- **Verrerie**

- Anse de platine
- Bêchers
- billes de verre
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Burette
- Disques d'aromatogramme stériles 9mm (Schleicher & Schuell Ref ; 321260)
- Ecouvillons stériles
- Eprouvettes
- Erlenmeyer
- Fioles
- Flacon avec bouchon
- Micropipette
- Pied à coulisse
- Pipettes graduées stériles
- Pipettes pasteurs
- Seringues

Annexe I

- Spatule inox
- Tubes à essai

- **Solutions et réactifs**
- Acétate d'éthyle
- Acétone
- Chloroforme (CHCl_3)
- Cyclohexane (C_6H_{12})
- Dichloroforme
- Éthanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
- Ether de pétrole
- L'eau distillée
- L'eau physiologique
- Méthanol
- N-butanol

Annexe II

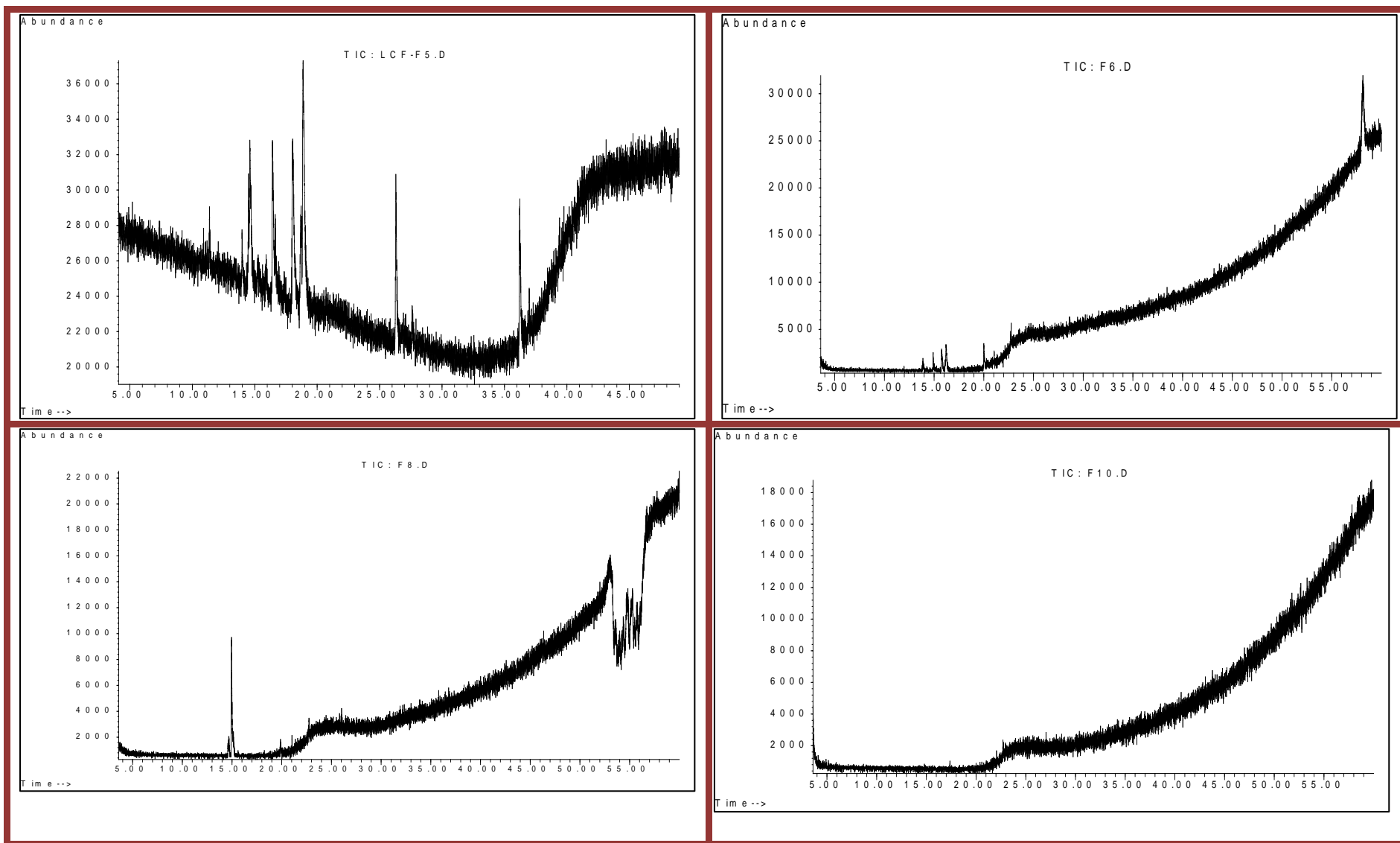


Figure 23: Chromatogramme GC/MS des fractions F5, F6, F8 et F10

Annexe III

Tableau XVI: L'activité biologique des composés phytochimiques identifié dans l'extrait CHCl₃ des résidus des fruits de *Pistacia Lentiscus*

| Nom de composé | Nature de composé | Activités biologiques | références |
|---|--|---|---|
| Acide pentadécanoïque, 14-méthyl-, ester méthylique | l'ester méthylique d'acide palmitique | Antioxydant, antifongique, antimicrobienne | Bashir et al., 2012 |
| Acide 9,12-octadécadiénoïque, l'ester méthylique de (E, E) - | Acide gras polyinsaturé | Hypocholestérolémians, nématocide, antiarthritique, hépatoprotecteur, antiandrogène, antihistamine, antiandrogènes, anticoronaire | Baumgard et al., 2000 |
| acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) -, ester méthylique de | Acide gras polyinsaturé | | |
| acide 7-octadécénoïque, ester méthylique | Ester méthylique de l'acide oléique | Antibactérienne, antifongique | Eloff et al., 2008 ; Okwu et Ighodaro, 2012 et Al-Shammaria et al., 2012 |
| Acide 8-octadécénoïque, ester méthylique | Ester méthylique de l'acide oléique | Antioxydant, Antimicrobienne. | Activity source: Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database |
| acide 9-octadécénoïque (Z) -, ester méthylique | Ester méthylique de l'acide oléique | Antioxydant, anticancéreuse | Syeda et al., 2011 et Hema et al., 2011 |
| Acide 9,12-octadécadiénoïque (Z, Z) - | Acide gras polyinsaturé | anti-inflammatoire, anti arthritique | Jones, 2002 |
| Acide oléique | Acide gras | antibactérien | Awa et al., 2012 |
| 9,17-octadécadiénoïque, (Z) - | Aldehyde | antimicrobienne | Rajeswari et al., 2012 |
| Acide hexadécénoïque, ester méthylique | l'ester méthylique d'acide palmitique | Activité antimicrobienne, antifongique, Antioxydant, hypocholestérolémians, nématocide | Hema et al., 2011; Ha et al., 1990 et Zheng et al., 2005 |
| | | | |
| 9-hexadécénoïque acide, ester méthylique de (Z) | l'ester méthylique d'acide palmitoléique | antioxydant | Prabhadevi et al., 2012 |