

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

Université Kasdi Merbah Ouargla
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques



Thèse de Doctorat Ès Sciences

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

Activité Biologique et Analyse
Chimique des Huiles Essentielles des
Galles du Pistachier de l'Atlas

Présenté et soutenu publiquement par :

M. SIFI Ibrahim

Devant le Jury composé de :

| | | |
|--------------------------|--|-----------------------|
| M. DIDI Med Ould El-hadj | Professeur (Université Kasdi Merbah – OUARGLA) | Président |
| M. OUINTEN Mohamed | Professeur (Université Amar Téliidji – LAGHOUAT) | Directeur de thèse |
| M. YOUSFI Mohamed | Professeur (Université Amar Téliidji – LAGHOUAT) | Co-Directeur de thèse |
| M. SEGNI Lâadjal | Professeur (Université Kasdi Merbah – OUARGLA) | Examineur |
| M. BOUTAIBA Sâad | MCA (Université Ziane Achour – DJELFA) | Examineur |



Année universitaire 2016

Remerciements

Je remercie Allah, le Miséricordieux de m'avoir donné Foi, volonté, et courage pour atteindre mon objectif.

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon promoteur, le Professeur Mohamed Quinten chef de domaine au département de Biologie à l'université de Laghouat, pour avoir accepté de diriger ce travail, et de m'avoir toujours soutenu.

Mes sincères remerciements vont également au Professeur Mohamed Youfji, Directeur du laboratoire des Sciences Fondamentales à l'Université de Laghouat, pour avoir Co-dirigé ce travail et pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire afin de réaliser cette étude ; son aide est précieuse.

J'exprime mes profonds remerciements aux honorables membres du jury Professeur Didi Ould El-hadj, Professeur Segni Lâadjal et Docteur Bountaiba Sâad ; pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier également le Professeur Jacobus Nicolas Eloff, le Directeur du laboratoire Phytomedicine Programm, Département des Sciences Paracliniques, Faculté des Sciences Vétérinaires, Université de Pretoria (South Africa), pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire afin de réaliser les activités biologiques.

Je tiens à remercier également Docteur Nadhir Gourine et Docteur Lyndy McGaw et Docteur Jean Paul Dzojem, pour leur aide et soutien inestimable.

Une pensée amicale à mes collègues enseignant(e)s du Département de Biologie, Université de Laghouat, pour avoir pour leurs collaborations et soutien.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce travail.

Dedicates



To my dear Parents

To my Wife

To my Brother

To my Sisters



نشاط البيولوجي والتّركيب الكيميائيّ للرّيويت العطريّة لجرب نبات الفستق الأطلسيّ

يَهْدَفُ هَذَا الْعَمَلُ إِلَى دِرَاسَةِ التَّرْكِيبِ الكِيمِيَائِيِّ لِلرُّيُوتِ العَطْرِيَّةِ لِنَبَاتِ الـ
جَرَائِمِ، هَا البيُولُوجِيّ) مَعِ دَرَجَةِ سَمِّيَّتِهَا. تِهَابَاتِ)،

نُهَجَ مُتَعَدِّدِ المَتَغَيَّرَاتِ بِاسْتِخْدَامِ طَرِيقَةِ تَحْلِيلِ
بِ الرِّئِيسِيِّ وَالتَّحْلِيلِ العُنْفُودِيِّ الهَرَمِيِّ فِي تَحْلِيلِ هَذِهِ الدِّ
رَاسَةِ عَدَدَ كَبِيرٍ مَ عَيِّنَاتٍ لِلرُّيُوتِ الـ طَرِيقَةِ مِنْ مَنَاطِقِ مُخْتَلِفَةٍ (يَنْ وَسَارَةَ
يَمْتِ) حَيْثُ كَشَفَتْ عَن وَجُودِ نَمَطٍ كِيمِيَائِيِّ ثَانِي (-4-terpinène
لم يتم نشره في السابق ويتمييز هذا النمط الجديد مستويات
(sabinene terpinène-4-ol).

بيُولُوجِيَّة (جَرَائِمِ)
تِهَابَاتِ وَكَذَلِكَ سَمِّيَّتِهَا ضِدَّ الخَلَايَا) لِرُّيُوتِ الـ طَرِيقَةِ لِنَبَاتِ الفِسْتَقِ

تُشِيرُ نَتَائِجُ هَذِهِ الدِّ اسَةِ إِلَى أَنَّ الرُّيُوتِ العَطْرِيَّةَ قَادِرَةٌ عَلْتَنشِيْبِطِ نُمُ
Candida albicans
مِيَّةٍ مُنْخَفِضَةٍ ضِدَّ خَلَايَا C3A Verol.

يُنْفِقَانِيَّةُ تُشِيرُ إِلَى السَّلَامَةِ الِيسْبِيَّةِ بَيْنَ دَرَجَةِ سُمِّيَّةِ وَنَشَاطِ الرُّيُوتِ
طَرِيقَةِ لِنَبَاتِ الـ

الرُّيُوتِ الـ طَرِيقَةِ لِنَبَاتِ الـ
شَاطَا هَامَا كَمُضَادَّةٍ لِإِلَاتِهَابَاتِ
NO وَتَنشِيْبِطِ إنزيمِ lipooxygénase-15.

كَلِمَاتُ مِفْتَاحِيَّة:

الرُّيُوتِ الـ طَرِيقَةِ، نَشَدَ لِلجَرَائِمِ، مُضَدَّ ادِلِلَالَتِهَا

**Activité biologique et analyse chimique des huiles essentielles des galls
du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.)**

Résumé

Le présent travail a pour objectif l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des galles de *P. atlantica* Desf., de différentes régions, ainsi que leur activité biologique (antimicrobienne, antioxydante, antiinflammatoire) et leur toxicité.

Dans la première partie, l'analyse statistique multivariée par la méthode ACP et la méthode CAH a été utilisée dans cette étude scientifique qui a impliqué l'étude d'un grand nombre d'échantillons d'huile essentielle de galles de l'espèce *P. atlantica* provenant de différentes régions (*Ainoussera*, *Laghout*, *Kheneg* et *Tilghemt*), a révélé l'existence d'un deuxième chemotype (-pinène / sabinene / terpinène-4-ol), non encore publié précédemment. Ce nouveau chemotype se caractérise par des teneurs plus élevées de *sabinene* et *terpinène-4-ol*.

En revanche, il a été constaté que les rendements (%v/m) en huiles essentielles de galles (jusqu'à 1,89%) sont effectivement plus importants et plus intéressants que ceux qui ont été enregistrés dans la bibliographie.

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antiinflammatoires des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* et leur toxicité cellulaire.

Les résultats de cette étude, montrent que les huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf., capable d'inhiber in-vitro la croissance de différentes espèces de *Candida* par rapport aux autres souches microbiennes, avec une toxicité faible vis-à-vis des cellules *Vero* et *C3A*.

Les valeurs de l'indice de sélectivité indiquent la sécurité relative de l'huile essentielle, ce qui reflète le rapport entre la toxicité et l'activité.

Les huiles essentielles présentent une activité antioxydante modérée en termes de piégeage des radicaux libres. Cependant, elles ont été présentées avec une activité anti-inflammatoire importante vis-à-vis de la production de NO et l'inhibition de 15-lipooxygénase (IC₅₀ de 05,62 µg/ml).

Mots clés : Huiles essentielles, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité antiinflammatoire, *Pistacia atlantica* Desf.

Biological activities and chemical analysis of essential oil from Galls of *Pistacia atlantica* Desf.

Abstract

The present work aims to study the chemical composition of essential oils from galls of *Pistacia atlantica* Desf. in different regions, and their biological activity (antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory) and cytotoxicity.

In the first part, multivariate statistical analysis by the principal component analysis (PCA), and the hierarchical cluster analysis (HCA) method, was been used in this scientific study. Which involved the study of a large number of essential oil samples of galls of *Pistacia atlantica* species from different regions has revealed the existence of a second chemotype (-pinene / sabinene / terpinene-4-ol), not yet published previously. This new chemotype was characterized by higher contents of *sabinene* and *terpinene-4-ol*.

However, it was found that the yields (v/w) of essential oils of galls (up 1.89%) are effectively more important and interesting to those who registered in bibliography.

In the second part, we are interested by antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils of *Pistaciaatlantica* and their cytotoxicity.

The results of this study show that essential oils of *Pistaciaatlantica* Desf able to inhibit in-vitro a growth of different species of *Candidaalbicans* compared to other microbial strains with low toxicity against Vero cells and C3A cells.

The selectivity index values indicate the relative safety of the essential oil, which reflects the ratio between toxicity and activity.

The essential oil presents a moderated free radical scavenging activity. However, were presented an important anti-inflammatory activity to inhibit the production of NO and the inhibition of 15-lipooxygenase (IC₅₀ of 05.62µg/ml).

Keywords: Essential oil, Antimicrobial activity, Antioxidant, Anti-inflammatory, *Pistacia atlantica* Desf.

Liste des travaux scientifiques achevés dans le cadre de cette Thèse de Doctorat

Publications internationales

- Gourine, Nadhir; **Sifi, Ibrahim**; Gaydou, Emile M. & Yousfi, Mohamed (2011). Chemical composition of the essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Natural Products Journal*, 1, 125-127.
- Sifi, I.**; Dzoyem, J. P.; Ouinten, M.; Yousfi, M.; McGaw, L. J. & Eloff, J. N. (2015). Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3), 150-155.
- Sifi, I.**; Gourine, N.; Gaydou, E. M. & Yousfi, M. (2015). Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Nat Prod Res*, 29(20), 1945-1949.

Communications internationales

- SIFI, Ibrahim**; EL-HOUITI, Fatiha; GOURINE, Nadhir; YOUSFI, Mohamed & OUINTEN, Mohamed. (2011, 19 - 20 Avril 2011). *Activités antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle des galles du Pistachier de l'Atlas de l'Algérie (Pistacia atlantica Desf.)*. Paper presented at the 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM'2) UKMO, Ouargla – ALGÉRIE.
- SIFI, Ibrahim**; EL-HOUITI, Fatiha; OUINTEN, Mohamed; GOURINE, Nadhir & YOUSFI, Mohamed. (2011, October 8-10th). *Essential Oil of Pistacia atlantica Desf. Chemical Composition by GC and GC-SM*. Paper presented at the Mediterranean Conference on Natural Products "MCNP", Tipaza - ALGÉRIE.
- SIFI, Ibrahim**; EL-HOUITI, Fatiha; YOUSFI, Mohamed & OUINTEN, Mohamed. (2011a, 28-30 Novembre). *Activité antifongique des huiles essentielles des Galles du Pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.) de la région de Ain-oussera*. Paper presented at the Séminaire international sur les forêts et les steppes des milieux semi-arides, Djelfa - ALGÉRIE.

SIFI, Ibrahim; EL-HOUITI, Fatiha; YOUSFI, Mohamed & OUINTEN, Mohamed. (2011b, 12 - 13 Mai). *Activités antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle des galles du Pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.)*. Paper presented at the 4ème Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (SIPAM 4), Casablanca – MAROC.

SIFI, Ibrahim; EL-HOUITI, Fatiha; YOUSFI, Mohamed & OUINTEN, Mohamed. (2011c, 7 et 8 octobre). *Etude de la résistance des souches bactériennes à Gram positif contre les huiles essentielles du Pistachier de l'Atlas de trois régions de l'Algérie*. Paper presented at the Colloque International sur La Problématique de l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques et nouvelles approches thérapeutiques "PEBRA", Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Meknès - MAROC.

Liste des abréviations

| | |
|-----------------------------------|---|
| ABTS | 2,2-azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulphonate |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHA | Hydroxyanisole Butylé |
| BN | Bouillon Nutritif |
| CMB | Concentration Minimale Bactéricide |
| CMI | Concentration Minimale Inhibitrice |
| CPG | Chromatographie Phase Gazeuse |
| D.O | Densité Optique |
| DMSO | Diméthyl Sulfoxyde |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl |
| EC₅₀ | Efficient Concentration value (valeur de la concentration efficace) |
| EtOH | Ethanol |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| GC-MS | Chromatographie phase Gaz couplé avec Spectroscopie de Masse |
| GN | Gélose Nutritif |
| Gpx | Gluthation peroxydase |
| H₂O₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| HE | Huile essentielle |
| I % | Pourcentage d'inhibition |
| IC₅₀ | Inhibition Concentration value (valeur de la concentration inhibitrice) |
| iNOS | Inductible Oxyde nitrique synthase |
| IPP | Isoprényl phosphate |
| LC₅₀ | Lethal concentration value (valeur de la concentration létale) |
| LRVL | Laboratoire Régional Vétérinaire de Laghouat |
| Max. | Maximum |
| MeOH | Méthanol |
| M-H | Muller-Hinton |
| Min. | Minimum |
| Moy. | Moyenne (Mean) |
| NO | Monoxyde d'azote |
| SD | Standard deviation (Ecart type) |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| T % | Teneur en huile essentielle |
| TPTZ | 2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Systématique de <i>Pistacia atlantica</i> Desf. Subsp <i>atlantica</i> | 6 |
| Tableau 2 : Utilisations ethnomédical de <i>Pistacia atlantica</i> | 13 |
| Tableau 3 : Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Pistacia atlantica</i> | 14 |
| Tableau 4 : Mode d'action des huiles essentielles | 34 |
| Tableau 5 : La situation géographique des différentes stations | 47 |
| Tableau 6 : Le rendement en % (v/m) des huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> | 54 |
| Tableau 7 : Moyenne et gamme de variation de la composition chimique des huiles essentielles des galles de l'espèce <i>P. atlantica</i> | 57 |
| Tableau 8 : Moyenne et gamme de variation de la composition chimique des huiles essentielles de galles de l'espèce <i>P. atlantica</i> | 59 |
| Tableau 9 : Moyenne et gamme de variation de deux chemotypes identifiés des huiles essentielles de galles de l'espèce <i>P. atlantica</i> | 65 |
| Tableau 10 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition, en millimètres, notés après application des HE, pour les différentes souches testées | 102 |
| Tableau 11 : La concentration minimale inhibitrice en (µg/ml) des huiles essentielles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf. | 108 |
| Tableau 12 : Valeurs des EC ₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huiles essentielles (A et L) avec standards | 113 |
| Tableau 13 : Valeurs des EC ₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huiles essentielles (A et L) avec standards | 115 |
| Tableau 14 : Valeurs de Test FRAP en µmol Fe ²⁺ /g d'échantillon d'huiles essentielles (A et L) | 117 |
| Tableau 15 : Valeurs d'IC ₅₀ en (µg/ml) de l'inhibition de 15-LOX par les huiles essentielles | 120 |
| Tableau 16 : Valeurs de l'indice de sélectivité des huiles essentielles de <i>P. atlantica</i> sur les cellules <i>Vero Cell</i> et <i>C3A</i> | 129 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Le pied du Pistachier d'atlas..... | 8 |
| Figure 2 : Les feuilles du Pistachier d'atlas | 8 |
| Figure 3 : Les fruits du Pistachier d'atlas..... | 8 |
| Figure 4 : Les galles du Pistachier d'atlas..... | 9 |
| Figure 5 : Illustration des différents types de galles formées par les insectes gallicoles, de types <i>Fordini</i> et <i>Baizongiini</i> (Inbar <i>et al.</i> , 2004)..... | 10 |
| Figure 6 : L'aire de répartition des sous espèces de <i>Pistacia atlantica</i> Desf., dans le monde..... | 11 |
| Figure 7 : Unité isoprénique (C5) | 23 |
| Figure 8 : La structure chimique des monoterpènes (Terpènes et Terpénoïdes) | 24 |
| Figure 9 : La structure chimique des sesquiterpènes (Terpènes et Terpénoïdes) | 26 |
| Figure 10 : La structure chimique des composés aromatiques | 26 |
| Figure 11 : Sites et mécanismes d'action des huiles essentielles dans la cellule bactérienne (Burt, 2004)..... | 35 |
| Figure 12 : Cartes géographiques représentant les stations de récolte (A, L, K, T) | 48 |
| Figure 13 : Appareil de l'hydro-distillation type <i>Clevenger</i> (Original)..... | 50 |
| Figure 14 : Facteur de chargement de 14 variables sur les axes F1 et F2 en utilisant l'analyse en composantes principales de 52 échantillons d'huiles essentielles de <i>P. atlantica</i> | 61 |
| Figure 15 : Graphe en deux dimensions sur les axes F1 et F2 en utilisant l'analyse en composantes principales de 52 échantillons d'huiles essentielles de <i>P. atlantica</i> | 62 |
| Figure 16 : Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse des clusters de 52 échantillons d'huiles essentielles de <i>P. atlantica</i> de différentes régions. Les échantillons se regroupent en utilisant la technique de Ward avec une mesure de distance euclidienne | 63 |
| Figure 17 : Classification des méthodes antimicrobienne (Choma & Grzelak, 2011)..... | 72 |
| Figure 18 : Conséquences de l'oxydation des biopolymères (Houée-Levin <i>et al.</i>, 2005)..... | 78 |
| Figure 19 : Rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde..... | 80 |
| Figure 20 : Structure chimique de tocophérols..... | 80 |
| Figure 21 : Structure chimique du β -carotène..... | 81 |
| Figure 22 : Schéma représente la méthode d'antibiogramme (Zaika, 1988)..... | 88 |
| Figure 23 : Schéma récapitulatif montre la méthode micro-atmosphère (Zaika, 1988)..... | 90 |
| Figure 24 : Schéma récapitulatif montre la méthode micro-dilution en utilisant les microplaques à 96 puits | 90 |
| Figure 25 : Réduction du radical libre DPPH• | 92 |
| Figure 26 : Réduction du radical cationique ABTS•+..... | 93 |
| Figure 27 : Réaction de Fenton..... | 94 |
| Figure 28 : Exemple de format de microplaque (COX assay)..... | 97 |
| Figure 29 : Exemple de format de microplaque (MTT assay)..... | 100 |
| Figure 30 : Histogrammes montre les valeurs maximales et minimales des diamètres des zones d'inhibition pour les deux régions d'étude (Ain oussera et Laghouat)..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| Figure 31 : Des photos illustrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf., par la méthode de disques | 104 |
| Figure 32 : Diamètre de zone d'inhibition (mm) de l'activité anti <i>Candida albicans</i> par la méthode micro-atmosphère | 105 |
| Figure 33 : Des photos illustrant l'activité Anti <i>candida albicans</i> des huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf., par la méthode micro-atmosphère..... | 106 |
| Figure 34 : Histogrammes montre les valeurs minimales des CMI ($\mu\text{g/ml}$) pour les deux régions d'étude (<i>Ain oussera</i> et <i>Laghout</i>)..... | 107 |
| Figure 35 : Des photos illustrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf., par la méthode micro-dilution (CMI)..... | 109 |
| Figure 36 : Courbe présente le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et les standards par le test radicalaire DPPH | 114 |
| Figure 37 : Courbe présente le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et les standards par le test ABTS | 116 |
| Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la solution FeSO_4 | 117 |
| Figure 39 : Photos illustrant l'activité antioxydante aux plaques de micro-titration (96 puits) | 119 |
| Figure 40 : Histogrammes montre le % d'inhibition de COX-1 et COX-2 par les huiles essentielles (A et L) de <i>Pistacia atlantica</i> | 121 |
| Figure 41 : Histogrammes montre le % d'inhibition du NO produit par des cellules macrophages type (Raw264.7) et le % de viabilité cellulaire utilisant les huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> de deux région d'étude (<i>Ain-oussera</i> et <i>Laghout</i>)..... | 123 |
| Figure 42 : Photos illustrant l'activité anti-inflammatoire sur des microplaques de 96 puits | 124 |
| Figure 43 : Histogrammes montre les valeurs de LC50 ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles des galles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf sur les cellules <i>Vero</i> et <i>C3A</i> | 128 |
| Figure 44 : Photo illustre la cytotoxicité des huiles essentielles en utilisant le test MTT..... | 130 |
| Figure 45 : Courbe présente l'effet des huiles essentielles sur le pourcentage de viabilité de cellules (<i>Vero</i> et <i>C3A</i>) | 131 |

Table de Matières

III

| | |
|---|------|
| Résumé..... | IV |
| Abstract..... | V |
| Liste des travaux scientifiques achevés dans le cadre de cette thèse de doctorat..... | VI |
| Liste des abréviations | VIII |
| Liste des tableaux..... | IX |
| Liste des figures..... | X |

| | |
|-----------------------------------|----------|
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
|-----------------------------------|----------|

CHAPITRE 1 : LE PISTACHIER D'ATLAS

| | |
|---|-----------|
| 1. DESCRIPTION BOTANIQUE..... | 6 |
| 1.1. SYSTEMATIQUE | 6 |
| 1.2. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES | 7 |
| 2. LES GALLES (DEFINITION ET FORMATION)..... | 9 |
| 2.1. DEFINITION..... | 9 |
| 2.2. FORMATION DES GALLES | 9 |
| 3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE..... | 11 |
| 4. IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE ET UTILISATIONS..... | 12 |
| 4.1. L'IMPORTANCE ECONOMIQUE..... | 12 |
| 4.2. L'IMPORTANCE ALIMENTAIRE | 12 |
| 4.3. L'IMPORTANCE EN MEDECINE TRADITIONNELLE | 13 |
| 4.4. L'IMPORTANCE COSMETIQUE TRADITIONNEL..... | 13 |
| 5. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LE PISTACHIER DE L'ATLAS | 14 |
| 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 16 |

CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES

| | |
|--|-----------|
| 1. DEFINITIONS, REPARTITION, LOCALISATION ET ROLE DES HUILES ESSENTIELLES | 21 |
| 1.1. DEFINITIONS..... | 21 |
| 1.2. REPARTITION | 21 |
| 1.3. LOCALISATION | 21 |
| 1.4. ROLE..... | 21 |
| 2. LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 22 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.1. | TERPENES ET TERPENOÏDES..... | 23 |
| 2.2. | COMPOSES AROMATIQUES | 25 |
| 2.3. | AUTRES COMPOSES..... | 26 |
| 3. | LES FACTEURS DE LA VARIABILITE DES HUILES ESSENTIELLES... .. | 27 |
| 3.1. | INFLUENCE DU CYCLE VEGETATIF | 27 |
| 3.2. | INFLUENCE DES FACTEURS EXTRINSEQUES | 27 |
| 3.3. | INFLUENCE DU PROCEDE D'OBTENTION DES HUILES ESSENTIELLES | 27 |
| 3.4. | EXISTENCE DE CHIMIOTYPES OU <i>CHEMOTYPES</i> | 27 |
| 4. | LES METHODES D'EXTRACTION, CONSERVATION ET ANALYSES.. .. | 28 |
| 4.1. | LES METHODES D'EXTRACTION | 28 |
| 4.1.1. | La distillation | 28 |
| 4.1.2. | L'extraction par micro-ondes | 29 |
| 4.1.3. | L'extraction par solvants organiques | 29 |
| 4.1.4. | L'extraction par graisse (Enfleurage) | 29 |
| 4.1.5. | L'extraction au CO ₂ supercritique | 29 |
| 4.2. | LA CONSERVATION | 29 |
| 4.3. | LES METHODES D'ANALYSE | 30 |
| 5. | ACTIVITES, MODE D'ACTION ET TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES | 31 |
| 5.1. | ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 31 |
| 5.1.1. | Activité antimicrobienne..... | 31 |
| 5.1.2. | L'activité antioxydante | 32 |
| 5.1.3. | L'activité anticancéreuse | 33 |
| 5.1.4. | L'activité anti-inflammatoire | 33 |
| 5.2. | LE MODE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES | 34 |
| 5.3. | LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES | 36 |
| 6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 37 |

CHAPITRE 3 : ANALYSE CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUCTION..... | 45 |
| 2. | MATERIEL ET METHODES | 47 |
| 2.1. | PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL | 47 |
| 2.1.1. | Récolte des échantillons | 47 |
| 2.1.2. | Séchage et conservation du matériel végétal..... | 49 |
| 2.2. | EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES | 49 |
| 2.2.1. | Procédé d'extraction | 49 |
| 2.2.2. | Calcul du rendement | 49 |
| 2.2.3. | Conservation | 49 |
| 2.3. | ANALYSE CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 51 |
| 2.3.1. | Chromatographie en phase gazeuse (CPG) | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.2. CPG couplée avec spectromètre de masse (GC-MS) | 51 |
| 2.3.3. Identification des composés | 51 |
| 2.4. ANALYSE STATISTIQUE ET TRAITEMENT DES DONNEES | 53 |
| 3. RESULTATS ET DISCUSSION | 54 |
| 3.1. RENDEMENT EN HUILES ESSENTIELLES | 54 |
| 3.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 56 |
| 3.3. ANALYSE STATISTIQUE (TRAITEMENT DES DONNEES)..... | 60 |
| 3.3.1. L'analyse en composantes principales (ACP)..... | 60 |
| 3.3.2. La classification ascendante hiérarchique (CAH)..... | 62 |
| 3.4. DISCUSSION..... | 63 |
| 4. CONCLUSION | 67 |
| 5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 68 |
| CHAPITRE 4 : ACTIVITÉ BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES | |
| 1. INTRODUCTION..... | 71 |
| 2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE..... | 72 |
| 2.1. EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 73 |
| 2.2. EVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 74 |
| 2.3. SOUCHES MICROBIENNES UTILISEES DANS CETTE ETUDE..... | 75 |
| 3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE..... | 77 |
| 3.1. PROTECTION CONTRE LE STRESS OXYDATIF | 78 |
| 3.1.1. Défense enzymatique..... | 79 |
| 3.1.2. Défense non enzymatique | 80 |
| 3.2. EVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE..... | 82 |
| 3.3. EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 82 |
| 4. ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE | 83 |
| 4.1. MEDiateurs DE L'INFLAMMATION..... | 83 |
| 4.2. ESPECES OXYDatives COMME MEDiateur INFLAMMATOIRE..... | 85 |
| 4.3. PLANTE PHYTOCHIMIQUES COMME AGENTS ANTI-INFLAMMATOIRES..... | 86 |
| 4.4. MECANISMES DE MODELES DE TEST ANTI-INFLAMMATOIRES | 86 |
| 5. MATERIEL ET METHODES | 87 |
| 5.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 87 |
| 5.1.1. Source des souches microbiennes..... | 87 |
| 5.1.2. Pré-culture des souches microbiennes..... | 87 |
| 5.1.3. Méthode des disques (Aromatogramme) | 88 |
| 5.1.4. Méthode micro-atmosphère | 89 |
| 5.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 90 |
| 5.2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE..... | 92 |
| 5.2.1. Test de piégeage de radical libre DPPH' | 92 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.2.2. | Test de piégeage du radical cation ABTS ^{•+} | 93 |
| 5.2.3. | Test FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) | 94 |
| 5.3. | ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE | 95 |
| 5.3.1. | Test d'inhibition de la lipoxygénase (15-LOX) | 95 |
| 5.3.2. | Test d'inhibition de la cyclooxygénase | 96 |
| 5.3.3. | Test de production de NO par les macrophages activés | 97 |
| 5.4. | ACTIVITE DE CYTOTOXICITE CELLULAIRE <i>IN-VITRO</i> (TEST MTT) | 98 |
| 5.5. | ANALYSE STATISTIQUE | 100 |
| 6. | RESULTATS ET DISCUSSION | 101 |
| 6.1. | RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 101 |
| 6.1.1. | Méthode des disques | 101 |
| 6.1.2. | Méthode micro-atmosphère | 105 |
| 6.1.3. | Détermination de (CMI) | 107 |
| 6.1.4. | Discussion | 110 |
| 6.2. | RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 113 |
| 6.2.1. | Méthode DPPH [•] | 113 |
| 6.2.2. | Méthode ABTS ^{•+} | 115 |
| 6.2.3. | Méthode FRAP | 117 |
| 6.2.4. | Discussion | 118 |
| 6.3. | RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE | 120 |
| 6.3.1. | Test d'inhibition de la lipoxygénase (15-LOX) | 120 |
| 6.3.2. | Test d'inhibition de (COX-1) et (COX-2) | 121 |
| 6.3.3. | Test de production de NO par les macrophages activés | 122 |
| 6.3.4. | Discussion | 125 |
| 6.4. | RESULTATS DE L'CYTOTOXICITE CELLULAIRE | 128 |
| 6.4.1. | Discussion | 132 |
| 7. | CONCLUSION | 134 |
| 8. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 135 |
| <hr/> | | |
| | CONCLUSION GENERALE | 151 |
| | ANNEXE | 154 |

Introduction Générale

1. INTRODUCTION

L'Algérie est un pays vaste. Ses ressources naturelles sont très importantes. La liste de plantes, d'animaux et autres êtres vivants est interminable. Ces ressources constituent un potentiel pour le développement de divers secteurs (agriculture, industries agro-alimentaire pharmaceutique, cosmétique ...etc.)

L'utilisation des plantes aromatique et des huiles essentielles en thérapeutique, remonte aux temps les plus anciens. Elles sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais, également pour leurs propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Parmi ces composés, on retrouve, dans une grande mesure, les métabolites secondaires utilisés surtout en thérapeutique (Belaïche, 1979).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires de plantes. Elles constituent des mélanges complexes de composés volatils avec une forte odeur. Elles sont synthétisées dans divers organes de la plante, tels que les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les graines, les fruits, les racines, et stockés dans des cellules sécrétrices, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Bakkali *et al.*, 2008; Franz & Novak, 2010). Ces composés volatils assurent des fonctions écologiques variées, agissant en tant que substances de défense contre les micro-organismes et les herbivores. Elles peuvent également être importantes pour attirer les insectes pour la dispersion du pollen et des graines.

Les huiles essentielles ont des utilisations thérapeutiques, en médecine humaine, en raison de leurs attributs anticancéreux, anti-inflammatoire, antivirale et antibactérienne ainsi que des propriétés antioxydantes (Buchbauer, 2010). En outre, l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus populaire pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, vu que les consommateurs sont plus conscients des problèmes de santé causés par plusieurs conservateurs de synthèse.

A cet égard, l'alimentation humaine joue un rôle important dans la protection contre le stress oxydatif, avec un facteur de protection sanitaire attribué à des composés ayant une capacité antioxydante. Les propriétés antioxydantes jouent également un rôle central dans certaines activités biologiques des huiles essentielles justifié par l'implication du stress oxydatif dans la pathologie (Amorati *et al.*, 2013; Dzoyem *et al.*, 2014).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits végétaux est à la base de nombreuses applications, y compris la conservation des aliments, des produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles.

La capacité cytotoxique des huiles essentielles, basée sur une activité pro-oxydante, peut en faire d'excellents agents antiseptiques et antimicrobiens pour des usages personnels. Par exemple, pour la purification de l'air, l'hygiène corporelle ou même, une utilisation interne, via la consommation par voie orale, et pour une utilisation insecticide visant la préservation des cultures et des stocks alimentaires (**Bakkali et al., 2008**).

L'inflammation est une réponse physiologique à une lésion, caractérisée par la perte de la fonction, une douleur, la chaleur, une rougeur et un gonflement. Elle est, habituellement, associée à la pathogénèse de maladies telles que le diabète, l'arthrite, l'obésité, le syndrome métabolique, le cancer et de nombreuses maladies cardiovasculaires (**Bellik et al., 2012; Ma et al., 2013**). Un stimulant immunitaire provoque les cellules pro-inflammatoires, telles que les macrophages et les monocytes, pour commencer à sécréter un certain nombre de médiateurs inflammatoires tels que les interleukines (IL 1, IL-6 et IL-8), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), la cyclooxygénase-2 inducible (COX-2), la prostaglandine E₂ (PGE₂), la 5-lipoxygénase (5-LOX) et l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS). (**Moro et al., 2012; Choi et al., 2014; Taofiq et al., 2015**). La production non contrôlée de ces médiateurs inflammatoires a été connue pour causer plusieurs dommages cellulaires et lancer également le processus d'inflammation (**Kanwar et al., 2009**).

2. OBJECTIFS

Le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) est une plante de la famille des Anacardiaceae. Cette famille recense plusieurs espèces réparties en plusieurs genres. Les plus connus sont : *Pistacia vera*, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia terebinthus*. Les arbres du Pistachier de l'Atlas poussent sauvagement dans les régions arides et semi-arides de l'Algérie.

Plusieurs auteurs qualifient le Pistachier de l'Atlas, comme espèce précieuse, en raison de ces diverses utilisations. Le fruit a été utilisé pour traiter les maux d'estomac, la toux, le stress, et aussi comme anti-diarrhéique. La résine renforce le tissu, le souffle, désodorisant. Les feuilles ont été utilisées contre le diabète et les infections oculaires.

Différentes parties du Pistachier de l'Atlas (les feuilles, l'écorce, les fruits et les galles) ont fait l'objet d'études phytochimiques et microbiologiques (voir Chapitre 2). Cependant, nous n'avons trouvé aucune référence bibliographique concernant l'étude des chemotypes chimiques des huiles essentielles de galles et leur activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire.

Le présent travail entre dans le cadre de la valorisation et connaissance des produits naturels de notre pays. Cette étude est consacrée à la valorisation chimique et biologique des galles du Pistachier de l'Atlas (*P. atlantica* Desf.).

Ce travail de recherche a été réalisé pendant 5 ans (2010 à 2015) au sein du Laboratoire des Sciences Fondamentales, Université Telioudji Amar (Laghouat, Algérie) en collaboration avec le Laboratoire *Phytomedicine Programm Department of Paraclinical Sciences*, Faculté des Sciences Vétérinaires, Université de Pretoria (Afrique du Sud).

Notre travail a pour objectif l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des galles de *P. atlantica* Desf., de différentes régions d'Algérie, ainsi que leur activités biologiques (antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire) ainsi que leur toxicité. Notre travail est subdivisé en six chapitres importants :

- ❖ Le premier et le deuxième chapitre constituent un aperçu bibliographique, dans lequel nous rappelons la description et l'intérêt du Pistachier de l'Atlas, suivi de généralités sur les huiles essentielles, leurs méthodes d'extraction et d'analyse, leurs activités et leurs modes d'action.
- ❖ Le troisième chapitre, est consacré à la partie chimique. Elle est structurée en trois volets :
 - ✓ Extraction des huiles essentielles d'échantillons issus de différentes régions d'études ;
 - ✓ Détermination des teneurs en huiles essentielles ;
 - ✓ Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par GC-MS.
- ❖ Dans le quatrième chapitre ; les activités biologiques de nos huiles essentielles ont été évaluées par différentes méthodes : activité antimicrobienne ; activité antioxydantes ; activité anti-inflammatoire et la cytotoxicité des huiles essentielles.

3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amorati, Riccardo; Foti, Mario C & Valgimigli, Luca. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475.
- Belaiche, P. (1979). *Traite de Phylotherapie et d'aromatherpie-Tome 1*: Paris: Maloine SA Editeur, 204p.
- Bellik, Yuva; Boukraâ, Laid; Alzahrani, Hasan A; Bakhotmah, Balkees A; Abdellah, Fatiha; Hammoudi, Si M & Iguer-Ouada, Mokrane. (2012). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules*, 18(1), 322-353.
- Buchbauer, G. (2010). Biological activities of essential oils. In K. H. C. Ba er, Buchbauer, G. (Ed.), *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* (pp. 235-280). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Choi, Solip; Nguyen, Van Thu; Tae, Nara; Lee, Suhyun; Ryoo, Sungwoo; Min, Byung-Sun & Lee, Jeong-Hyung. (2014). Anti-inflammatory and heme oxygenase-1 inducing activities of lanostane triterpenes isolated from mushroom *Ganoderma lucidum* in RAW264. 7 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 280(3), 434-442.
- Dzoyem, Jean Paul; Kuete, Victor; McGaw, Lyndy J & Eloff, Jacobus N. (2014). The 15-lipoxygenase inhibitory, antioxidant, antimycobacterial activity and cytotoxicity of fourteen ethnomedicinally used African spices and culinary herbs. *Journal of ethnopharmacology*, 156, 1-8.
- Franz, C. & Novak, J. (2010). Sources of essential oils. In K. H. C. Ba er, Buchbauer, G. (Ed.), *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* (pp. 39-82). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Kanwar, Jagat R; Kanwar, Rupinder K; Burrow, Hannah & Baratchi, Sara. (2009). Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Current medicinal chemistry*, 16(19), 2373-2394.
- Ma, Lishuai; Chen, Haixia; Dong, Peng & Lu, Xueming. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food chemistry*, 139(1), 503-508.
- Moro, Carlos; Palacios, Irene; Lozano, Miguel; D'Arrigo, Matilde; Guillamón, Eva; Villares, Ana, . . . García-Lafuente, Ana. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130(2), 350-355.
- Taofiq, Oludemi; Calhelha, Ricardo C; Heleno, Sandrina; Barros, Lillian; Martins, Anabela; Santos-Buelga, Celestino, . . . Ferreira, Isabel CFR. (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821-827.

CHAPITRE 1 :

Le Pistachier d'Atlas

(Présentation de la plante étudiée)

| | |
|--|-----------|
| 1. DESCRIPTION BOTANIQUE..... | 6 |
| 1.1. SYSTEMATIQUE..... | 6 |
| 1.2. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES..... | 7 |
| 2. LES GALLES (DEFINITION ET FORMATION)..... | 9 |
| 2.1. DEFINITION..... | 9 |
| 2.2. FORMATION DES GALLES..... | 9 |
| 3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE..... | 11 |
| 4. IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE ET UTILISATIONS..... | 12 |
| 4.1. L'IMPORTANCE ECONOMIQUE..... | 12 |
| 4.2. L'IMPORTANCE ALIMENTAIRE..... | 12 |
| 4.3. L'IMPORTANCE EN MEDECINE TRADITIONNELLE..... | 13 |
| 4.4. L'IMPORTANCE COSMETIQUE TRADITIONNEL..... | 13 |
| 5. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LE PISTACHIER DE L'ATLAS..... | 14 |
| 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 16 |

1. DESCRIPTION BOTANIQUE

Le pistachier de l'Atlas est distingué depuis Desfontaines, qui l'a décrit en 1799 (Monjauze, 1980).

1.1. Systématique

Nous présentons ci-dessous la plus récente phylogénie du *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* selon (APG II, 2003; Thorne & Reveal, 2007) (Tableau 1) :

Tableau 1 : Systématique du *Pistacia atlantica* Desf. Subsp *atlantica*

| | |
|----------------------|--|
| Division | Angiospermes (APG II 2003) |
| Classe | Eudicots (APG II 2003) |
| Sous-classe | Core eudicots (APG II 2003) |
| Superordre | Rosids (APG II 2003) |
| Sous-ordre | Eurosids II (APG II 2003) |
| Ordre | Sapindales Dumort. (1829) (Thorne et Reveal, 2007) |
| Famille | Anacardiaceae R.Br. (1818) (Thorne et Reveal, 2007) ou Pistaciaceae Martinov (1820) (Thorne et Reveal, 2007) ou |
| Sous –famille | Anacardioideae Link (1831) (Thorne et Reveal, 2007) ou Pistacioideae Burnett (1835) (Thorne et Reveal, 2007) |
| Genre | <i>Pistacia</i> |
| Espèce | <i>atlantica</i> Desf. |
| Subsp | <i>atlantica</i> |

Le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) ; *elbetoum*, *botma*, *betouma* ou *btouma* en Arabe local et *Iggh* en berbère, est un bel arbre, (Belhadj, 2001).

1.2. Caractéristiques botaniques

Pistacia atlantica est un arbre dioïque, de 15 à 20 mètres de hauteur, à tronc pouvant atteindre 1 mètre de diamètre avec une très volumineuse couronne arrondie (Monjauze, 1980 & El Oualidi *et al.*, 2004). (Figure 1).

➤ Les feuilles

Elles sont caduques, composées de sept à neuf folioles lancéolées, un peu ondulées, glabres, et portées sur un pétiole légèrement ailé. Les feuilles, composées, sont constituées de 7 à 8 folioles, à pétioles un peu ailés, coriaces et sont relativement grandes ; elles rougissent à l'automne et tombent (Figure 2) (Daget & Godron, 1974; Amara, 2009).

➤ Les fleurs

Les fleurs mâles constituent des inflorescences terminales, à calice de 3 à 5 sépales pubescents et 5 à 7 étamines à filaments très courts. Les fleurs femelles sont en grappes paniculées, à calice très petit. L'ovaire est super, uniloculaire et surmonté de 3 styles pourpres. La floraison dure plusieurs mois ; elle débute vers le mois d'avril (Daget & Godron, 1974; El Oualidi *et al.*, 2004).

➤ Les fruits

Le fruit est une drupe ovoïde de 6 à 8 mm de long, d'abord jaune puis bleu foncé à maturité, à un seul noyau osseux, ne contenant qu'une graine. Ils sont appelés *El-Khodiri* par les populations locales ; appellation dûe à la prédominance de la couleur vert-foncé à maturité. Ce sont des drupes comestibles, pouvant atteindre la grosseur d'un pois. Elles sont légèrement ovales et aplaties, riches en huile dense, très énergétique. La fructification s'achève en juillet (Figure 3) (Daget & Godron, 1974; Somon, 1987; Belhadj, 2001).



Figure 1: Le pied du Pistachier d'atlas



Figure 2 : Les feuilles du Pistachier d'atlas



Figure 3 : Les fruits du Pistachier d'atlas

2. LES GALLES (DEFINITION ET FORMATION)

2.1. Définition

Par définition la galle est :

- ✓ Une excroissance produite chez les végétaux sous l'influence de certains parasites (insectes, champignons) (**Larousse, 2010**).
- ✓ Un gonflement anormal, du tissu végétal, provoqué par l'infection causée par des bactéries, des mycètes, des virus, ou des nématodes, ou bien par l'irritation provoquée par des insectes et des acarides (**Encyclopædia Britannica, 2015**).

Selon **Álvarez et al. (2009)**, les galles se développent sur les plantes en réponse à une induction causée par plusieurs organismes: les microorganismes, les nématodes et les acariens. En outre, il y a plus de 15.000 espèces d'insectes gallicoles. Les galles peuvent être trouvées sur de nombreux organes de la plante hôte et un organe de plante donnée peut supporter différents types de galles (Figure 4).



Figure 4 : Les galles du Pistachier d'Atlas

2.2. Formation des galles

Le mécanisme de formation de galles par les insectes reste peu connu. Cependant, les insectes semblent contrôler la formation de galles (**Shorthouse & Rohfritsch, 1992**). Les facteurs moléculaires désignés comme des agents inducteurs de la formation de galles sont les phytohormones ; les acides aminés, les protéines et les virus mutualistes ont également été proposées.

Ce qui semble clair, c'est que la formation de galles comporte des cellules capables de renouveler leur activité méristématique.

Chez le genre *Pistacia* on rencontre deux sous famille d'insecte induisant la formation des galles: les *Pemphiginae* et les *Fordinea*(Álvarez *et al.*, 2009).

Selon Wool (2006) et (Martinez, 2008), chez la famille des Anacardiaceés (ou *Pistaciaceés*), deux types d'insectes gallicoles peuvent être distingués (Figure 5) :

- ✓ Le type *Fordini* : espèces produisant des galles de forme ressemblant au pois ou bien des galles sur la marge des feuilles (l'espèce *Forda riccobonii* sur *Pistacia atlantica* Desf., par exemple).
- ✓ Le type *Baizongiini* : un ensemble d'espèces d'insectes produisant des galles bourgeonnantes qui prennent la forme d'une banane (l'espèce *Baizogiapistaciae* L. sur le *Pistacia palaestina* Boiss., par exemple).

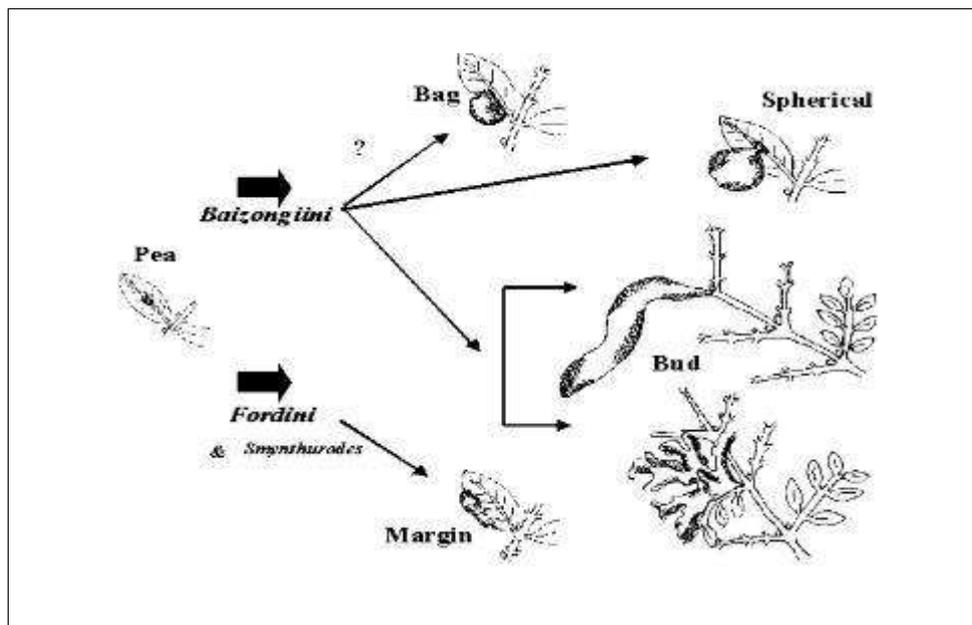


Figure 5 : Illustration des différents types de galles formées par les insectes gallicoles, de types *Fordini* et *Baizongiini* (Inbar *et al.*, 2004)

3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Selon **Benhassaini (2003)**, les chercheurs du laboratoire des ressources génétiques de plantes du Canada « *Plant Gène Ressources of Canada Laboratory* », en se basant sur l'étude de différentes vérifications taxonomiques et l'utilisation de techniques récentes de phylogénie moléculaire et de chimiotaxonomie, ont abouti à la classification du pistachier de l'Atlas, selon la région où il se trouve, en quatre sous-espèces :

- ✓ *Pistacia atlantica* Desf. sous-espèce, *atlantica* (Région Nord-africaine) ;
- ✓ *Pistacia atlantica* Desf. sous-espèce, *cabulica* (Région Asie tempérée et tropicale) ;
- ✓ *Pistacia atlantica* Desf. sous-espèce, *mutica* (Région Europe et Asie tempérée) ;
- ✓ *Pistacia atlantica* Desf. sous-espèce, *kurdica* (Région Asie tempérée).

Les sous-espèces de *Pistacia atlantica* (*cabulica*, *Mutica*, *Kurdica* et *atlantica*) occupent une aire très vaste, englobant le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, la Syrie, la Jordanie, la Palestine, l'Iran et l'Afghanistan (Figure 6) (**Kaska et al., 1995; Sheibani, 1995**).

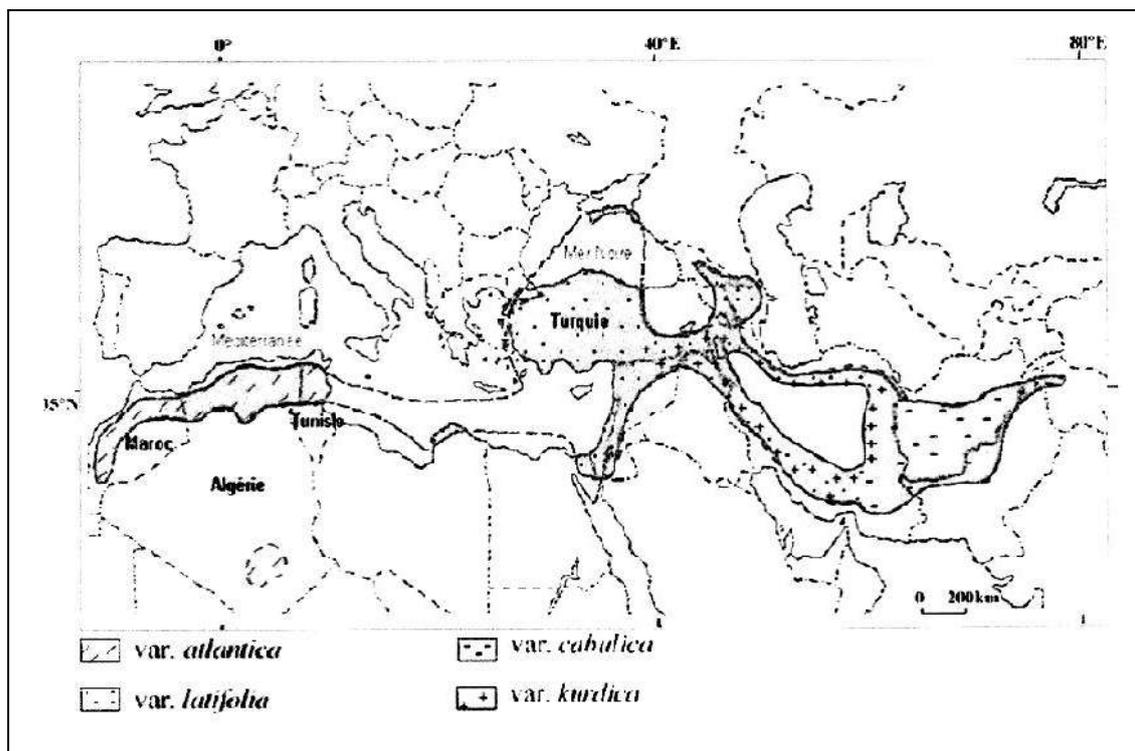


Figure 6 : L'aire de répartition des sous espèces de *Pistaciaatlantica* Desf., dans le monde.

Quézel & Santa (1963) précisent qu'en Algérie, le *betoum* est assez commun, sauf dans les zones très arrosées. Il existe à l'état disséminé, dans la région de *Djelfa*

(*AinOussera*, *Messaâd* et *Senalba*), de *Laghouat* (partie sud) et de *Ghardaïa* (dans l'oued M'zab).

4. IMPORTANCE SOCIO-ECONOMIQUE ET UTILISATIONS

Plusieurs auteurs (**Daget & Godron, 1974; Monjauze, 1980; Belhadj, 2001; Benhassaini, 2003; El Oualidi et al., 2004**) qualifient *Pistacia atlantica* Desf., comme espèce précieuse, en raison de ses diverses utilisations.

4.1. L'importance économique

Sur le plan économique, le pistachier de l'Atlas présente des qualités très appréciées par les populations locales :

- ✓ Le système racinaire du pistachier de l'Atlas est très vigoureux. C'est pour cette raison qu'il constitue un excellent porte-greffe pour le Pistachier vrai (*Pistaciavera*).
- ✓ Le bois est utilisé pour produire du charbon et les cendres sont utilisées pour fabriquer du savon (savon de *Taza*). Le bois du *Bétoum* sert comme mâts de tentes et de charrues. Il est, aussi, utilisé pour le chauffage dans les zones reculées.
- ✓ Les feuilles et leurs galles sont utilisées pour le tannage ;
- ✓ Le suc desséché, retiré du tronc, est utilisé comme encre ("*Smagh*").

4.2. L'importance alimentaire

Les produits et sous-produits du pistachier de l'Atlas connaissent diverses utilisations alimentaires :

- ✓ Le fruit, écrasé et mélangé aux dattes, est comestible. Il fut énormément consommé dans les périodes de disette, dans le passé ;
- ✓ L'huile, extraite des amandes, est utilisée en cuisine. Elle est souvent mélangée aux dattes écrasées et consommée, à toute heure de la journée, avec du petit lait. Cette huile, très appréciée dans la région, possède un goût comparable à celui du beurre ;
- ✓ Les graines sont utilisées, comme aliment, par la population locale. Séchées, écrasées ou moulues, les graines sont consommées en boulettes avec de l'eau sucrée ou bien séchées et croquées, telles qu'elles, comme les cacahuètes.

- ✓ Selon l'étude menée par **Benhassaini (2007)**, les graines du *Pistacia atlantica* Desf. présentent un taux considérable de protéines et de glucides. De plus, elles fournissent une excellente huile alimentaire ; avec un taux de l'ordre de 40%.

4.3. L'importance en médecine traditionnelle

L'utilisation médicale de différentes parties de l'espèce *Pistacia atlantica*, provenant de différentes régions sont listés dans le Tableau 2.

Tableau 2: Utilisations ethnomédical de *Pistaciaatlantica*

| Régions | Partie utilisée | Utilisations traditionnelles et Rapports ethnobotaniques | Références |
|----------|-----------------|---|---|
| Algérie | Fruits | Maux d'estomac, la toux, le stress, tonique, et anti-diarrhéique | (Yousfi <i>et al.</i> , 2002; Mecherara-Idjeri <i>et al.</i> , 2008a) |
| Grèce | Fruits | Arôme de bouche, bronzage, et comme fourrage | (Tzakou <i>et al.</i> , 2007) |
| | Partie aérienne | Vétérinaire | (Tzakou <i>et al.</i> , 2007) |
| Iran | Résine, écorce | Douleurs articulaires, maux de dents, la cicatrisation des plaies | (Mosaddegh <i>et al.</i> , 2012) |
| Jordanie | Fruits | Maux d'estomac | (Lev & Amar, 2002) |
| | Feuilles | Antidiabétique | (Hamdan, I. & Afifi, F., 2004) |
| Maroc | Feuilles | Infection des yeux | (El-Hilaly <i>et al.</i> , 2003) |
| | Résine | Renfort le tissu, le souffle, désodorisant, toux, froid, et les maladies de l'estomac | (Barrero <i>et al.</i> , 2005) |
| Turquie | Fruits | Aphteuse | (Altundag & Ozturk, 2011) |
| | Feuilles | Aliments comme les légumes | (Peksel <i>et al.</i> , 2010) |
| | Résine | Cicatrisation des plaies | (Altundag & Ozturk, 2011) |

4.4. L'importance cosmétique traditionnel

- ✓ La galle est utilisée en poudre, mélangée au henné, pour soigner les cheveux. La galle grillée, broyée et mélangée au cuivre brûlé (*hdidahamra*) sert à teinter les cheveux, en noir.
- ✓ Le suc résineux est mâché pour se parfumer la bouche et donner plus d'éclat aux dents.
- ✓ La gomme du Pistachier (*meskahorra*) est mâchée pour purifier l'haleine.

5. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LE PISTACHIER DE L'ATLAS

Différentes parties du Pistachier de l'Atlas (les feuilles, l'écorce, les fruits et les galles) ont fait l'objet d'études phytochimique et microbiologique. L'ensemble des travaux scientifiques, publiés par plusieurs auteurs sur différentes parties de l'espèce *Pistacia atlantica* Desf., sont listés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Travaux antérieurs sur l'espèce *Pistacia atlantica*

| Partie utilisée de plante | Etudes | Références |
|----------------------------|---|--|
| Feuilles | Composition en flavonoïdes | (Mosharrafa <i>et al.</i> , 1999) |
| Fruits | Composition en acides gras et triglycérides | (Yousfi <i>et al.</i> , 2002; Yousfi <i>et al.</i> , 2003; Yousfi <i>et al.</i> , 2005; Benhassaini <i>et al.</i> , 2007; Farhoosh <i>et al.</i> , 2008) |
| Oléorésine | Composition chimique de l'oléorésine | (Delazar <i>et al.</i> , 2003; Benhassaini <i>et al.</i> , 2008) |
| Feuilles, Fruits et Galles | Composition en huiles essentielles | (Barrero <i>et al.</i> , 2005; Tzakou <i>et al.</i> , 2007; Mecherara-Idjeri <i>et al.</i> , 2008b; Gourine <i>et al.</i> , 2011) |
| Feuilles, Fruits | Activité antioxydante des huiles essentielles | (Benhammou <i>et al.</i> , 2008; Gourine <i>et al.</i> , 2010) |
| Feuilles | Activité antibactérienne et antifongique | (Benhammou <i>et al.</i> , 2008; Bachir Raho & Benali, 2009; Benabderrahmane <i>et al.</i> , 2009; Bachir Raho & Benali, 2010) |
| Fruits | Isolement d'un nouveau composé hispolone | (Yousfi <i>et al.</i> , 2009) |

| | | |
|--------|---|--------------------------------------|
| Galles | Activité antioxydante, Activité anti-mycobactérien, Activité anti-inflammatoire et cytotoxicité des huiles essentielles | (Sifi, Dzoyem, <i>et al.</i> , 2015) |
|--------|---|--------------------------------------|

Par ailleurs, aucune référence bibliographique concernant l'étude des chemotypes chimique des huiles essentielles de galles n'a été trouvée. De plus, aucune référence bibliographique concernant les activités antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire n'a été rapportée dans la bibliographie.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altundag, Ernaz & Ozturk, Munir. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 19, 756-777.
- Álvarez, R; Encina, A & Hidalgo, N Pérez. (2009). Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Science*, 176(2), 303-314.
- Amara, M. (2009). *Contribution à l'étude de Pistacia atlantica Desf. dans le Nord-Ouest Algérien : Aspect écologiques et cartographie*. (Thèse de Magister : Ecologie végétale), Université de Tlemcen. 150p.
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399–436.
- Bachir Raho, Ghalem & Benali, Mohamed. (2009). Bactericidal activity of *Pistacia atlantica*. Desf mastic gum against certain pathogens. *African Journal of Plant Science*, 3(1), 013-015.
- Bachir Raho, Ghalem & Benali, Mohamed. (2010). Antimicrobial activity determination of the gum of *Pistacia atlantica* Desf. oil. *African Journal of Microbiology Research*, 4(23), 2457-2460.
- Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, J. F.; Akssira, M.; Mellouki, F.; Belgarrabe, A. & Blazquez, M. A. (2005). Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 17(1), 52-54.
- Belhadj, S. (2001). Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. In B. E. Ak (Ed.), *XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds* (Vol. 56, pp. 107-109). Sanliurfa (Turkey): Zaragoza : CIHEAM.
- Benabderrahmane, M.; Benali, M.; Aouissat, H. & Jordan Bue, M.-J. (2009). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie*, 7, 304–308.
- Benhammou, Nabila; Bekkara, Fawzia Atik & Panovska, Tatjana Kadifkova. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 022-028.
- Benhassaini, H; Bendahmane, M & Benchalgo, N. (2007). The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2), 121-124.

- Benhassaini, H. (2003). *Contribution à l'étude de l'autoécologie de Pistacia atlantica Desf. ssp. I et valorisation*. (Thèse de Doctorat), Université de Sidi Bel-Abbès. 93p.
- Benhassaini, Hachemi; Bendeddouche, Fatima Z; Mehdadi, Zoheir & Romane, Abderrahmane. (2008). GC/MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* Desf. subsp *atlantica* from Algeria. *Natural Product Communications*, 3(6), 929-932.
- Daget, Ph. & Godron, M. (1974). *Vocabulaire d'écologie*: Hachette, Paris, 273p.
- Delazar, A.; Nazemieh, H.; Modaresi, Masoud & Afshar, J. (2003). Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*.
- El-Hilaly, Jaouad; Hmammouchi, Mohamed & Lyoussi, Badiâa. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2), 149-158.
- El Oualidi, J.; Ater, M. & Taleb, A. (2004). Conception, essai et valorisation des meilleures pratiques de conservation *in-situ* d'espèces végétales sauvages d'importance économique.: Rapport National du Projet Régional EP/INT/204/GEF (commandité par la FAO).
- Encyclopædia Britannica. (2015). "gall" *In Encyclopædia Britannica*. Retrieved from <http://www.britannica.com/science/gall-plant-disease>.
- Farhoosh, Reza; Tavakoli, Javad & Khodaparast, Mohammad Hossein Haddad. (2008). Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(8), 723-729.
- Gourine, N.; Yousfi, M.; Bombarda, I.; Nadjemi, B.; Stocker, P. & Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops Products*, 31, 203-208.
- Gourine, Nadhir; Sifi, Ibrahim; Gaydou, Emile M. & Yousfi, Mohamed (2011). Chemical composition of the essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Natural Products Journal*, 1, 125-127.
- Hamdan, II & Afifi, FU. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 117-121.
- Inbar, M; Wink, M & Wool, D. (2004). The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall-forming aphids on *Pistacia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(2), 504-511.

- Kaska, N; Caglar, S & Kafkas, S. (1995). Genetic diversity and germplasm conservation of Pistacia species in Turkey. *S. Padulosi, T. Caruso, E. Barone (Edits.), Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome.*
- Larousse. (2010). *Le petit Larousse illustré: en couleurs* (illustrée Ed.): Larousse, 1811p.
- Lev, Efraim & Amar, Zohar. (2002). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2), 131-145.
- Martinez, J-JI. (2008). Impact of a gall-inducing aphid on Pistacia atlantica Desf. trees. *Arthropod-Plant Interactions*, 2(3), 147-151.
- Mecherara-Idjeri, S.; Hassani, A.; Castola, V. & Casanova, J. (2008a). Composition and chemical variability of the essential oil from Pistacia lentiscus L. growing wild in Algeria part I: leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 32-38.
- Mecherara-Idjeri, S.; Hassani, A.; Castola, V. & Casanova, J. (2008b). Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian Pistacia atlantica Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 20(3), 215-219.
- Monjauze, A. (1980). Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica* Desf. Biologie et forêt. *Revue Forestière Française*, 4, 357-363.
- Mosaddegh, Mahmoud; Naghibi, Farzaneh; Moazzeni, Hamid; Pirani, Atefeh & Esmaeili, Somayeh. (2012). Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 80-95.
- Mosharrafa, SAM; Kawashti, SA & Saleh, NAM. (1999). Flavonoids of Pistacia atlantica (Desf.). *Bulletin of the National Research Centre (Egypt)*.
- Peksel, Aysegul; Arisan-Atac, Inci & Yanardag, Refiye. (2010). Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 451-476.
- Quézel, P & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Paris. Ed. CNRS*, 2.
- Sheibani, A. (1995). Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. *S. Padulosi, T. Caruso E. Barone (Edits.), Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome.*
- Shorthouse, Joseph D. & Rohfritsch, Odette. (1992). *Biology of insect-induced galls*: Oxford University Pressp.

- Sifi, I.; Dzoyem, J. P.; Ouinten, M.; Yousfi, M.; McGaw, L. J. & Eloff, J. N. (2015). Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3), 150-155.
- Somon, E. (1987). *Arbres et arbrisseaux en Algérie*. Alger: Edit. OPU, 586p.
- Thorne, R.F. & Reveal, J.L. (2007). An updated classification of the class Magnoliophyta ("Angiospermae"). *Bot. Rev*, 73, 67-181.
- Tzakou, Olga; Bazos, Ioannis & Yannitsaros, Artemios. (2007). Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and fragrance journal*, 22(5), 358-362.
- Wool, D. (2006). Sampling bias in roadsides: the case of galling aphids on *Pistacia* trees. *Biodiversity & Conservation*, 15(7), 2109-2121.
- Yousfi, M; Nadjemi, B; Belal, R; Bombarda, I & Gaydou, EM. (2005). Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* fruit growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(2), 93-96.
- Yousfi, M; Nedjemi, B; Belal, R & Bertal, D Ben. (2003). Étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien. *Oleagineux, Corps gras, Lipides*, 10(5-6), 425-427.
- Yousfi, M; Nedjmi, B; Bellal, R; Ben Bertal, D & Palla, G. (2002). Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(10), 1049-1050.
- Yousfi, Mohamed; Djeridane, Amar; Bombarda, Isabelle; Duhem, Bernard & Gaydou, Emile M. (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research*, 23(9), 1237-1242.

CHAPITRE 2 :

Les Huiles Essentielles

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | DEFINITIONS, REPARTITION, LOCALISATION ET ROLE DES HUILES ESSENTIELLES..... | 21 |
| 1.1. | DEFINITIONS | 21 |
| 1.2. | REPARTITION | 21 |
| 1.3. | LOCALISATION | 21 |
| 1.4. | ROLE | 21 |
| 2. | LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES..... | 22 |
| 2.1. | TERPENES ET TERPENOÏDES | 23 |
| 2.2. | COMPOSES AROMATIQUES..... | 25 |
| 2.3. | AUTRES COMPOSES | 26 |
| 3. | LES FACTEURS DE LA VARIABILITE DES HUILES ESSENTIELLES | 27 |
| 3.1. | INFLUENCE DU CYCLE VEGETATIF..... | 27 |
| 3.2. | INFLUENCE DES FACTEURS EXTRINSEQUES | 27 |
| 3.3. | INFLUENCE DU PROCEDE D'OBTECTION | 27 |
| 3.4. | EXISTENCE DE CHIMIOTYPES OU CHEMOTYPES | 27 |
| 4. | LES METHODES D'EXTRACTION, CONSERVATION ET ANALYSES..... | 28 |
| 4.1. | LES METHODES D'EXTRACTION | 28 |
| 4.2. | LA CONSERVATION | 29 |
| 4.3. | LES METHODES D'ANALYSE..... | 30 |
| 5. | ACTIVITES, MODE D'ACTION ET TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES..... | 31 |
| 5.1. | ACTIVITE BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 31 |
| 5.2. | LE MODE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES | 34 |
| 5.3. | LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES | 36 |
| 6. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 37 |

1. DEFINITIONS, REPARTITION, LOCALISATION ET ROLE DES HUILES ESSENTIELLES

1.1. Définitions

L'huile essentielle, selon la norme **AFNOR NF T 75-006 (février 1998)**: "Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, à partir de l'épicarpe des *Citrus*, ou bien par distillation sèche. L'huile essentielle est, ensuite, séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. Dans les deux premiers modes, le traitement physique n'entraîne pas de changements significatifs de la composition de l'huile essentielle (redistillation, aération, par exemple)".

1.2. Répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Il y aurait, selon Lawrence, 17.500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles (Myrtacées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiécées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, par exemple). Ces substances peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorce, bois, racines, rhizome, fruits et graines (**Bruneton, 2009**).

1.3. Localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles, poils sécréteurs, poches sécrétrices et canaux sécréteurs.

1.4. Rôle

Le rôle biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent obscur. Il est toutefois vraisemblable qu'elles ont un rôle écologique : dans les interactions végétales, comme agents allélopathiques ou inhibiteurs de la germination de graines ; dans les interactions végétal-espèce d'un autre règne, comme agents protecteurs contre les prédateurs, les déprédateurs et les parasites ; dans l'attraction des pollinisateurs. Elles semblent avoir, aussi, pour rôle, la conservation de l'humidité nécessaire à la vie des

plantes exposées à des climats désertiques, par leurs vapeurs aromatiques qui saturent l'air autour de la plante (Belaiche, 1979; Bruneton, 2009).

2. LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Les composants des huiles essentielles sont généralement dits aromatiques, en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique ; ce qui pourrait prêter à confusion (Pibiri, 2006).

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes et éminemment variables de composants appartenant à deux groupes distincts : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques (Bruneton, 2009).

Selon Bakkali *et al.* (2008), les huiles essentielles sont classées en trois groupes : les terpènes, les terpénoïdes et les autres constituants aromatiques et aliphatiques. Ainsi, il distingue les terpénoïdes comme groupe à part.

Une autre classification a été adaptée par Clarke (2008). Il divise les huiles essentielles en deux grandes classes :

- ✓ Les hydrocarbures : les terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes) ;
- ✓ Les composés oxygénés : les terpénoïdes (alcools, phénols, aldéhydes, cétones, lactones et coumarines) et d'autres composés (comme les sulfures et les furanes).

Une classification, tout à fait différente, fut proposée par (Baser & Demirci, 2007). On y distingue les hydrocarbures non terpénoïdes, les terpénoïdes, les norterpénoïdes C13, les phénylpropanoïdes, les esters, les lactones, les phtalides, les composés azotés, les composés soufrés et les isothiocyanates.

Nous avons préféré adopter une classification proche de celles proposées par Bakkali *et al.* (2008) et Bruneton, (2009) :

- ✓ Terpènes et Terpénoïdes ;
- ✓ Composés aromatiques ;
- ✓ Composés d'origines diverses.

2.1. Terpènes et Terpénoïdes

Nommés isoprènes, ils sont formés par la combinaison de différentes bases à 5 atomes de carbones (C5) (Figure 7). La Biosynthèse des terpènes consiste en la synthèse du précurseur *Isopentenyldiphosphate* (IPP) et l'addition répétitive d'IPP forme le *prenyldiphosphate*, précurseur des différentes classes de terpènes. Les terpènes contenant de l'oxygène sont appelés « terpénoïdes ».

Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15). Il existe aussi les hémiterpènes (C5), les diterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40) (**Bakkali et al., 2008**).

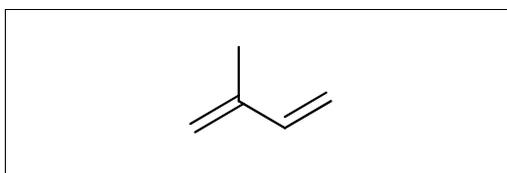


Figure 7 : Unité isoprénique (C5)

❖ Lesmonoterpènes

Les Monoterpènes (C10) sont issus du couplage de deux unités isopréniques. Ils peuvent être cycliques (monocycliques, bicycliques ou bien tricycliques) ou irréguliers (Figure 8) (**Baser & Demirci, 2007; Bakkali et al., 2008**).

C'est la classe la plus représentative des huiles essentielles (90%). Elle contient une large variété de structures représentant différentes fonctions (**Bruneton, 2009**) :

- ✓ Carbures : *mycène, p-menthane, ocimène, terpinène, p-cimène, phellandrènes, -pinène, 3-carène, camphène, sabinène...etc.*
- ✓ Alcools : *géraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nérol, menthol, -terpinéol, carveol, bornéol, fenchol, chrysanthenol, thuyan-3-ol, ...etc.*
- ✓ Aldéhydes : *géraniol, néral, citronellal...etc.*
- ✓ Cétones : *tagetone, menthone, carvone, thujones ...etc.*
- ✓ Esters : *acétate de linalyle, acétate de menthyle, acétate d'isobornyl...etc.*
- ✓ Ethers : *1-8 cinéole, menthofurane...etc.*
- ✓ Peroxydes : *ascaridole...etc.*
- ✓ Phénols : *thymol, carvacrol...etc.*

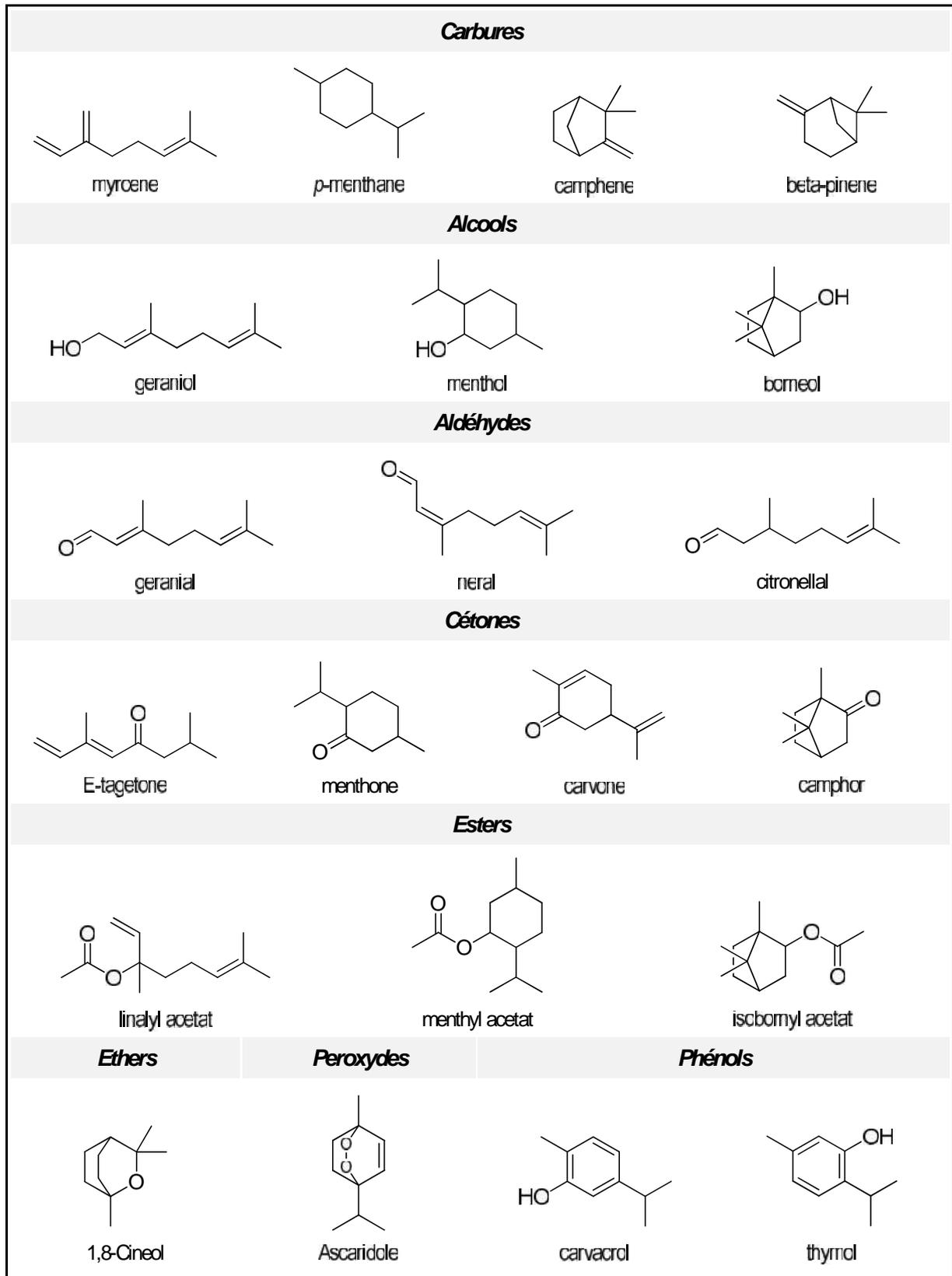


Figure 8 : La structure chimique des monoterpènes (Terpènes et Terpénoides)

❖ *Les sesquiterpènes*

Les sesquiterpènes (C₁₅) sont formés par l'assemblage de 3 unités d'isoprènes et ont pour formule moléculaire C₁₅H₂₄. Ce sont des composés insaturés. Il existe des sesquiterpènes linéaires, ramifiés et cycliques. Ces derniers peuvent être mono, bi ou tricycliques (Figure 9) (**Bakkali et al., 2008; Bruneton, 2009**).

On en distingue :

- ✓ Carbures : *-bisabolène, cadinènes, -caryophyllène, longifolène* ;
- ✓ Alcools : *bisabol, cedrol, -nerolidol, farnésol, carotol, -santalol* ;
- ✓ Cétones : *germacrone, nootkatone, cis-longipinan-2,7-dione, -vétinone* ;
- ✓ Époxydes : *oxyde de caryophyllène, humulène époxydes*.

Beaucoup de plantes contiennent des terpènes. Nous citons comme exemples l'Angélica, la bergamote, le cumin, le céleri, la coriandre, l'eucalyptus, le géranium, le genévrier, le lavandin, la lavande, le citronnier, le lemon-grass, la mandarine, la menthe, l'orange, la menthe la poivrée, le pin, le romarin et le thym (**Bakkali et al., 2008**).

2.2. Composés aromatiques

Dérivés du phénylpropane (C₆-C₃), les composés aromatiques sont beaucoup moins fréquents que les terpènes (Figure 10) (**Bakkali et al., 2008; Bruneton, 2009**). Les principaux constituants sont :

- ✓ Des aldéhydes : *cinnamaldéhyde* ;
- ✓ Des alcools : *alcool cinnamique* ;
- ✓ Des phénols : *chavicol, eugénol* ;
- ✓ Des dérivés méthoxy : *anéthol, elemicine, éstragole, méthyle-eugénols* ;
- ✓ Des composés dioxyde méthylène : *apiole, myristicine, safrole*.

Les principales plantes sources de composés aromatiques sont l'anis, la cannelle, le clou de girofle, le fenouil, la muscade, le persil, le saffras, l'anis d'étoile, l'estragon et quelques plantes appartenant aux familles (Apiacées, Lamiacées, Myrtacées, Rutacées) (**Bakkali et al., 2008**).

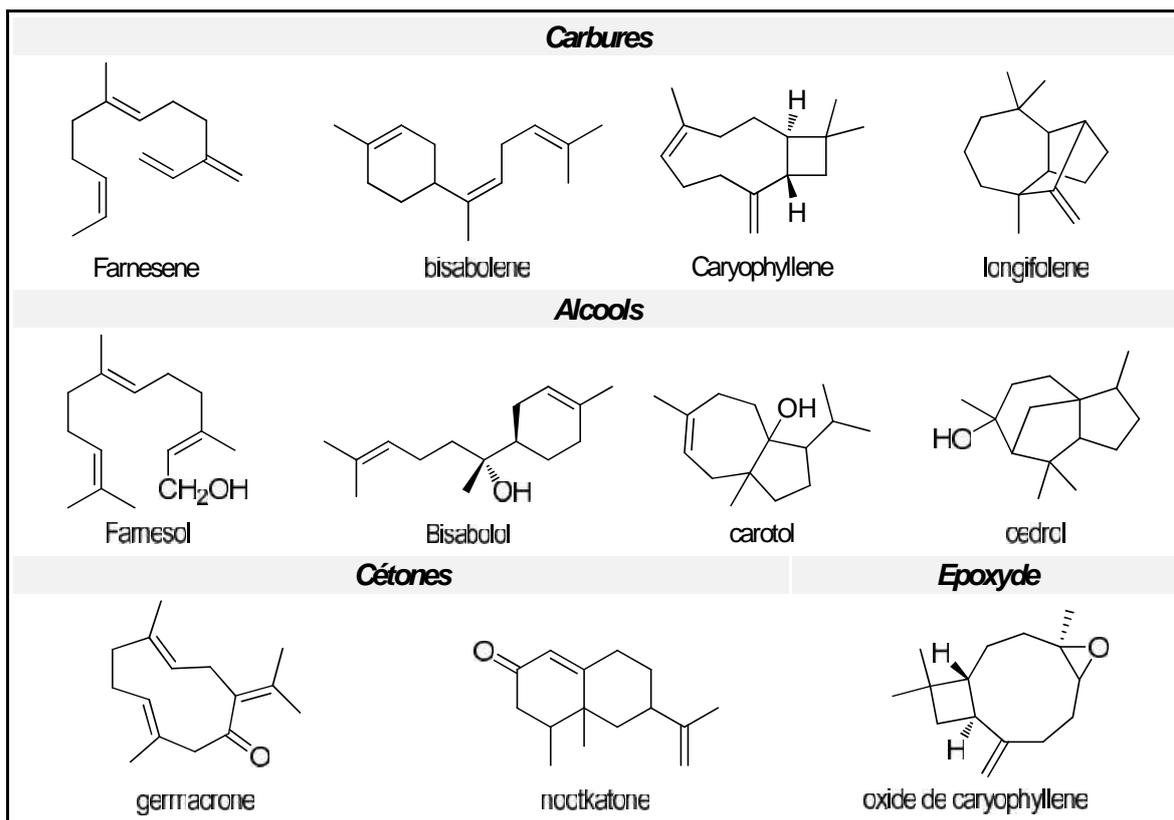


Figure 9 : La structure chimique des sesquiterpènes (Terpènes et Terpénoïdes)

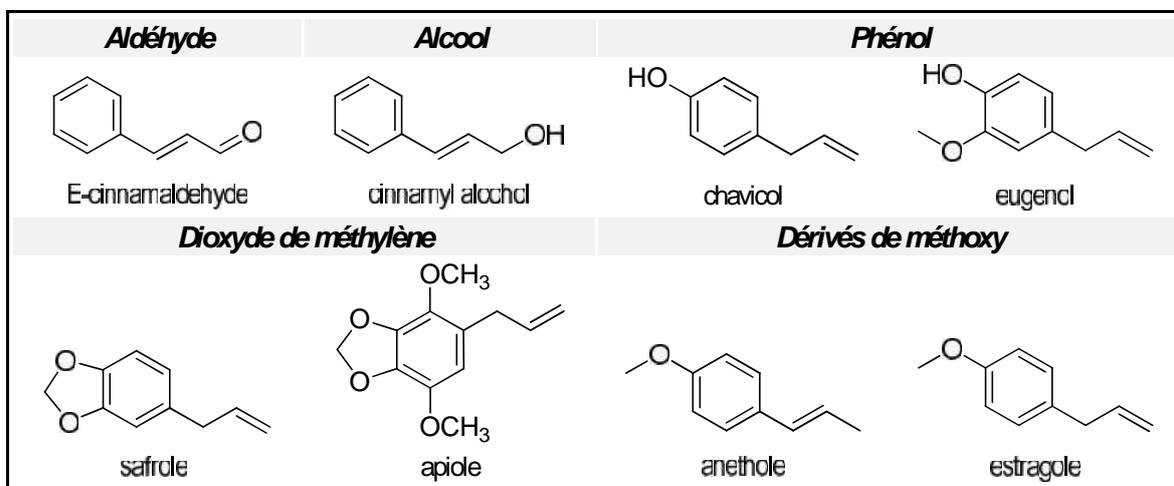


Figure 10 : La structure chimique des composés aromatiques

2.3. Autres composés

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles :

- ✓ Des composés issus de la dégradation d'acides gras ;
- ✓ Des composés issus de la dégradation des terpènes ;
- ✓ Des composés azotés ou soufrés.

Ces composés contribuent, souvent, aux arômes de fruits (Bruneton, 2009).

3. LES FACTEURS DE LA VARIABILITE DES HUILES ESSENTIELLES

La variation de la qualité des huiles essentielles suit une fonction linéaire et proportionnelle aux changements de chaque étape d'obtention des huiles essentielles, de la cueillette à la conservation (**Bruneton, 2009**).

3.1. Influence du cycle végétatif

Pour chaque espèce, la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier de façon importante tout au long du développement. Chez l'huile essentielle de coriandre, par exemple, la teneur en linalool est 50% plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert, immature.

3.2. Influence des facteurs extrinsèques

Il s'agit, dans ce cas, de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales sur la plante. Ainsi, la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe.

3.3. Influence du procédé d'obtention des huiles essentielles

La labilité des constituants des huiles essentielles explique la différence entre la composition du produit, obtenu par hydrodistillation, et le mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal.

3.4. Existence de chimiotypes ou *chemotypes*

Les chemotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes à huiles essentielles. Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chemotypes différentes. L'exemple, le plus marquant, est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* chez laquelle **Thompson et al. (2003)** citent six chemotypes différents (le géraniol, l' α -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol et thymol).

4. LES METHODES D'EXTRACTION, CONSERVATION ET ANALYSES

4.1. Les méthodes d'extraction

D'une façon générale, l'extraction des huiles essentielles peut être assimilée à une combinaison de cinq processus : la distillation, l'extraction par micro-ondes, l'extraction par les solvants organiques, l'enflourage et l'extraction au CO₂ supercritique (Franchomme & Penoel, 1990; Richard & à l'ENSIA, 1992; Lahlou, 2004; Bendahou *et al.*, 2008; Bruneton, 2009).

4.1.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles, utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau, est, de loin, la plus utilisée à l'heure actuelle. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe :

❖ *L'hydrodistillation*

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal, à traiter, dans un alambic rempli d'eau qui est, ensuite, porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par la différence de densité.

❖ *L'hydrodiffusion*

Cette technique, relativement récente, est particulière. Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02 à 0,15 Bar), du haut vers le bas, à travers la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est sa rapidité de mise en œuvre ; ce qui endommage moins les composés volatils.

❖ *L'entraînement à la vapeur d'eau*

Dans la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*Steamdistillation*), le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques.

4.1.2. L'extraction par micro-ondes

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. L'utilisation des rayonnements micro-ondes, sert pour exciter les molécules d'eau présentes dans les tissus de la plante, en causant la rupture des cellules et la libération des huiles essentielles piégées. Cette technique est appliquée, aussi, pour l'extraction des saponines, à partir de quelques plantes médicinales.

4.1.3. L'extraction par solvants organiques

Son principe est simple. Le matériel végétal est introduit dans un extracteur spécial, contenant un solvant hautement purifié ; le solvant, en circulant, en extrait les constituants d'arômes ainsi que des substances liposolubles. Le solvant est éliminé par évaporation et on obtient une concrète ou résinoïde dont les caractéristiques physico-chimiques dépendent du solvant utilisé.

4.1.4. L'extraction par graisse (Enfleurage)

Ces procédés mettent à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. L'extraction se fait par diffusion à froid vers le corps gras. Le produit obtenu est une pommade florale.

4.1.5. L'extraction au CO₂ supercritique

L'extraction par le CO₂ supercritique est une technique qui permet d'obtenir à parti du matériel végétal des extraits volatils, dépourvus de toute trace de solvant. Le CO₂ est un gaz inerte, inflammable, strictement atoxique, facile à éliminer, disponible et sélectif. Plusieurs auteurs mettent le CO₂ supercritique au sommet des solvants utilisables actuellement pour l'extraction des arômes.

4.2. La conservation

La relative instabilité des molécules constituant les huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les possibilités de dégradation sont nombreuses. Il est possible de les éviter en utilisant des flacons propres et secs, en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant repli d'azote ou d'un autre gaz inerte). Le stockage se fait à l'abri de la chaleur et de la lumière.

4.3. Les méthodes d'analyse

Plusieurs techniques et critères sont utilisés pour l'évaluation de la qualité des huiles essentielles :

- ☑ Test d'évaluation sensorielle ;
- ☑ Tests physico-chimiques ;
- ☑ Techniques instrumentales.

L'évaluation sensorielle se fait par les organes de sens et, plus spécialement, par le nez. C'est un test primordial pour l'acceptation d'une huile essentielle, dans les maisons de parfumerie. Toutefois, l'estimation doit être vérifiée par des preuves expérimentales (**Baser & Demirci, 2007**).

Les tests physico-chimiques sont nécessaires dans les monographies d'huiles essentielles publiées dans les Normes, les Pharmacopées et les Codex.

Les techniques instrumentales, les méthodes les plus modernes, sont utilisées pour évaluer la qualité des huiles essentielles. La technique la plus importante est la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). La possibilité de coupler la CPG à spectroscopies (Spectroscopie de Masse) augmente considérablement la qualité des informations obtenues (**Bruneton, 2009**).

L'analyse chimique des huiles essentielles est généralement réalisée par la CPG (analyse quantitative) et la CG-SM (analyse qualitative). L'identification des composés se fait en comparant le temps de rétention en CPG (Indices de Rétention/*Kovats*) et le spectre de masse (SM) avec des références standards (de source connue, fiable) (Lahlou, 2004). Il en existe diverses bibliothèques CG-SM commercialisées, telles que *Wiley National Bureau of Standards*, *National Institute of Standards and Technology libraries* (NIST/EPA/NIH GC-MS Library). Les Bibliothèques "Adams" et "MassFinder" sont spécialisées dans les huiles essentielles (**Baser & Demirci, 2007**).

La technique RMN-C13, est utilisée dans les cas des composés difficilement séparables, par la CG-SM, tels que les stéréo-isomères (**Lahlou, 2004; Baser & Demirci, 2007**).

5. ACTIVITES, MODE D'ACTION ET TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES

5.1. Activité biologique des huiles essentielles

L'utilisation des plantes aromatique et des huiles essentielles en thérapeutique, remonte aux temps les plus anciens (**Belaiche, 1979**).

Les plantes aromatiques et épices sont utilisées, depuis des siècles, dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais, également, pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.

De nombreuses études traitant des activités des huiles essentielles sont citées dans des ouvrages, des journaux spécialisés ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique. Parmi ces activités, nous pouvons citer à titre d'exemple : Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité anticancéreuse et Activité anti-inflammatoire.

5.1.1. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles de l'origan, le thym, la sauge, le romarin et le clou de girofle sont riches en composés phénoliques tels que l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne ; avec une activité plus importante pour le carvacrol. Cet effet a été prouvé contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterico*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pyroli* (**Pauli, 2001; Dušan et al., 2006; Viuda-Martos et al., 2007**). **Shan et al. (2011)**, ont montré que la cannelle, l'origan, le clou de girofle, l'écorce de grenade et le raisin sont efficaces contre *Salmonella enterica*, à température ambiante, et que les extraits de clou de girofle possèdent une plus haute activité antibactérienne. D'autres familles de composés, tels que des alcools, des aldéhydes et des cétones monoterpéniques (le géraniol, le linalool, le menthol, le terpinéol, le thujanol, le myrcénol, le citronellal, le néral, le thujone, le camphre et le carvone) ainsi que des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (-terpinène, -cymène), présentent, aussi, des propriétés antibactériennes intéressantes (**Burt, 2004**).

Certains composés volatils, tels que le carvacrol et le thymol, sont très actifs contre les champignons *Candida albicans*, *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* et *A. fumigatus*) et *Penicillium chrysogenum* (Kalemba & Kunicka, 2003). L'oxyde de caryophyllène est rapporté comme inhibiteur de la croissance de plusieurs champignons pathogènes liés à l'agriculture (Cakir *et al.*, 2004).

Les huiles essentielles des espèces *Artemisia dracunculoides*, *A. abrotanum*, *A. absinthium* et *A. vulgaris*, riches en 1,8-cinéol, α -thujone, sabinyl acetate, *cis*-chrysanthényle acetate et terpineol, montrent une activité antifongique élevée contre la levure *Candida albicans* (Obistoiu *et al.*, 2014).

L'activité antivirale de certaines huiles essentielles sur les virus *Herpès simplex* type 1 (HSV-1) et type 2 (HSV-2) a été prouvée dans plusieurs études. Il a été, ainsi, prouvé par Schnitzler *et al.* (2001), sur les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* et d'*Eucalyptus* sp., contre HSV-1 et HSV-2. Schuhmacher *et al.* (2003) et Minami *et al.* (2003), ont montré que l'huile essentielle de *Mentha piperita* et du citron a un effet virucide direct contre HSV-1.

L'efficacité de l'isobornéol a été prouvée sur le cycle de vie du virus HSV. Il aurait une action inhibitrice de la glycosylation des polypeptides viraux. (Armaka *et al.*, 1999). Cependant, selon Chiang *et al.*, (2005) la carvone, la cinéole, le α -caryophyllène, le farnésol, le fenchone, le géraniol, le α -myrcène et l' α -thuyone ne présenteraient aucune activité.

D'après Civitelli *et al.*, (2014), les huiles essentielles dérivées de *Mentha suaveolens* (EOMS) et le principe actif *Piperitenone oxide* (PEO) pourraient être considérés comme de bons candidats pour une nouvelle stratégie anti-HSV-1.

5.1.2. L'activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont, depuis peu, massivement étudiées. Le stress oxydatif, survenant lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'alzheimer (Butterfield & Lauderback, 2002), l'artériosclérose et le cancer (Gardner, 1997). Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est

de prévoir, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, -tocophérol, BHT ...etc.) (**Béliveau & Gingras, 2005**).

Les huiles essentielles de la cannelle, la muscade, le clou de girofle, le basilic, le persil, l'origan et le thym possèdent de puissants composés antioxydants. Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car ces composés ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent, ainsi, un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques (le linalool, le 1,8-cinéole, le gèranial/néral, le citronellal, l'iso-menthone, la menthone et quelques monoterpènes: -terpinène, -terpinène et l' -terpinolène, par exemple) (**Braga et al., 2006; Edris, 2007**).

5.1.3. L'activité anticancéreuse

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels, dans le cadre de la lutte contre le cancer (**Edris, 2007**).

Des études ont montré que les huiles essentielles sont actives dans la prévention du cancer ainsi que dans sa suppression. Actuellement, il est bien établi que certains aliments, tels que l'ail et le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux, utiles pour prévenir l'apparition de cancer (**Béliveau & Gingras, 2005; Matsuura et al., 2006**). Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimio-préventive a été mise en évidence. L'huile essentielle de l'ail, par exemple, est une source de composés sulfurés, reconnus pour leur effet préventif contre le cancer (**Milner, 2006**).

5.1.4. L'activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies et l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*, (**Brand et al., 2001; Koh et al., 2002; Caldefie-Chézet et al., 2006; Beikert et al., 2013**). Ces études ont montré que les

composés actifs agissent en empêchant la production de cytokines inflammatoires et l'inhibition de l'inflammation induite par l'histamine. **Riella *et al.*, (2012)** ont montré que les monoterpènes et le thymol de l'huile essentielle de *Lippia gracile* présentent une activité anti-inflammatoire et cicatrisante, chez les rongeurs. Cette étude considère le thymol comme un composé, prometteur, pouvant être utilisé dans le traitement de processus inflammatoires ainsi que la cicatrisation des plaies.

5.2. Le mode d'action des huiles essentielles

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et leurs composants aient été examinés dans le passé, le mécanisme d'action n'a pas été étudié en détail (**Lambert *et al.*, 2001; Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004**). De nombreuses techniques ont été appliquées pour élucider le mode d'action des huiles essentielles et leurs constituants (**Hyldgaard *et al.*, 2012**). Des approches expérimentales du mode d'action antimicrobiennes sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Mode d'action des huiles essentielles

| Mode d'action des huiles essentielles | Références |
|---|---|
| Les changements dans la morphologie des cellules | De Souza <i>et al.</i> (2010); Hajlaoui <i>et al.</i> (2010); De Oliveira <i>et al.</i> (2011); Gao <i>et al.</i> (2011); Lv <i>et al.</i> (2011); Paul <i>et al.</i> (2011) |
| Perturbation de la membrane cytoplasmique | Bouhdid <i>et al.</i> (2009); De Souza <i>et al.</i> (2010); Sánchez <i>et al.</i> (2010); Somolinos <i>et al.</i> (2010); Ahmad <i>et al.</i> (2011); Ait-Ouazzou <i>et al.</i> (2011); Lv <i>et al.</i> (2011); Paul <i>et al.</i> (2011) |
| Perturbation de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif | Ultee <i>et al.</i> (2002); Fisher & Phillips (2006); Horváth <i>et al.</i> (2009) |
| La perturbation de la respiration cellulaire | Cox <i>et al.</i> (2000); Bouhdid <i>et al.</i> (2009); Bouhdid <i>et al.</i> (2010) |
| Inhibition des enzymes particulières | Bang <i>et al.</i> (2000); Luciano & Holley (2009) |
| Changements dans le protéome | Burt <i>et al.</i> (2007); Di Pasqua <i>et al.</i> (2007); Liu <i>et al.</i> (2010) |

| | |
|--|---|
| Les changements dans la production de toxine | Ultee & Smid (2001); De Souza <i>et al.</i> (2010) |
| Dégradation de la membrane cytoplasmique | Knobloch <i>et al.</i> (1989); Sikkema <i>et al.</i> (1994); Oosterhaven <i>et al.</i> (1995); Ultee <i>et al.</i> (2000); Ultee <i>et al.</i> (2002) |

Les structures cellulaires ou les mécanismes considérés comme sites d'action des composants d'huiles essentielles, dans la cellule bactérienne, sont indiquées dans la figure 11, tel que décrit par **Burt (2004)**.

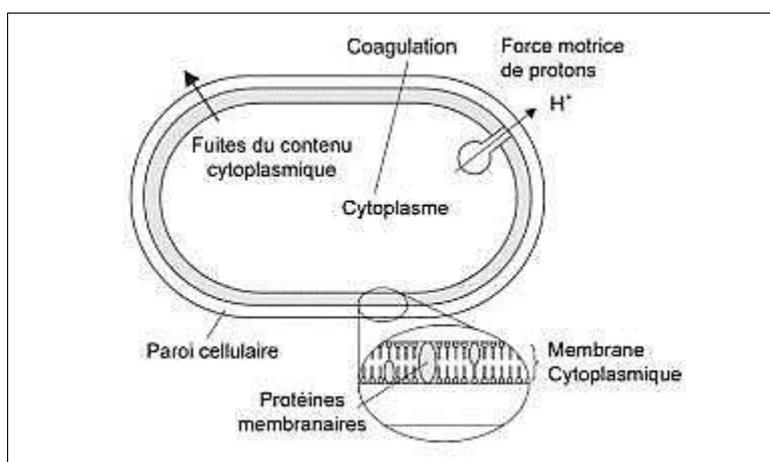


Figure 11 : Sites et mécanismes d'action des huiles essentielles dans la cellule bactérienne (Burt, 2004)

Il est généralement admis que l'action antimicrobienne des huiles essentielles dépend de leurs caractères hydrophile ou lipophile. Les terpénoïdes peuvent servir d'exemples de molécules agissant sur les voies respiratoires. Ce sont des agents lipidiques solubles qui affectent les activités catalytiques des enzymes membranaires (**Kalemba & Kunicka, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2004; Bouhdid *et al.*, 2009; Bouhdid *et al.*, 2010**).

Les travaux de **Ultee *et al.* (1999)** chez les *Bacillus cereus*, montrent que le carvacrol provoque un effet inhibiteur se traduisant par une forte diminution de l'ATP intracellulaire, la réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire ainsi qu'une influence sur le

flux de potassium (intra et extracellulaire) ; ce qui aboutit à l'endommagement de la membrane cytoplasmique.

Certains composants de l'huile essentielle, de nature phénolique (carvacrol et de thymol, par exemple), entraînent une perturbation de la couche extérieure lipopolysaccharidique suivie par la désintégration partielle de la membrane externe bactérienne (Knobloch *et al.*, 1989; Helander *et al.*, 1998; Dorman & Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002; Fisher & Phillips, 2006; Horváth *et al.*, 2009).

5.3. La toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits sans risque ; ce qui est, généralement, le cas de tous les produits naturels (Piochon, 2008).

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leurs pouvoirs irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol) et/ou allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) (Smith *et al.*, 2000).

D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (huiles riches en -thujone) (Franchomme & Penoel, 1990).

Il existe, aussi, des huiles essentielles dont certains composés sont capables de provoquer le cancers (Homburger & Boger, 1968). C'est le cas de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes tels que le safrole (Sassafras), l'éstragole (*Artemisiadracunculus*), la -asarone (*Acaruscalamus*) et le méthyle-eugénol. Par ailleurs, certaines recherches ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés, chez les rongeurs (Wiseman *et al.*, 1987).

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR NF T 75-006. (février 1998). Matières premières aromatiques d'origine naturelle – Vocabulaire. Aromatic natural raw materials. Vocabulary.
- Ahmad, A; Khan, A; Akhtar, F; Yousuf, S; Xess, I; Khan, LA & Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(1), 41-50.
- Ait-Ouazzou, Abdenour; Cherrat, Lamia; Espina, Laura; Lorán, Susana; Rota, Carmen & Pagán, Rafael. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 320-329.
- Armaka, Maria; Papanikolaou, Eleni; Sivropoulou, Afroditi & Arsenakis, Minas. (1999). Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral research*, 43(2), 79-92.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475.
- Bang, Kyu-Ho; Lee, Dong-Won; Park, Hee-Moon & Rhee, Young-Ha. (2000). Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(5), 1061-1063.
- Baser, K Hüsnü Can & Demirci, Fatih. (2007). Chemistry of Essential Oils. In R. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances* (pp. 43-86): Springer Berlin Heidelberg.
- Beikert, F. C.; Schönfeld, B. S.; Frank, U. & Augustin, M. (2013). Antiinflammatory potential of seven plant extracts in the ultraviolet erythema test. *Der Hautarzt*, 64(1), 40-46.
- Belaiche, P. (1979). *Traite de Phylotherapie et d'aromatherapie-Tome 1*: Paris: Maloine SA Editeur, 204p.
- Béliveau, Richard & Gingras, Denis. (2005). *Les aliments contre le cancer: la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation*: Canoe Incp.
- Bendahou, M; Muselli, A; Grignon-Dubois, M; Benyoucef, M; Desjobert, Jean-Marie; Bernardini, Antoine-François & Costa, Jean. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
- Bouhdid, S; Abrini, J; Amensour, M; Zhiri, A; Espuny, MJ & Manresa, A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1139-1149.

- Bouhdid, S; Abrini, J; Zhiri, A; Espuny, MJ & Manresa, A. (2009). Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of applied microbiology*, 106(5), 1558-1568.
- Braga, Pier Carlo; Dal Sasso, Monica; Culici, Maria; Galastri, Laura; Marceca, Maria Teresa & Guffanti, Enrico Eugenio. (2006). Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, 76(2), 61-68.
- Brand, C.; Ferrante, A.; Prager, R. H.; Riley, T. V.; Carson, C. F.; Finlay-Jones, J. J. & Hart, P. H. (2001). The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflammation Research*, 50(4), 213-219.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales* (4^e ed.). Paris: Lavoisier, 1269p.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 223-253.
- Burt, Sara A; van der Zee, Ruurd; Koets, Ad P; de Graaff, Anko M; van Knapen, Frans; Gaastra, Wim, . . . Veldhuizen, Edwin JA. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4484-4490.
- Butterfield, D Allan & Lauderback, Christopher M. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1050-1060.
- Cakir, A; Kordali, S; Zengin, H; Izumi, S & Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(1), 62-68.
- Caldefie-Chézet, F; Fusillier, C; Jarde, T; Laroye, H; Damez, M; Vasson, M-P & Guillot, J. (2006). Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy Research*, 20(5), 364-370.
- Chiang, Lien-Chai; Ng, Lean-Teik; Cheng, Pei-Win; Chiang, Win & Lin, Chun-Ching. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(10), 811-816.
- Civitelli, Livia; Panella, Simona; Marcocci, Maria Elena; De Petris, Alberto; Garzoli, Stefania; Pepi, Federico, . . . Angiolella, Letizia. (2014). In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine*, 21(6), 857-865.
- Clarke, Sue. (2008). *Essential Chemistry for Aromatherapy (Second Edition)*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 302p.

- Cox, SD; Mann, CM; Markham, JL; Bell, HC; Gustafson, JE; Warmington, JR & Wyllie, SG. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170-175.
- De Oliveira, Thales Leandro Coutinho; De Araújo Soares, Rodrigo; Ramos, Eduardo Mendes; Das Graças Cardoso, Maria; Alves, Eduardo & Piccoli, Roberta Hilsdorf. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 546-555.
- De Souza, Evandro Leite; De Barros, Jefferson Carneiro; De Oliveira, Carlos Eduardo Vasconcelos & Da Conceição, Maria Lúcia. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 308-311.
- Di Pasqua, Rosangela; Betts, Gail; Hoskins, Nikki; Edwards, Mike; Ercolini, Danilo & Mauriello, Gianluigi. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88, 308-316.
- Dušan, Fabian; Marián, Sabol; Katarína, Domaracká & Dobroslava, Buj áková. (2006). Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro*, 20(8), 1435-1445.
- Edris, Amr E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- Fisher, Katie & Phillips, Carol A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240.
- Fitzgerald, DJ; Stratford, M; Gasson, MJ; Ueckert, J; Bos, A & Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of applied microbiology*, 97(1), 104-113.
- Franchomme, Pierre & Penoel, Daniel. (1990). L'aromathérapie exactement *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*, R. JOLLOIS éd., Limoges, France (pp. 445).
- Gao, Chunyan; Tian, Chengrui; Lu, Yuehong; Xu, Jianguo; Luo, Jiyang & Guo, Xiaopeng. (2011). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria. *Food Control*, 22(3), 517-522.
- Gardner, Paul R. (1997). Superoxide-driven aconitase Fe-S center cycling. *Bioscience reports*, 17(1), 33-42.

- Hajlaoui, Hafedh; Ben Abdallah, Fethi; Snoussi, Mejdj; Noumi, Emira & Bakhrouf, Amina. (2010). Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr. J. Microbiol. Res*, 4(11), 1122-1127.
- Helander, Ilkka M; Alakomi, Hanna-Leena; Latva-Kala, Kyösti; Mattila-Sandholm, Tiina; Pol, Irene; Smid, Eddy J, . . . von Wright, Atte. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- Homburger, F & Boger, Eliahu. (1968). The carcinogenicity of essential oils, flavors, and spices: a review. *Cancer research*, 28(11), 2372-2374.
- Horváth, Györgyi; Kovács, Krisztina; Kocsis, Béla & Kustos, Ildikó. (2009). Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology. *Chromatographia*, 70(11-12), 1645-1650.
- Hyldgaard, Morten; Mygind, Tina & Meyer, Rikke Louise. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.
- Kalemba, D & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Knobloch, Karl; Pauli, Alexander; Iberl, Bernard; Weigand, Hildegunde & Weis, Norbert. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
- Koh, KJ; Pearce, AL; Marshman, G; Finlay-Jones, John Justin & Hart, PH. (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal of Dermatology*, 147(6), 1212-1217.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*, 18(6), 435-448.
- Lambert, R. J.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J. & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91(3), 453-462.
- Liu, Shuang; Sun, Yundong; Li, Wenjuan; Yu, Han; Li, Xi; Liu, Zhifang, . . . Jia, Jihui. (2010). The antibacterial mode of action of allitridi for its potential use as a therapeutic agent against *Helicobacter pylori* infection. *FEMS microbiology letters*, 303(2), 183-189.
- Luciano, Fernando B & Holley, Richard A. (2009). Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157: H7. *International journal of food microbiology*, 131(2), 240-245.
- Lv, Fei; Liang, Hao; Yuan, Qipeng & Li, Chunfang. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064.

- Maruyama, Naho; Sekimoto, Yuka; Ishibashi, Hiroko; Inouye, Shigeharu; Oshima, Haruyuki; Yamaguchi, Hideyo & Abe, Shigeru. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2(1), 1.
- Matsuura, Nariaki; Miyamae, Yumiko; Yamane, Kyoko; Nagao, Yukinori; Hamada, Yoshinosuke; Kawaguchi, Naomasa, . . . Ishikawa, Hideki. (2006). Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *The Journal of nutrition*, 136(3), 842S-846S.
- Milner, John A. (2006). Preclinical perspectives on garlic and cancer. *The Journal of nutrition*, 136(3), 827S-831S.
- Minami, Masato; Kita, Masakazu; Nakaya, Takaaki; Yamamoto, Toshiro; Kuriyama, Hiroko & Imanishi, Jiro. (2003). The Inhibitory Effect of Essential Oils on Herpes Simplex Virus Type-1 Replication In Vitro. *Microbiology and immunology*, 47(9), 681-684.
- Obistioiu, Diana; Cristina, Romeo T; Schmerold, Ivo; Chizzola, Remigius; Stolze, Klaus; Nichita, Ileana & Chiurciu, Viorica. (2014). Chemical characterization by GC-MS and in vitro activity against *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia dracunculus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 6.
- Oosterhaven, K; Poolman, B & Smid, EJ. (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4(1), 23-31.
- Paul, Souren; Dubey, RC; Maheswari, DK & Kang, Sun Chul. (2011). *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control*, 22(5), 725-731.
- Pauli, Alexander. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11(3), 126-133.
- Pibiri, Marie-Cécile. (2006). *Assainissement microbiologique de l' air et des systèmes de ventilation au moyen d' huiles essentielles*. (Thèse de Docteur Es Sciences), ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE Suisse. (3311): 161p.
- Piochon, Marianne. (2008). *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse*. (Mémoire de la maîtrise en ressources renouvelables), UNIVERSITÉ DU QUÉBEC. 213p.
- Richard, Hubert & à l'ENSIA, Emerite. (1992). *Épices et herbes aromatiques: Tec et doc*. Lavoisier, Paris. ENSIA-Massy Cedexp.
- Riella, K. R.; Marinho, R. R.; Santos, J. S.; Pereira-Filho, R. N.; Cardoso, J. C.; Albuquerque-Junior, R. L. C. & Thomazzi, S. M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656-663.

- Sánchez, Eduardo; García, Santos & Heredia, Norma. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and environmental microbiology*, 76(20), 6888-6894.
- Schnitzler, P; Schön, K & Reichling, J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Die Pharmazie*, 56(4), 343-347.
- Schuhmacher, A; Reichling, J & Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, 10(6), 504-510.
- Shan, Bin; Cai, Yi-Zhong; Brooks, John D & Corke, Harold. (2011). Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *Journal of medicinal food*, 14(3), 284-290.
- Sikkema, Jan; De Bont, JA & Poolman, Bert. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028.
- Smith, Camilla K; Moore, Caroline A; Elahi, Eiram N; Smart, Alan TS & Hotchkiss, Sharon AM. (2000). Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicology and applied pharmacology*, 168(3), 189-199.
- Somolinos, M; García, D; Condón, S; Mackey, B & Pagán, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of applied microbiology*, 108(6), 1928-1939.
- Thompson, John D; Chalchat, Jean-Claude; Michet, André; Linhart, Yan B & Ehlers, Bodil. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859-880.
- Ultee, A; Kets, EPW & Smid, EJ. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606-4610.
- Ultee, A & Smid, EJ. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 373-378.
- Ultee, A.; Bennik, M. H. & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 68(4), 1561-1568.
- Ultee, Annemieke; Kets, Edwin PW; Alberda, Mark; Hoekstra, Folkert A & Smid, Eddy J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of microbiology*, 174(4), 233-238.
- Viuda-Martos, M; Ruiz-Navajas, Y; Fernández-López, J & Pérez-Álvarez, JA. (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27(1), 91-101.

Wiseman, Roger W; Miller, Elizabeth C; Miller, James A & Liem, Amy. (1987). Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J× C3H/HeJ F1 mice. *Cancer Research*, 47(9), 2275-2283.

CHAPITRE 3 :

Analyse Chimique Des Huiles Essentielles

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUCTION | 45 |
| 2. | MATERIEL ET METHODES | 47 |
| 2.1. | PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL | 47 |
| 2.2. | EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES | 49 |
| 2.3. | ANALYSE CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 51 |
| 2.4. | ANALYSE STATISTIQUE ET TRAITEMENT DES DONNEES | 53 |
| 3. | RESULTATS ET DISCUSSION | 54 |
| 3.1. | RENDEMENT EN HUILES ESSENTIELLES | 54 |
| 3.2. | COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES | 56 |
| 3.3. | ANALYSE STATISTIQUE (TRAITEMENT DES DONNEES) | 60 |
| 3.4. | DISCUSSION | 63 |
| 4. | CONCLUSION | 67 |
| 5. | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 68 |

1. INTRODUCTION

Le genre *Pistacia* (Anacardiaceae) est largement distribué dans la région méditerranéenne. *Pistacia atlantica* Desf. est un arbre réparti dans le nord de l'Afrique. il peut atteindre 25 m de hauteur et pousse dans les zones arides et semi-arides (**Barrero et al., 2005**). Le nom vernaculaire de *P. atlantica* en langue arabe est "*Butom*".

En Grèce, les fruits du Pistachier de l'Atlas sont utilisés pour le bronzage, le fourrage pour le bétail et, comme ils contiennent de l'huile, pour la fabrication de savon. La résine est recueillie pour la production de vernis et elle est également utilisée dans la médecine populaire "comme antiseptique pour les plaies." (**Tzakou et al., 2007**).

En Algérie et au Maroc, le Pistachier de l'Atlas est la source de masticet d'exsudats qui renforcent la gencive, désodorise la bouche et est utilisé contre la toux, les frissons et les maladies de l'estomac (**Barrero et al., 2005**).

En outre, *Pistacia atlantica* avec *Ferula persica* et *Perionyxis argentea* sont trois plantes largement recommandés par les herboristes pour leur activité hypoglycémiante, en Jordanie (**Hamdan, I. I. & Afifi, F. U., 2004**). En Algérie, les galles de *P. atlantica* sont utilisées comme agent d'embaumement par l'habitant rural. Elles sont connues en arabe sous l'appellation "*Afse*". Elles sont comestibles et vendues sur les marchés.

Les gallicoles sont des organismes parasites qui détournent les caractéristiques des plantes à leur propre profit. Les galles agissent dans la protection de la plante contre les ennemis naturels tels que les prédateurs et les parasites, par divers moyens chimiques et/ou mécaniques. De plus, elles seraient impliquées dans la défense contre les agents pathogènes microbiens (**Yoram & Moshe, 2011**).

Les gallicoles sont des parasites qui consomment les ressources végétales et induit des changements physiologiques et morphologiques dans les tissus de la plante. Ces transformations de croissance sont le résultat, à la fois, d'un stimulus des gallicoles et des réactions de la plante. En conséquence, ils peuvent endommager les plantes hôtes (**Martinez, 2008**).

Les galles de l'espèce *Pistacia atlantica* sont induites suite à l'infection par une variété de pucerons gallicoles (*galling aphids*, en anglais) [exemple : *Forda riccobonii* (Stefani), *Slavum wertheimae* HRL, *Geoica* sp. etc...](**Flamini et al., 2004; Martinez, 2008**).

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de l'arbre de *P. atlantica* : Les huiles essentielles des feuilles ont été étudiées par (Barrero *et al.*, 2005; Tzakou *et al.*, 2007; Mecherara-Idjeri *et al.*, 2008b; Gourine *et al.*, 2010), les fruits par (Barrero *et al.*, 2005), la résine par (Delazar *et al.*, 2003; Benhassaini *et al.*, 2008) et les galles par (Mecherara-Idjeri *et al.*, 2008b; Gourine *et al.*, 2011; Sifi, Gourine, *et al.*, 2015).

Dans ce travail, nous avons constaté que l'odeur et la couleur des huiles essentielles de galles vertes sont différentes de celles des galles brunes.

Le but de ce travail est l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des galles à une échelle relativement grande (échantillons issus de différentes régions) ainsi que l'enquête sur l'existence, éventuelle, de plusieurs chemotypes d'huiles essentielles.

2. MATERIEL ET METHODES

Cette partie de travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche en Systèmes Chimiques Complexes (LRSCC) Université de Paul Cézanne (Marseille) – France. Le matériel et les méthodes expérimentales utilisés dans ce travail, sont décrits comme suit.

2.1. Préparation du matériel végétal

2.1.1. Récolte des échantillons

Des galls du Pistachier d'Atlas, mâles et femelles, ont été collectées au début du mois d'Août 2010, à partir de deux régions, *Ain-Oussera* et *Laghouat*.

La zone de collecte d'*Ain-Oussera* est située dans la wilaya de *Djelfa*. Nous y avons collecté 39 échantillons de galls, dont 13 issus d'arbres mâles. Quant à la deuxième région, elle est localisée dans la ville de *Laghouat*. Nous y avons collecté 13 échantillons. Pour cette région, nous avons sélectionné trois emplacements de collections: Au sud de *Laghouat* (un échantillon issu d'un pied mâle et un échantillon issu d'un pied femelle), *ElKheng* (3 échantillons de mâles et 4 échantillons de femelles) et *Tilghemt* (2 échantillons de mâles et 2 échantillons de femelles) (Figure 12).

Le matériel végétal a été prélevé de peuplements spontanés, afin d'assurer l'homogénéité pour chaque échantillon. Le terrain des stations échantillonnées est de même texture (terre argileuse). Ces terrains constituent ce que l'on appelle communément "*Daya*".

Les données géographiques et climatiques des régions étudiées sont mentionnées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : La situation géographique des différentes stations

| Station | Longitude | Latitude | Altitude | Caractéristique climatique |
|--------------------|------------|------------|----------|-------------------------------------|
| <i>Ain Oussera</i> | 02°31' (E) | 35°33' (N) | 649 m | Semi-aride ; P.A. 25mm ; été 37,8°C |
| <i>Laghouat</i> | 02°52' (E) | 33°47' (N) | 750 m | Arde ; P.A. 18mm ; été 41,4°C |
| <i>Kheneg</i> | 02°48' (E) | 33°45' (N) | 750 m | Arde ; P.A. 18mm ; été 41,4°C |
| <i>Tilghemt</i> | 03°18' (E) | 32°95' (N) | 774 m | Arde ; P.A. 16mm ; été 42,3°C |

Un code a été adapté pour chaque station :

- « A » : Station *Ain-Oussera*
- « K » : Station *Kheneg*

- « L » : Station *Laghouat*
- « T » : Station *Tilghemt*

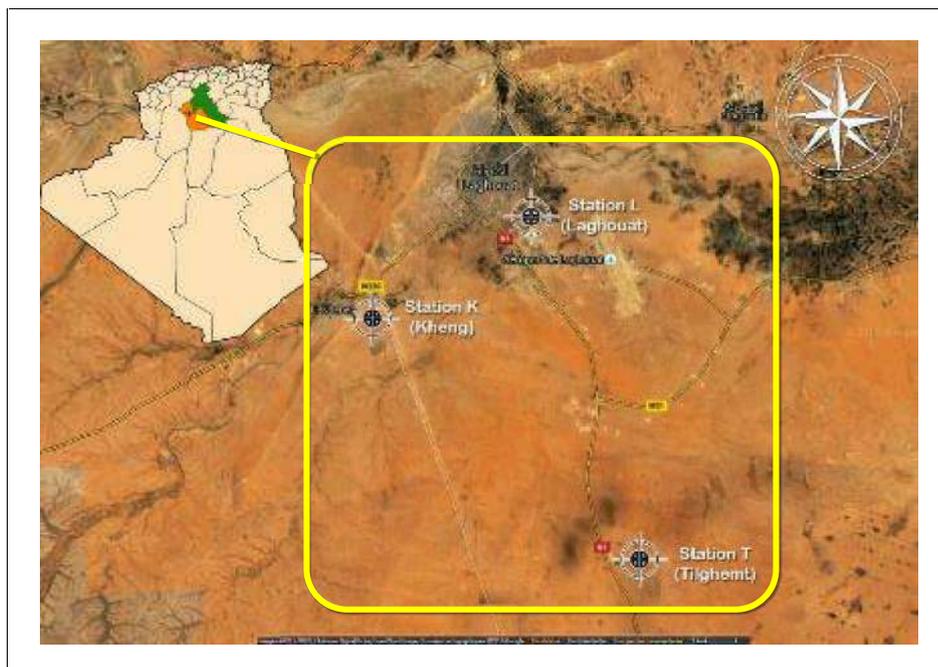
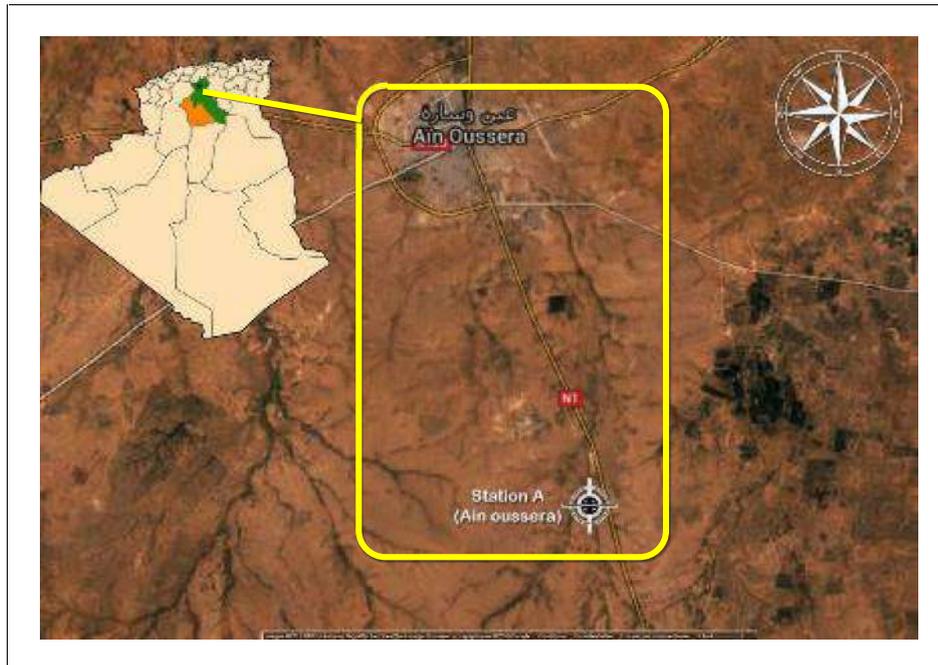


Figure 12 : Cartes géographique représentant les stations de récolte (A, L, K, T)

2.1.2. Séchage et conservation du matériel végétal

Après chaque récolte, le matériel végétal est nettoyé (débarrassé de ses débris), étalé sur du papier et laissé sécher à température ambiante, dans une pièce aérée, à l'abri de l'humidité et de la lumière. Cette étape dure environ une semaine. Une fois séché, l'échantillon est conservé dans des sacs en papier jusqu'au moment de l'extraction.

2.2. Extraction des huiles essentielles

2.2.1. Procédé d'extraction

Les échantillons d'huiles essentielles ont été obtenus par hydrodistillation, à l'aide d'un appareil de type *Clevenger* (voir Figure 13).

Le montage est constitué d'un ballon en verre (de 2 litres). On peut y traiter 200g de matériel végétal (galles écrasées) additionné d'un litre d'eau, placé au-dessus d'un chauffe-ballon. Le ballon en verre est surmonté d'une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargées de gouttelettes d'huile essentielle, qui sont ensuite recueillies sous forme de distillat dans une ampoule à décanter. L'extraction dure deux heures et demi.

2.2.2. Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du végétal traité (**Carée, 1953**).

$$R\% = \left(\frac{m}{m_0} \right) \times 100$$

- $R\%$: Le rendement, exprimé en pourcent.
- m : La masse, en gramme (g), de l'huile essentielle récupérée.
- m_0 : La masse initiale du matériel végétal traité, en grammes (g).

2.2.3. Conservation

Afin d'éliminer toute trace d'eau, dans les huiles essentielles obtenues, on ajoute une petite quantité de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). Par la suite, les huiles essentielles sont transférées dans des tubes en verre, hermétiquement fermé et couverts de papier aluminium.

L'huile extraite est conservée, à l'abri de la lumière et au réfrigérateur (à $+4^\circ\text{C}$), jusqu'au moment de l'analyse.

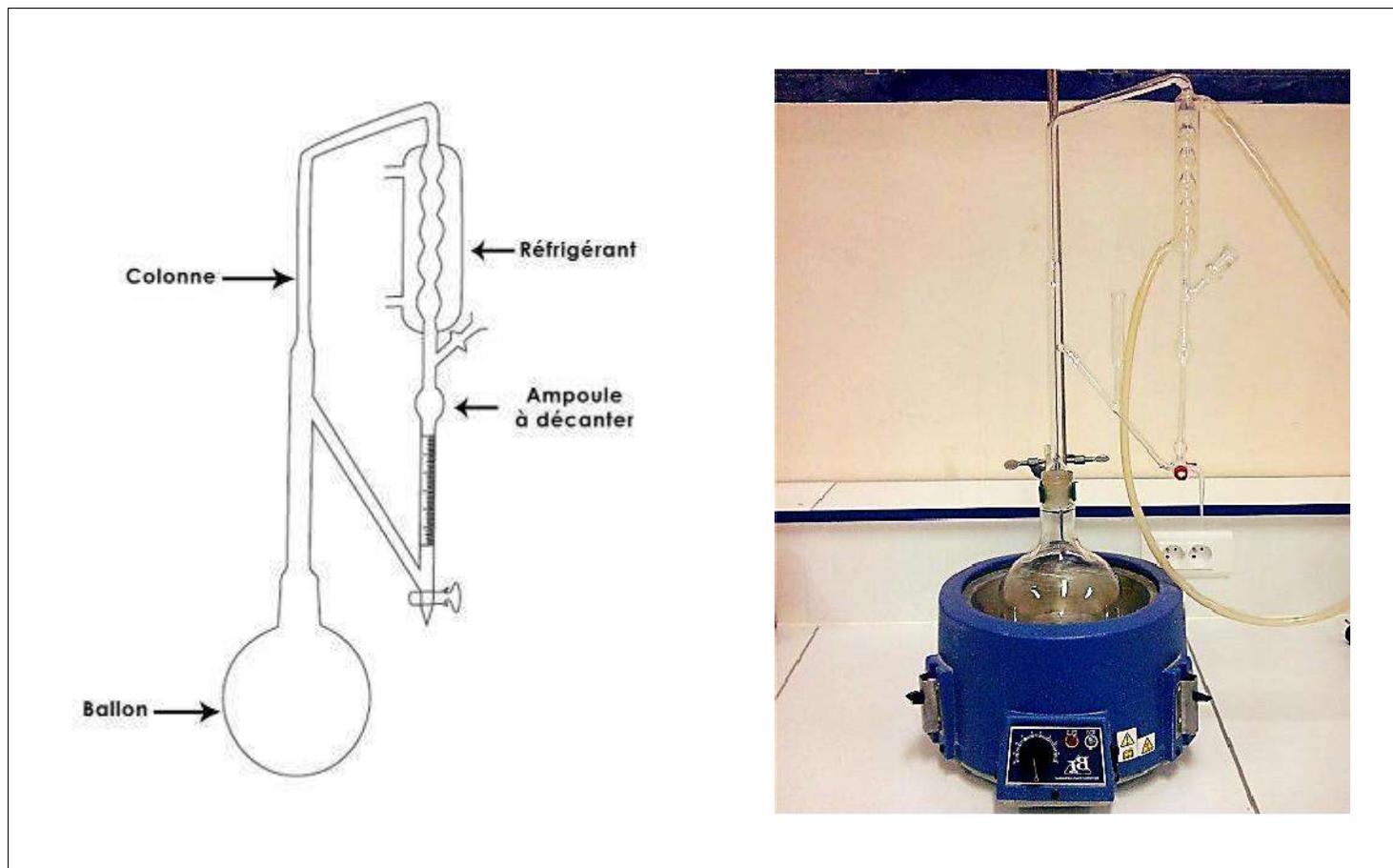


Figure 13 : Appareil de l'hydrodistillation de type *Clevenger*

2.3. Analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a été effectuée dans le Laboratoire de Recherche en Systèmes Chimiques Complexes (LRSCC) Université de Paul Cézanne (Marseille), par deux méthodes :

- La CPG : permet de séparer les constituants de nos échantillons d'huiles essentielles et de les quantifier ;
- La GC-MS : c'est une CPG couplée avec un spectromètre de masse. Elle permet d'obtenir le spectre de chaque constituant et de procéder à une identification.

2.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Un chromatographe en phase gazeuse, de type Variant CP-3800, équipé par un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire UB-Wax en silice fondue (60 m × 0,32 mm ; 0,25 µm épaisseur du film). La température du four est programmée de 50 à 250°C, avec un palier de 3°C/min, et maintenu à 250°C, pendant 10 min. La température de l'injecteur et du détecteur est de 250°C et 260°C, respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur, avec un débit de 1 ml/min. Les échantillons sont dilués dans le *n*-pentane (1/100 (v/v)). Un volume de 1 µL a été injecté manuellement, en utilisant un mode splitless (80:1).

2.3.2. CPG couplée avec spectromètre de masse (GC-MS)

L'analyse des échantillons a été faite avec l'appareil GC-MS de type AGILENT 6890 (GC/CMSD 5973), équipé d'un HP5MS, de colonne capillaire (30 m × 0,25 mm ; Epaisseur du film : 0,25 µm). Le détecteur est Quadripôle de 70-eV EI. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml/min. La température de l'injecteur est de 250°C avec une ligne de transfert MS de 220°C. La température de la colonne est maintenue à 50°C, pendant 2 min, puis augmentée progressivement (à une vitesse de 3°C/min), pour atteindre 250°C, après 10 min. Les échantillons sont dilués dans *n*-pentane (1/100 (v/v)) et 1 µL a été injecté, manuellement, en utilisant un mode splitless (80:1).

2.3.3. Identification des composés

Les indices de rétention linéaires ont été calculés par référence aux alcanes (C8 à C40). Chaque composé a été identifié par comparaison avec la littérature et les bases de données Wiley et NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

2.4. Analyse statistique et traitement des données

Pour les analyses multivariées, les techniques factorielles permettent, à la fois de représenter en 2 ou 3 dimensions, le plus fidèlement possible, les individus d'une population, de détecter les liaisons entre les variables et de déterminer les variables séparant le mieux les individus. Elle fait appel à l'algèbre linéaire et à un outil très bien adapté à la classification et à la reconnaissance de formes : l'œil. Un simple coup d'œil permet de localiser les grandes masses d'individus, de détecter les individus exceptionnels et de repérer d'éventuels groupes d'individus isolés. Les techniques factorielles sont aussi un puissant outil de réduction des dimensions d'un problème, qui permet de diminuer le nombre de variables étudiées avec un minimum de perte d'informations (Tufféry, 2005).

L'analyse statistique des échantillons d'huiles essentielles collectées dans les différentes régions de l'étude a été effectuée par deux méthodes :

- ✓ L'analyse en composantes principales (ACP) ;
- ✓ La classification ascendante hiérarchique (CAH).

L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) ont été effectuées en utilisant le programme XLSTAT® version 7.5.2 (Addinsoft, New York, USA) sous Microsoft® Excel 2010.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée avec les paramètres suivants : la pondération uniforme, coefficient de corrélation de Pearson (ACP normée, variances en $1/n$) avec seuil de signification = 0,05 (test bilatéral). La classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée avec une classification des lignes, en fonction des colonnes ; pondération uniforme des colonnes, pondération uniforme des lignes, lors de l'agrégation des lignes ; distance euclidienne ; Critère d'agrégation (méthode de Ward). Les données sont centrées-réduites par colonnes.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement en huiles essentielles

Le rendement des galles de *Pistacia atlantica*, en huiles essentielles, pour les quatre régions concernées par notre étude (A, L, K et T), sont présentées dans le Tableau 6.

Le rendement obtenu est exprimé en moyenne et en écart type des échantillons, pour chaque région. Les valeurs des teneurs en huiles essentielles sont : $0,87 \pm 0,32$ % ; $0,58 \pm 0,11$ % ; $0,96 \pm 0,26$ % et $0,36 \pm 0,20$ % pour les galles des régions d'*Ain-Oussera* (A), de *Laghout* (L) et de *Kheneg* (K) et *Tilghemt* (T), respectivement.

Les galles fraîchement récoltées ont été caractérisées par la couleur verte tendant à la couleur brune. Les huiles essentielles de galles ont été obtenues avec différents rendements, allant de 0,08 à 1,89% (v/m).

En effet, avec les galles brunes, la gamme supérieure de variation de rendement ne dépasse pas 0,15% (Tableaux 8).

Les huiles essentielles des galles vertes ont été obtenues avec une odeur agréable, légère sans couleur. Contrairement aux galles vertes, les huiles essentielles des galles brunissent d'une couleur jaune claire, et l'odeur était très forte et très caractéristique.

Tableau 6 : Le rendement en % (v/m) des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica*

| Rendement en % (v/m) des huiles essentielles des échantillons issus des quatre régions étudiées | | | | | | | |
|---|------|--------------------|------|-------------------|------|---------------------|------|
| <i>Ain Oussera</i> (A) | | <i>Laghout</i> (L) | | <i>Kheneg</i> (K) | | <i>Tilghemt</i> (T) | |
| Max | 1,89 | Max | 0,75 | Max | 1,44 | Max | 0,56 |
| Min | 0,32 | Min | 0,46 | Min | 0,67 | Min | 0,08 |
| Moy | 0,87 | Moy | 0,58 | Moy | 0,96 | Moy | 0,36 |
| Sd | 0,32 | Sd | 0,11 | Sd | 0,26 | Sd | 0,20 |

Selon les travaux de **Tzakou et al. (2007)**, sur *Pistacia atlantica*, le rendement en huile essentielle obtenu à partir de matériel frais, a été de 0,13 à 0,24%, pour les feuilles, et de 0,20 à 0,22% pour les fruits mûrs (v/m). Cependant, les travaux menés, sur les feuilles et les galles, par **Gourine et al. (2010)(2011)**, sur des échantillons collectés dans différentes stations du pays ainsi que ceux effectués par (**Takhi et al., 2011**), à *Kheneg* et *Bouterkfine*, ont révélé des rendements plus faibles (0,02 à 0,13% et 0,13% (v/m), respectivement).

Nous attribuons le faible rendement observé dans ces travaux, comparé à celui que nous avons révélé, à une différence dans les périodes du cycle végétatif où la prise d'échantillon a été effectuée. En effet, les échantillons prélevés à différentes périodes de l'année ne donnent pas les mêmes teneurs (**Takhi et al., 2011**).

En effet, selon **Panizzi et al., (1993) in(Lahlou, 2004)**, plusieurs facteurs influent le rendement en huiles essentielles :

- ✓ La différence des conditions environnementales, climatiques et géographiques ;
- ✓ La période de la récolte ;
- ✓ Les modes d'extraction.

Dans notre travail, les huiles essentielles étudiées sont obtenues par le même mode d'extraction. De plus, les galles sont récoltées dans la même période. De ce fait, nous pensons que la variabilité de la quantité en huile essentielle, révélée entre nos échantillons, serait due à une différence de climat entre les quatre régions.

Il est à noter qu'à travers notre étude, nous n'avons pas de paramètres scientifiques pour mesurer l'importance de certaines conditions environnementales telles que la pollution qu'induit la décharge de la ville de *Laghout*, située à proximité de la station échantillonnée à *Kheneg*; un tel endroit est fréquenté par des insectes qui pourraient contribuer à la formation de galles sur les feuilles du Pistachier de l'Atlas.

Nos résultats ainsi que ceux rapportés dans la bibliographie (**Flamini et al., 2004; Tzakou et al., 2007; Gourine et al., 2010; Gourine et al., 2011**), montrent que le rendement des galles de *Pistacia atlantica* Desf., en huiles essentielles, est nettement supérieur à celui des feuilles et des fruits.

3.2. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles des galles du *Pistacia atlantica* Desf., a été déterminée à l'aide de deux techniques d'analyses : la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CG-SM).

La composition chimique des huiles essentielles des galles des quatre régions est résumée dans le Tableau 7.

Dans les huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf., nous avons identifié trente-cinq (35) composés différents.

En général, les échantillons d'huile essentielle sont riches en monoterpènes à une gamme de variation de [22.9 - 97.7%] avec une dominance des monoterpènes hydrocarbonés[19.3-95.1%].

Les composés majoritaires identifiés sont :

- ✓ -Pinène [59,01% – 81,50%]
- ✓ -Pinène[8,96% – 17,98%]
- ✓ Sabinène[17,44% – 28,04%]

D'autres composés, en pourcentages plus ou moins importants ont été mis en évidence :

- ✓ Limonène[5,35% – 7,17%]
- ✓ p-Cymène[7,57% – 11,39%]
- ✓ Terpinène-4-ol [8,71% – 20,86%]

Le myrcène a été identifié seulement dans l'échantillon d'*Ainoussera* avec un pourcentage maximum de 20,43%. Cependant, l'échantillon de *Laghouat* a été caractérisé par la présence -3-Carene, avec un pourcentage maximum de 75,34%.

Relativement, les huiles essentielles des échantillons étudiés, présentent de larges variations de pourcentages, à chacun des composants majoritaires ; ce qui suppose l'existence de différents chémotypes au sein de la même espèce, *Pistacia atlantica* Desf.

Tableau 7 : Moyenne et gamme de variation de la composition chimique des huiles essentielles des galles de l'espèce *P. atlantica*

| Constituants | <i>Ain-oussera</i> ^a | | | | <i>Laghouat</i> ^b | | | | <i>Kheneg</i> ^c | | | | <i>Tilghem</i> ^d | | | | RI ^e | Identification |
|------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|-------|------------------------------|--------------|--------------|-------|----------------------------|--------------|--------------|-------|-----------------------------|--------------|--------------|-------|-----------------|----------------|
| | Min | Max | Moy | SD | Min | Max | Moy | SD | Min | Max | Moy | SD | Min | Max | Moy | SD | | |
| 1 Ticyclène | tr | 1,40 | 0,49 | 0,33 | tr | 1,01 | 0,58 | 0,43 | 0,41 | 1,26 | 0,80 | 0,27 | 0,06 | 0,65 | 0,37 | 0,21 | 1011 | MS, RI |
| 2 -Pinène | 12,49 | 81,50 | 40,64 | 19,80 | 2,2 | 59,01 | 33,92 | 24,54 | 24,33 | 61,28 | 51,31 | 12,32 | 14,51 | 74,27 | 45,18 | 28,24 | 1025 | MS, RI |
| 3 Camphène | 0,29 | 5,82 | 1,85 | 1,37 | tr | 3,91 | 2,06 | 1,70 | 0,49 | 4,25 | 2,35 | 1,10 | 0,54 | 1,76 | 1,14 | 0,54 | 1063 | MS, RI |
| 4 -Pinène | 2,34 | 16,17 | 7,09 | 3,47 | 0,18 | 14,2 | 8,68 | 5,62 | 2,92 | 17,98 | 10,41 | 4,16 | 2,82 | 8,96 | 6,09 | 2,30 | 1106 | MS, RI |
| 5 Sabinène | 0,18 | 26,11 | 9,64 | 10,64 | tr | 28,04 | 7,36 | 11,94 | tr | 27,01 | 4,28 | 9,28 | 0,19 | 17,44 | 8,83 | 8,56 | 1119 | MS, RI |
| 6 -3-Carène | tr | 1,11 | 0,22 | 0,20 | 0,31 | 75,34 | 19,23 | 32,40 | tr | 1,1 | 0,68 | 0,39 | 0,15 | 0,64 | 0,41 | 0,19 | 1147 | MS, RI |
| 7 Myrcène | 0,48 | 20,43 | 5,56 | 4,14 | 1,32 | 3,65 | 2,28 | 0,88 | 1,62 | 7,15 | 4,08 | 1,51 | 0,61 | 3,35 | 1,85 | 1,08 | 1165 | MS, RI, AS |
| 8 - <i>Phellandrène</i> | tr | 1,32 | 0,12 | 0,29 | tr | 0,4 | 0,16 | 0,17 | tr | 1,21 | 0,49 | 0,43 | tr | 0,79 | 0,26 | 0,32 | 1169 | MS, RI |
| 9 Isocinéole | tr | 2,10 | 0,16 | 0,38 | tr | 0,76 | 0,27 | 0,31 | tr | 1,69 | 0,38 | 0,60 | tr | 0,68 | 0,30 | 0,26 | 1183 | MS, RI |
| 10 Limonène | 1,29 | 7,17 | 2,91 | 1,44 | 2,42 | 5,51 | 4,01 | 1,24 | 3,06 | 5,35 | 4,51 | 0,84 | 1,34 | 3,29 | 2,42 | 0,87 | 1205 | MS, RI |
| 11 - <i>Phellandrène</i> | 0,35 | 3,07 | 1,10 | 0,56 | tr | 1,54 | 1,07 | 0,63 | tr | 2,72 | 1,92 | 0,89 | 0,46 | 1,67 | 1,01 | 0,51 | 1214 | MS, RI, AS |
| 12 -Terpinène | tr | 7,81 | 0,52 | 1,39 | tr | tr | 0,00 | 0,00 | tr | 2,87 | 0,53 | 1,00 | tr | 1,81 | 0,45 | 0,78 | 1247 | MS, RI |
| 13 <i>p</i> -Cymène | 0,35 | 11,39 | 3,24 | 3,14 | 0,74 | 7,57 | 2,83 | 2,76 | 1,02 | 2,59 | 1,53 | 0,49 | 0,59 | 9,33 | 4,77 | 3,84 | 1274 | MS, RI |
| 14 -Terpinolène | tr | 2,86 | 0,50 | 0,70 | tr | 1,53 | 0,82 | 0,70 | 0,11 | 4,38 | 2,15 | 1,41 | tr | 2,18 | 0,87 | 0,92 | 1296 | MS, RI |
| 15 Unknown 1 | tr | 0,65 | 0,20 | 0,18 | tr | 0,59 | 0,23 | 0,25 | tr | 0,31 | 0,11 | 0,11 | tr | 0,77 | 0,25 | 0,32 | 1386 | MS, RI |
| 16 -Thujone | tr | 0,21 | 0,04 | 0,06 | 0,1 | 0,18 | 0,13 | 0,03 | tr | 0,23 | 0,14 | 0,09 | 0,12 | 0,14 | 0,13 | 0,01 | 1450 | MS, RI |
| 17 Camphor | tr | 0,17 | 0,02 | 0,04 | tr | 0,12 | 0,03 | 0,05 | tr | 0,14 | 0,07 | 0,06 | tr | 0,14 | 0,09 | 0,05 | 1477 | MS, RI |
| 18 <i>p</i> -Menth-3-en-1-ol | tr | 1,39 | 0,16 | 0,30 | tr | 0,17 | 0,08 | 0,08 | tr | 2,2 | 0,45 | 0,73 | tr | 0,75 | 0,37 | 0,31 | 1586 | MS, RI |
| 19 Acétate de bornyle | 0,12 | 3,73 | 0,77 | 0,78 | tr | 1,33 | 0,69 | 0,64 | 0,13 | 1,55 | 0,72 | 0,62 | 0,14 | 0,61 | 0,33 | 0,18 | 1591 | MS, RI |
| 20 Terpinèn-4-ol | 0,22 | 20,86 | 5,91 | 6,37 | 0,11 | 15,9 | 4,29 | 6,70 | 0,21 | 8,71 | 1,99 | 2,99 | 0,31 | 18,1 | 8,35 | 8,12 | 1617 | MS, RI, AS |
| 21 Myrtenal | tr | 0,36 | 0,07 | 0,08 | tr | 0,11 | 0,05 | 0,05 | tr | tr | 0,00 | 0,00 | tr | 0,19 | 0,08 | 0,08 | 1643 | MS, RI |
| 22 Unknown 2 | tr | 0,62 | 0,18 | 0,21 | tr | 0,25 | 0,06 | 0,11 | tr | 0,09 | 0,01 | 0,03 | tr | 0,56 | 0,24 | 0,24 | 1662 | MS, RI |
| 23 <i>E</i> -Pinocarveol | tr | 0,54 | 0,13 | 0,13 | tr | 0,27 | 0,13 | 0,13 | tr | 0,24 | 0,11 | 0,08 | tr | 0,25 | 0,13 | 0,13 | 1670 | MS, RI |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------|-------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------------|
| 24 | Cryptone | 0,1 | 1,76 | 0,58 | 0,36 | 0,29 | 0,72 | 0,51 | 0,15 | tr | 1,74 | 0,46 | 0,55 | 0,13 | 0,98 | 0,52 | 0,39 | 1694 | MS, RI |
| 25 | Unknown 3 | tr | 2,69 | 0,44 | 0,53 | 0,24 | 1,74 | 0,70 | 0,60 | tr | 1,01 | 0,35 | 0,29 | 0,23 | 0,31 | 0,27 | 0,03 | 1701 | MS, RI |
| 26 | -Terpinéol | 0,66 | 6,72 | 2,51 | 1,41 | 1,85 | 3,41 | 2,83 | 0,61 | 1,15 | 4,83 | 2,66 | 1,29 | 1,6 | 2,25 | 1,90 | 0,29 | 1707 | MS, RI, AS |
| 27 | Myrtenol | tr | 0,26 | 0,01 | 0,05 | tr | tr | 0,00 | 0,00 | tr | tr | 0,00 | 0,00 | tr | tr | 0,00 | 0,00 | 1772 | MS, RI |
| 28 | Unknown 4 | tr | 0,75 | 0,22 | 0,17 | tr | 0,24 | 0,16 | 0,09 | tr | 0,77 | 0,30 | 0,23 | tr | 0,62 | 0,29 | 0,23 | 1807 | MS, RI |
| 29 | <i>p</i> -Cymèn-ol | 0,11 | 1,53 | 0,46 | 0,31 | 0,26 | 0,66 | 0,48 | 0,15 | 0,16 | 1,27 | 0,75 | 0,37 | 0,28 | 0,92 | 0,56 | 0,26 | 1869 | MS, RI |
| 30 | Unknown 5 | tr | 18,43 | 1,18 | 2,95 | tr | 0,11 | 0,05 | 0,05 | tr | 0,1 | 0,03 | 0,05 | tr | 0,25 | 0,12 | 0,09 | 2038 | MS, RI |
| 31 | Unknown 6 | tr | 0,53 | 0,15 | 0,16 | tr | 0,15 | 0,04 | 0,06 | tr | 0,17 | 0,02 | 0,06 | tr | 0,63 | 0,22 | 0,26 | 2116 | MS, RI |
| 32 | Unknown 7 | tr | 1,03 | 0,37 | 0,27 | 0,14 | 0,34 | 0,25 | 0,09 | tr | 0,96 | 0,30 | 0,29 | 0,09 | 1,46 | 0,58 | 0,54 | 2130 | MS, RI |
| 33 | Spathuléol | 0,25 | 5,04 | 1,03 | 0,86 | 0,24 | 0,86 | 0,54 | 0,25 | 0,12 | 2,72 | 0,61 | 0,88 | 0,24 | 0,97 | 0,68 | 0,27 | 2143 | MS, RI |
| 34 | Acide myristique | tr | 2,69 | 0,62 | 0,58 | 0,1 | 0,23 | 0,18 | 0,05 | 0,17 | 6,03 | 1,07 | 2,03 | 0,22 | 1,31 | 0,67 | 0,42 | 2726 | MS, RI |
| 35 | Acide palmitique | tr | 0,91 | 0,15 | 0,18 | tr | 0,14 | 0,06 | 0,06 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,21 | 0,15 | 0,09 | 2912 | MS, RI |
| Total identifié % | | 52,06 | 99,24 | 89,24 | 9,39 | 92,46 | 97,01 | 94,72 | 1,79 | 86,44 | 99,22 | 95,58 | 3,88 | 74,05 | 98,47 | 89,82 | 9,51 | | |
| Hydrocarbures monoterpeniques | | 19,27 | 95,06 | 73,87 | 14,49 | 68,67 | 88,48 | 82,99 | 8,31 | 59,81 | 92,47 | 85,04 | 10,57 | 49,03 | 94,87 | 73,64 | 17,88 | | |
| Monoterpenes oxygénés | | 2,16 | 26,95 | 10,25 | 6,19 | 4,68 | 20,49 | 8,96 | 6,67 | 3,96 | 14,41 | 7,27 | 3,86 | 2,65 | 22,32 | 12,22 | 8,48 | | |
| Total monoterpenes | | 22,87 | 97,71 | 84,12 | 13,67 | 89,16 | 94,26 | 91,94 | 1,92 | 74,22 | 97,55 | 92,31 | 7,48 | 67,84 | 97,52 | 85,85 | 11,04 | | |
| Hydrocarbures sesquiterpeniques | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| sesquiterpenes oxygénés | | 0,25 | 5,04 | 1,03 | 0,86 | 0,24 | 0,86 | 0,54 | 0,25 | 0,12 | 2,72 | 0,61 | 0,88 | 0,24 | 0,97 | 0,68 | 0,27 | | |
| Total sesquiterpenes | | 0,25 | 5,04 | 1,03 | 0,86 | 0,24 | 0,86 | 0,54 | 0,25 | 0,12 | 2,72 | 0,61 | 0,88 | 0,24 | 0,97 | 0,68 | 0,27 | | |
| Autres composées | | 0,59 | 20,55 | 3,33 | 3,19 | 1,58 | 2,77 | 2,00 | 0,47 | 0,61 | 3,47 | 1,58 | 0,83 | 0,49 | 4,82 | 2,47 | 1,57 | | |
| Acides gras | | tr | 3,6 | 0,77 | 0,73 | 0,1 | 0,33 | 0,24 | 0,09 | 0,17 | 6,03 | 1,07 | 2,03 | 0,22 | 1,5 | 0,82 | 0,47 | | |
| Rendement % (v/m) | | 1,89 | 0,32 | 0,87 | 0,32 | 0,75 | 0,46 | 0,58 | 0,11 | 1,44 | 0,67 | 0,96 | 0,26 | 0,56 | 0,08 | 0,36 | 0,20 | | |

^a 39 échantillons, ^b 2 échantillons, ^c 7 échantillons, ^d 4 échantillons

^e indice de rétention linéaire expérimental relative aux homologues *n*-alcane C₈-C₄₀ obtenu sur colonne UB-Wax.

tr = trace (<0.1%).

Min : Minimum, **Max** : Maximum, **Moy** : Moyenne, **S.D.** Standard de déviation.

RI: Linear retention indices on UB-wax column. **MS**: mass spectrometry. **AS**: Retention indices of pure authentic samples.

Tableau 8 : Moyenne et gamme de variation de la composition chimique des huiles essentielles de galles de l'espèce *P. atlantica*

| Constituants | Gamme de variation ^a | | | | RI ^b | Identification |
|-----------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|----------------|
| | Min | Max | Moy | SD | | |
| Tricyclene | tr | 1,1 | 0,4 | 0,5 | 1011 | MS, RI |
| -Pinene | 9,6 | 30,3 | 16,4 | 9,4 | 1025 | MS, RI |
| Camphene | 1,6 | 3,5 | 2,4 | 0,8 | 1063 | MS, RI |
| -Pinene | 2,4 | 9,1 | 6,5 | 3,2 | 1106 | MS, RI |
| Sabinène | 0,3 | 4,8 | 1,5 | 2,2 | 1119 | MS, RI |
| Verbenene | tr | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 1125 | MS, RI |
| -3-Carene | tr | 0,5 | 0,1 | 0,3 | 1147 | MS, RI |
| Myrcene | tr | 1,2 | 0,8 | 0,5 | 1165 | MS, RI, AS |
| -Phellandrene | tr | 1,4 | 0,9 | 0,6 | 1169 | MS, RI |
| -Terpinene | tr | 3,4 | 1,1 | 1,6 | 1187 | MS, RI |
| Limonene | 1,0 | 2,2 | 1,9 | 0,6 | 1205 | MS, RI |
| -Phellandrene | 0,3 | 1,1 | 0,6 | 0,5 | 1214 | MS, RI, AS |
| -Terpinene | 0,2 | 5,3 | 1,6 | 2,5 | 1247 | MS, RI |
| <i>p</i> -Cymene | 0,1 | 5,9 | 2,3 | 2,8 | 1274 | MS, RI |
| -Terpinolene | tr | 2,2 | 0,7 | 1,0 | 1296 | MS, RI |
| -Thujone | tr | 1,4 | 0,6 | 0,7 | 1450 | MS, RI |
| Linalool | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 1557 | MS, RI, AS |
| Bornyl acetate | 0,6 | 2,4 | 1,3 | 0,8 | 1591 | MS, RI |
| Terpinen-4-ol | 10,1 | 13,1 | 11,4 | 1,4 | 1617 | MS, RI, AS |
| Aromadendrene | tr | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 1621 | MS, RI |
| <i>allo</i> -Aromadendrene | 0,5 | 1,6 | 1,2 | 0,5 | 1661 | MS, RI |
| <i>E</i> -Pinocarveol | 0,3 | 2,9 | 1,3 | 1,2 | 1670 | MS, RI |
| -Terpineol | 4,8 | 10,3 | 7,8 | 2,8 | 1707 | MS, RI, AS |
| Bicyclogermacrene | 0,6 | 7,2 | 4,0 | 3,7 | 1751 | MS, RI |
| Globulol | tr | 3,6 | 1,3 | 1,7 | 2076 | MS, RI, AS |
| Viridiflorol | tr | 1,6 | 0,9 | 0,8 | 2104 | MS, RI |
| Spathulenol | 2,0 | 5,8 | 4,3 | 1,6 | 2143 | MS, RI |
| -Eudesmol | 0,3 | 1,3 | 1,0 | 0,5 | 2164 | MS, RI |
| Isospathulenol | 0,6 | 2,1 | 1,1 | 0,7 | 2245 | MS, RI |
| Phytol | tr | 1,7 | 0,8 | 0,9 | 2624 | MS, RI, AS |
| Palmitic acid | 0,3 | 2,0 | 0,8 | 0,8 | 2912 | MS, RI |
| Monoterpenes hydrocarbonés | 24,6 | 62,8 | 36,9 | 17,5 | | |
| Monoterpenes oxygénés | 19,6 | 26,3 | 22,5 | 2,8 | | |
| Total monoterpenes | 50,9 | 82,4 | 59,4 | 15,4 | | |
| Sesquiterpènes hydrocarboné | 1,5 | 9,6 | 5,6 | 4,6 | | |
| Sesquiterpènes oxygénés | 3,2 | 12,1 | 8,6 | 3,8 | | |
| Autres composés | 1,4 | 1,7 | 1,6 | 0,9 | | |
| Acides gras | 0,3 | 2,0 | 0,8 | 0,8 | | |
| Rendement% (v/m) | 0,08 | 0,15 | 0,12 | 0,05 | | |

^agamme de variation basé sur 6 échantillons.

^b indice de rétention linéaire expérimental relative aux homologues *n*-alcanes C₈–C₄₀ obtenu sur colonne UB-Wax.

tr = trace (<0.1%), **Min** : Minimum, **Max** : Maximum, **Moy** : Moyenne, **S.D.** Standard de déviation.

RI: Linear retention indices on UB-wax column. **MS**: mass spectrometry. **AS**: Retention indices of pure authentic samples.

3.3. Analyse statistique (traitement des données)

Les principaux composés majoritaire ne sont pas les mêmes pour tous les échantillons analysés provenant des différents endroits (A, L, K et T) ; le composé majoritaire pour un échantillon est minoritaire pour un autre et *vice-versa*. Cette variabilité du contenu des principaux composés majoritaire suppose l'existence de différents chemotypes, au sein de la même plante (*P. atlantica*).

Afin de confirmer ou infirmer ceci, les résultats de la composition chimique des huiles essentielles des galles (non mûres) ont été examinés statistiquement par des analyses multivariées :

- ✓ L'analyse en composantes principales (ACP)
- ✓ La classification ascendante hiérarchique (CAH).

Ainsi, l'ensemble de données des 52 échantillons avec les quatorze (14) variables (principaux composés), ont été soumis à l'analyse.

3.3.1. Analyse en composantes principales (ACP)

Pour la méthode ACP, les facteurs de chargement pour les axes principaux F1 et F2 avec rotation Varimax sont illustrés dans la Figure 14.

Le coefficient de saturation des 14 variables sur les axes F1 et F2 (Cercle de corrélations), en utilisant l'ACP de la composition chimique obtenue par chromatographie en phase gazeuse des 52 échantillons d'huiles essentielles représentées sur la figure 14, montre une forte corrélation avec certains composants des huiles essentielles.

Le *tricyclène* est hautement corrélé avec le *camphène* ($R = 0,992$), le *sabinène* est fortement corrélé, à la fois, avec le *p-cymène* ($R = 0,839$) et le *terpinène-4-ol* ($R = 0,868$), et le *p-cymène* est également fortement corrélé avec le *terpinène-4-ol* ($R = 0,861$).

D'autre part, l'*-pinène* est réversiblement corrélé avec le *terpinène-4-ol* ($R = -0,766$), le *sabinène* ($R = -0,766$) et le *p-cymène* ($R = -0,71$).

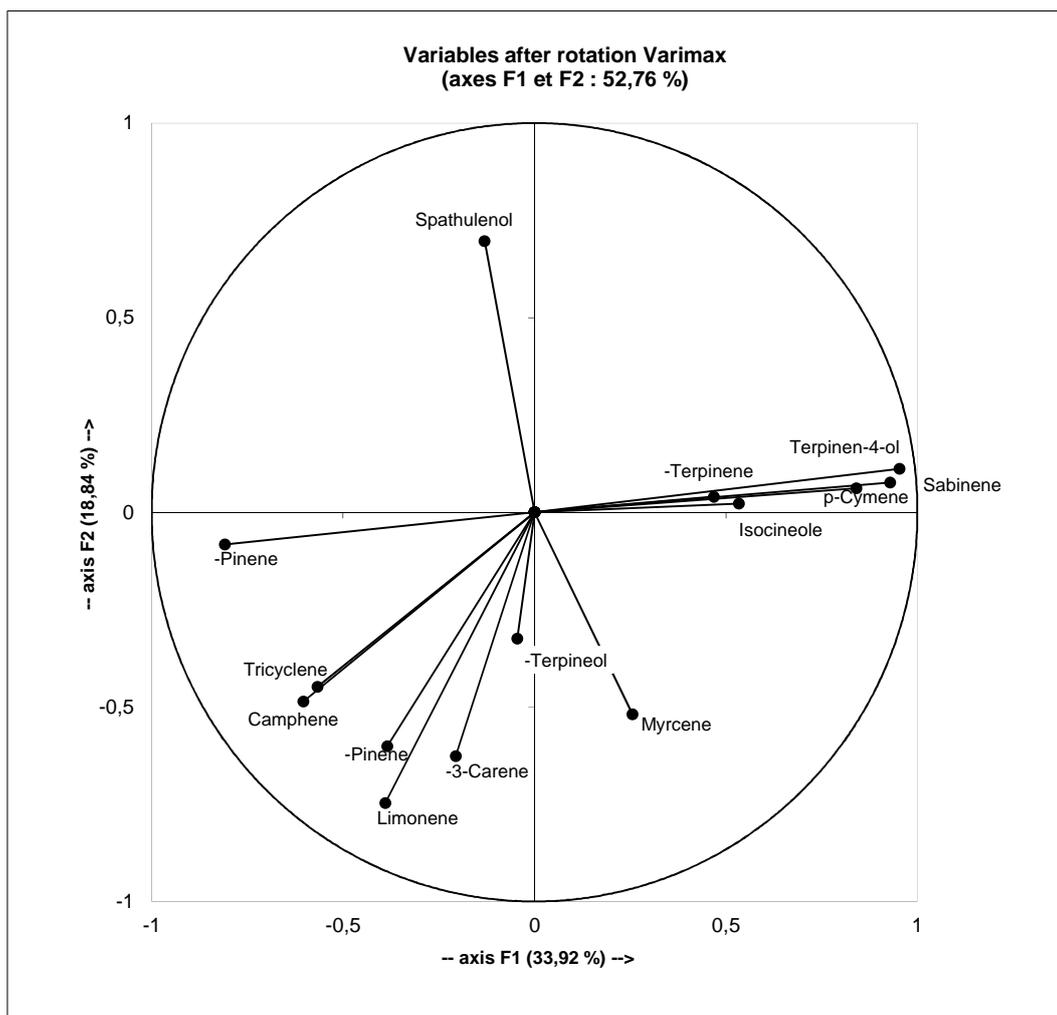
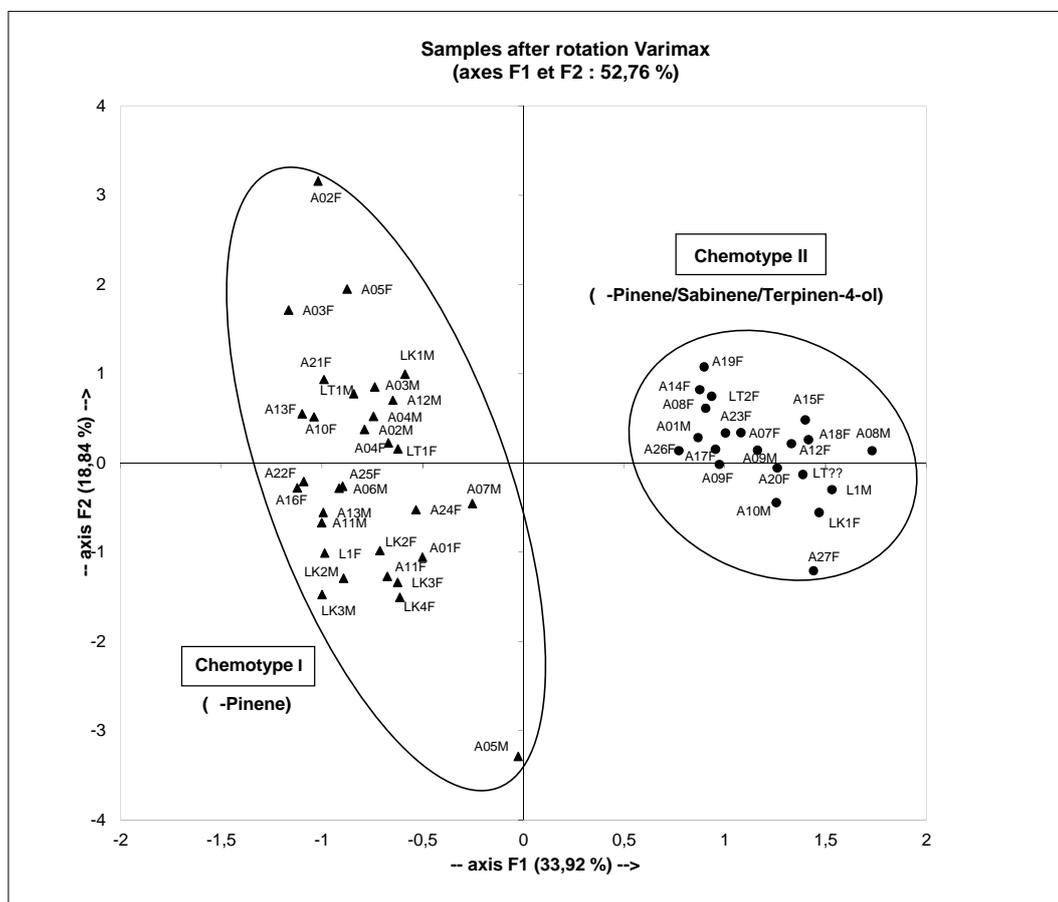


Figure 14 : Facteur de chargement de 14 variables sur les axes F1 et F2, en utilisant l'analyse en composantes principales des 52 échantillons d'huiles essentielles de *P. atlantica*

L'Axe F1, représentant 33,92% de l'information totale, est fortement corrélé, négativement, avec l' *-pinène* et en corrélation positive avec les deux *tricyclène* et *camphène*. Il est fortement corrélé, positivement, avec le *terpinène-4-ol*, le *sabinène* et le *p-cymène*. Cet axe est également en bonne corrélation avec *-terpinène* et *isocinéole*. Ainsi, cet axe sépare les échantillons en deux nuages de points (Figure 15).

L'Axe F2, représentant 18,84% de l'information totale, est fortement corrélé, positivement, avec le *spathulénolet* négativement corrélé avec le *limonène*, le *-pinène*, l' *-3-carène* et le *myrcène*. Ces axes permettent de séparer les nuages d'échantillons (Figure 15).

Il a été constaté que le chemotype *-pinène* est plus abondant que les chemotypes *sabinène / terpinène-4-ol* ; avec un nombre d'échantillons représentant 59,6% du total des échantillons analysés.



A: Region of Ain-Oussera, L: Region of Laghouat, K: Location of Kheneg, T: Location of Tihlghemt, M: male tree, F: female tree.

Figure 15 : Graphe en deux dimensions représentant les axes F1 et F2 obtenus en utilisant l'analyse en composantes principales des 52 échantillons d'huiles essentielles de *P. atlantica*

3.3.2. Classification ascendante hiérarchique (CAH).

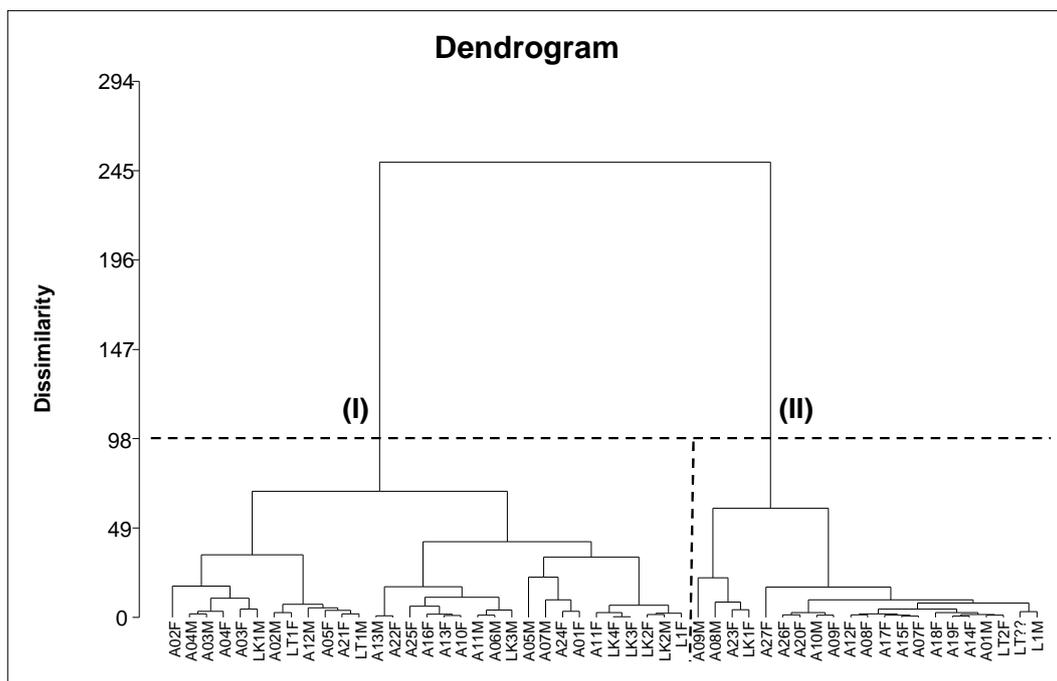
La deuxième méthode statistique utilisée est la CAH (Classification Ascendante Hiérarchique). L'analyse des groupes (clusters) a été réalisée en utilisant la technique du Ward.

De façon similaire à la méthode ACP, les résultats de la méthode CAH ont révélé et confirmé l'existence de deux groupes (clusters) différents (I et II), les mêmes, pour les échantillons des huiles essentielles de l'espèce *P. atlantica* (Figure 16).

La distance,mesurant la dissimilitude,est très importante entre les deux groupes identifiés ; ce qui illustre la facilité de distinguer les deux chemotypes.

Le groupe (I) regroupe les échantillons dupremier chemotype, *-pinene*, tandis que le deuxième groupe (II) regroupe ceux du second chemotype,*sabinène/terpinen-4-ol*.

Les résultats de l’analyse statistique ont révélé, à la fois, pour la méthode ACP et la méthode CAH, que la composition de l’huile essentielle et les chemotypes identifiés ne sont pas liés à la région de la collecte ou au sexe de l’arbre (mâle ou femelle).



A: Region of Ain-Oussera, L: Region of Laghouat, K: Location of Kheneg, T: Location of Tihlghemt, M: male tree, F: female tree.

Figure 16 : Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse des clusters des 52 échantillons d’huiles essentielles de *P. atlantica* des différentes régions d’étudiées. Les échantillons se regroupent en utilisant la technique de Ward avec une mesure de distance euclidienne

3.4. Discussion

En tenant compte de la variation de la composition chimique, on peut séparer deux groupes ou chemotypes, comme la montre les Figures 14-16. Ces deux chemotypes peuvent être facilement distingués en utilisant trois composants différents: *-pinène*, *sabinène* et *terpinène-4-ol*. Le Tableau 9 présente les données pour chaque chemotype.

Le chemotype I (chemotype *-pinène*) se caractérise par le plus fort pourcentage de *-pinène* ; pouvant atteindre 81,5% avec une marge de variation des valeurs moyennes de

55,2 ± 15,7%. En revanche, les pourcentages des deux composés *sabinène* et *terpinène-4-ol* pour ce chemotype sont faibles. Ils représentent moins de 1,9% et 3,8%, respectivement.

Contrairement au chemotype (I), le chemotype (II) (chemotype *-pinène/sabinène / terpinène-4-ol*) est caractérisée par la plus forte teneur, à la fois, de *sabinène* et de *terpinène-4-ol*, et, relativement, une basse teneur du *-pinène*.

Le pourcentage des deux composés *sabinène* et *terpinène-4-ol* varie de 8,1 à 28,0% et de 8,7 à 20,9%, respectivement. Pour l' *-pinène*, l'intervalle de variation est de 14,2 à 32,8%. Ces deux variations sont pratiquement très proches les unes des autres.

Pour le chemotype (II) la variation de l' *-pinène* est moins importante que celle enregistrée pour le chemotype (I). Cependant, le pourcentage de l' *-pinène* était important ; avec une valeur moyenne de 23,2%. Ainsi, l' *-pinène* est considéré comme composé principal pour les deux chemotypes (I et II) et le *sabinène* et le *terpinène-4-ol* ont été considérés comme des composés majoritaires du chemotype (II), seulement.

Il est important de noter que la teneur de certains composés varie de pourcentages faibles à des pourcentages élevés; c'est le cas de la *-pinène* [2,3 à 18,0%] et du *myrcène* [0,5 à 20,4%].

D'une manière générale, il a été observé que, mis à part les principaux composés majoritaires utilisés dans la distinction entre les deux chemotypes, la plupart des composés chimiques de nos huiles essentielles n'ont, pratiquement, pas eu d'effet sur la différenciation des chemotypes.

Après l'examen de la répartition des échantillons dans les deux chemotypes, définis en utilisant l'ACP et la CAH, il a été noté que les échantillons étudiés sont presque également répartis entre les deux chemotypes identifiés: *-pinène* chemotype représentent 59,6% du total des individus testés, et le chemotype (*-pinène / sabinène / terpinène-4-ol*) représentent une valeur de 40,4% ; ce qui est pratiquement très proche de la première.

Enfin, il a été détecté pour la région *Ainoussera*, une seule valeur élevée d'un composant non identifié "*unknown5*" avec un pourcentage de 18,4%. Ce qui positionne cet échantillon à l'opposé du reste des échantillons (région *Laghouat*, *Kheneg* et *Tilghemt*) dont le contenu ne dépasse pas 3,3%.

Tableau 9 : Moyenne et gamme de variation de deux chemotypes identifiés des huiles essentielles de galles de l'espèce *P. atlantica*

| Compounds | Chemotype (I) ^a -pinene | | | | Chemotype (II) ^b -pinene/sabinene/terpinen-4-ol | | | | RI ^c | Identification |
|----------------------------------|---------------------------------------|-------------|------|------|---|-------------|------|------|-----------------|----------------|
| | Min | Max | Mean | Sd | Min | Max | Mean | Sd | | |
| Tricyclene | 0.1 | 1.4 | 0.7 | 0.3 | tr | 0.7 | 0.3 | 0.2 | 1011 | MS, RI |
| -Pinene | 12.5 | 81.5 | 55.2 | 15.7 | 14.2 | 32.8 | 23.2 | 5.1 | 1025 | MS, RI |
| Camphene | 0.5 | 5.8 | 2.5 | 1.3 | 0.3 | 2.0 | 0.9 | 0.4 | 1063 | MS, RI |
| -Pinene | 2.3 | 18.0 | 9.0 | 4.3 | 3.4 | 9.4 | 5.8 | 1.95 | 1106 | MS, RI |
| Sabinene | tr | 1.9 | 0.6 | 0.4 | 8.1 | 28.0 | 21.5 | 4.6 | 1119 | MS, RI |
| -3-Carene | tr | 1.1 | 0.4 | 0.3 | tr | 0.5 | 0.2 | 0.1 | 1147 | MS, RI |
| Myrcene | 0.5 | 20.4 | 4.5 | 4.2 | 1.1 | 12.4 | 5.6 | 3.1 | 1165 | MS, RI, AS |
| -Phellandrene | tr | 1.3 | 0.2 | 0.4 | tr | 1.1 | 0.2 | 0.3 | 1169 | MS, RI |
| Isocineole | tr | 0.8 | 0.1 | 0.2 | tr | 2.1 | 0.4 | 0.6 | 1183 | MS, RI |
| Limonene | 1.3 | 6.9 | 3.7 | 1.3 | 1.3 | 7.2 | 2.2 | 1.2 | 1205 | MS, RI |
| -Phellandrene | tr | 3.1 | 1.3 | 0.81 | tr | 2.5 | 1.1 | 0.5 | 1214 | MS, RI, AS |
| -Terpinene | tr | 0.9 | tr | 0.2 | tr | 7.8 | 1.2 | 1.8 | 1247 | MS, RI |
| <i>p</i> -Cymene | 0.4 | 1.9 | 1.0 | 0.4 | 0.5 | 11.4 | 6.4 | 2.5 | 1274 | MS, RI |
| -Terpinolene | tr | 4.0 | 0.7 | 1.0 | tr | 4.4 | 0.9 | 1.0 | 1296 | MS, RI |
| Unknown 1 | tr | 0.8 | 0.3 | 0.2 | tr | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 1386 | MS, RI |
| -Thujone | tr | 0.2 | 0.1 | 0.1 | tr | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 1450 | MS, RI |
| Camphor | tr | 0.2 | tr | 0.1 | tr | 0.1 | tr | tr | 1477 | MS, RI |
| <i>p</i> -Menth-3-en-1-ol | tr | 2.2 | 0.3 | 0.5 | tr | 0.6 | 0.1 | 0.2 | 1586 | MS, RI |
| Bornyl acetate | 0.1 | 3.7 | 1.0 | 0.8 | 0.1 | 0.7 | 0.3 | 0.2 | 1591 | MS, RI |
| Terpinen-4-ol | 0.2 | 3.8 | 0.6 | 0.6 | 8.7 | 20.9 | 13.1 | 3.1 | 1617 | MS, RI, AS |
| Myrtenal | tr | 0.4 | tr | 0.1 | tr | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 1643 | MS, RI |
| Unknown 2 | tr | 0.1 | tr | tr | 0.1 | 0.6 | 0.4 | 0.1 | 1662 | MS, RI |
| <i>E</i> -Pinocarveol | tr | 0.5 | 0.2 | 0.1 | tr | 0.3 | tr | 0.1 | 1670 | MS, RI |
| Cryptone | 0.1 | 1.8 | 0.7 | 0.4 | tr | 0.8 | 0.4 | 0.2 | 1694 | MS, RI |
| Unknown 3 | tr | 2.7 | 0.4 | 0.6 | tr | 1.7 | 0.5 | 0.4 | 1701 | MS, RI |
| -Terpineol | 0.7 | 6.7 | 2.7 | 1.6 | 1.2 | 3.3 | 2.2 | 0.6 | 1707 | MS, RI, AS |
| Myrtenol | tr | 0.3 | tr | 0.1 | tr | 0.2 | tr | tr | 1772 | MS, RI |
| Unknown 4 | tr | 0.8 | 0.3 | 0.2 | tr | 0.6 | 0.2 | 0.1 | 1807 | MS, RI |
| <i>p</i> -Cymen-ol | 0.1 | 1.5 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0.9 | 0.4 | 0.2 | 1869 | MS, RI |
| Unknown 5 | tr | 18.4 | 1.1 | 3.3 | tr | 2.4 | 0.5 | 0.7 | 2038 | MS, RI |
| Unknown 6 | tr | 0.2 | tr | 0.1 | tr | 0.6 | 0.3 | 0.2 | 2116 | MS, RI |
| Unknown 7 | tr | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 1.5 | 0.6 | 0.3 | 2130 | MS, RI |
| Spathulenol | 0.1 | 5.0 | 1.0 | 1.1 | 0.2 | 1.5 | 0.8 | 0.3 | 2143 | MS, RI |
| Myristic acid | tr | 6.0 | 0.8 | 1.2 | 0.2 | 1.0 | 0.5 | 0.2 | 2726 | MS, RI |
| Palmitic acid | tr | 0.9 | 0.1 | 0.2 | tr | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 2912 | MS, RI |
| <i>Monoterpenes HC</i> | 19.3 | 95.1 | 79.9 | 16.6 | 49.0 | 84.5 | 69.5 | 8.3 | | |
| <i>Oxygenated monoterpenes</i> | 2.2 | 14.4 | 5.5 | 2.8 | 12.0 | 27.0 | 16.8 | 3.7 | | |
| Total monoterpenes | 22.9 | 97.7 | 85.4 | 15.7 | 67.8 | 96.5 | 86.3 | 7.2 | | |
| <i>Oxygenated sesquiterpenes</i> | 0.1 | 5.0 | 1.0 | 1.1 | 0.2 | 1.5 | 0.84 | 0.3 | | |
| Other compounds | 0.5 | 20.6 | 3.0 | 3.6 | 0.6 | 5.8 | 2.9 | 1.3 | | |
| Fatty acids | 0.0 | 6.0 | 0.9 | 1.3 | 0.2 | 1.3 | 0.6 | 0.3 | | |
| EO yield % (v/w) | 0.32 | 1.89 | 0.96 | 0.37 | 0.08 | 0.98 | 0.71 | 0.20 | | |

^agamme de variation basé sur 31 échantillons, ^bgamme de variation basé sur 21 échantillons.

^c indice de rétention linéaire expérimental relative aux homologues *n*-alcanes C₈-C₄₀ obtenir sur colonne UB-Wax.

tr = trace (<0.1%), **Min** : Minimum, **Max** : Maximum, **Moy** : Moyenne, **S.D.** Standard de déviation.

RI: Linear retention indices on UB-wax column. **MS**: mass spectrometry. **AS**: Retention indices of pure authentic samples.

La composition chimique des huiles essentielles de galles vertes de *P. atlantica* a été comparée à celle de galles brunes.

Il a été noté que les valeurs des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles de galles brunes sont très proches de celles du chimotype "*-pinène*", à l'exception de la teneur en *terpinène-4-ol*. Cette dernière est relativement très élevée et semblable à celle du chimotype "*-pinène / sabinène / terpinène-4-ol*" (Tableau 7 et 8).

En ce qui concerne les composés mineurs, il y avait quelques différences qui semblent être liées à la présence de certains composants. Par exemple, les composés suivants *bicyclogermacrène* et *globulol* ont atteint des valeurs très importantes dans les huiles essentielles de galles brunes avec des pourcentages maximaux de 7,2 et 3,6%, respectivement. Cependant, dans les huiles essentielles de galles vertes, ces composés n'ont pas été détectés.

La comparaison entre la composition chimique des huiles essentielles des galles de *P. atlantica* de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature (**Mecherara-Idjeri et al., 2008b; Gourine et al., 2011**) révèle une ressemblance importante, avec des différences pour les composés majoritaires.

En effet, la présente étude confirme la présence du chimotype *-pinène* trouvé dans un rapport antérieur (**Mecherara-Idjeri et al., 2008b**), mais le nouveau chimotype (*-pinène / sabinène / terpinène-4-ol*) révélé dans ce travail, n'a jamais été signalé auparavant.

Dans un travail précédent (**Gourine et al., 2011**), nous avons révélé l'existence d'un autre chimotype, nouveau, caractérisé par la présence d'un seul composé : l'*-3-carène* (75,34%). Ce chimotype est très rare.

4. CONCLUSION

L'analyse statistique multivariée par la méthode ACP et la méthode CAH a été effectuée dans cette étude impliquant l'étude d'un grand nombre d'échantillons d'huiles essentielles de galls de l'espèce *P. atlantica*, provenant de différentes régions d'Algérie (*Ainoussera*, *Laghout*, *Kheneg* et *Tilghemt*), a révélé l'existence d'un nouveau chemotype (-pinène / sabinene / terpinène-4-ol), non encore signalé précédemment. Ce chemotype, nouveau, se caractérise par des teneurs, relativement, élevées de *sabinene* et *terpinène-4-ol*.

Concernant les caractéristiques organoleptiques, nous avons constaté une faible différence dans nos échantillons d'huiles essentielles ; tels que présentent une couleur translucide et une odeur douce et légère.

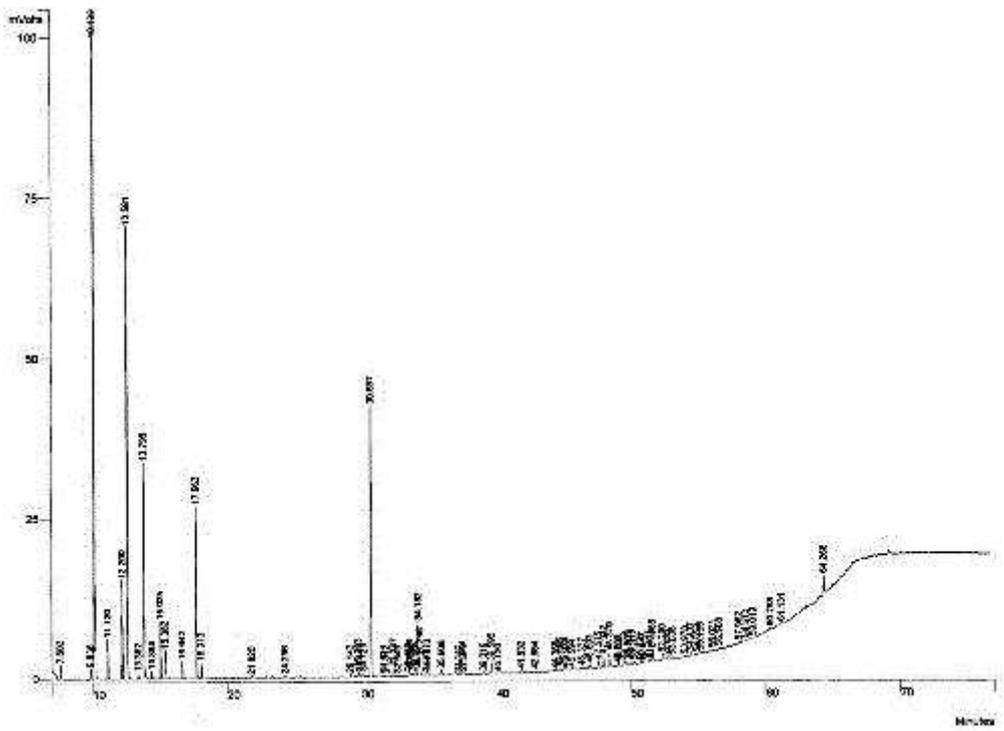
Il est à noter que ces caractéristiques sont recherchées pour leurs intérêts dans l'industrie agroalimentaire (additifs alimentaires : antioxydants naturels et conservateurs) et en médecine (activité antimicrobienne).

Enfin, l'apparition de différents chemotypes devrait avoir certainement une influence sur les activités biologiques de ces huiles essentielles

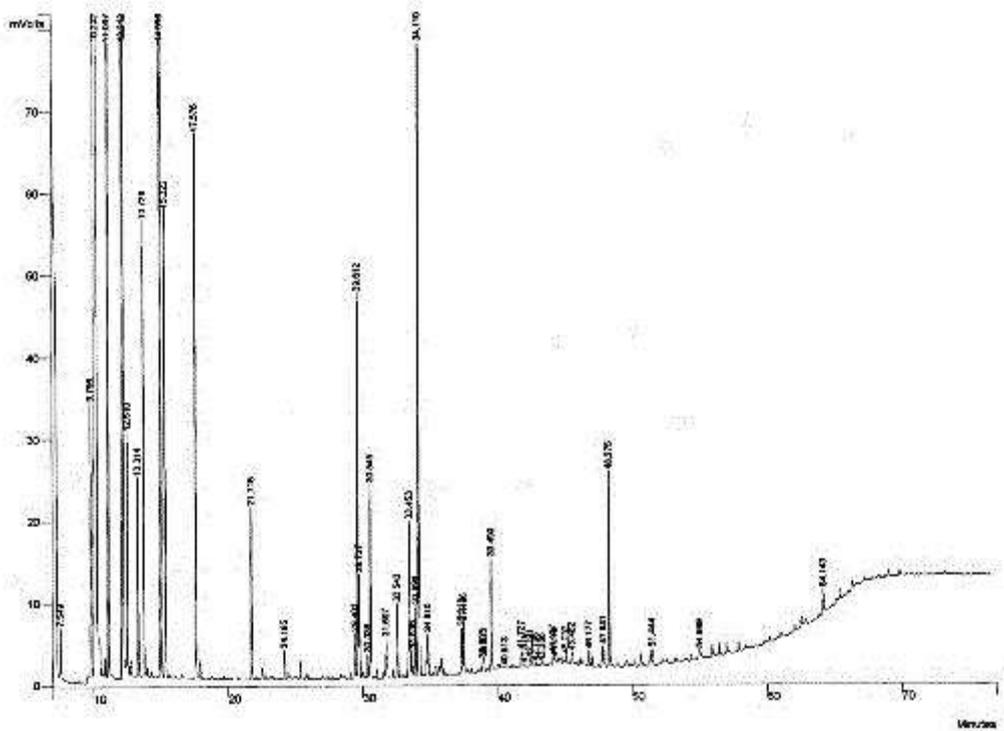
Enfin, les différences entre les chemotypes devraient avoir, probablement, une influence sur les activités biologiques de ces huiles essentielles ; par conséquent, les études futures à mener sur leurs activités biologiques devraient prendre en considération le facteur chemotype.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, J. F.; Akssira, M.; Mellouki, F.; Belgarrabe, A. & Blazquez, M. A. (2005). Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 17(1), 52-54.
- Benhassaini, Hachemi; Bendeddouche, Fatima Z; Mehdadi, Zoheir & Romane, Abderrahmane. (2008). GC/MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* Desf. subsp *atlantica* from Algeria. *Natural Product Communications*, 3(6), 929-932.
- Carée, P. (1953). *Précis de technologie et de chimie industrielle* (Vol. T3): Edit. Ballière JB. et fils., 250p.
- Delazar, A.; Nazemieh, H.; Modaresi, Masoud & Afshar, J. (2003). Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*.
- Flamini, G.; Bader, A.; Cioni, P.L.; Katbeh-Bader, A. & Morelli, I. (2004). Composition of the essential oil of leaves, galls, and ripe and unripe fruits of jordanian *Pistacia palaestina* Boiss. *J. Agric. Food Chem.*, 52(3), 572-576.
- Gourine, N.; Yousfi, M.; Bombarda, I.; Nadjemi, B.; Stocker, P. & Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops Products*, 31, 203-208.
- Gourine, Nadhir; Sifi, Ibrahim; Gaydou, Emile M. & Yousfi, Mohamed (2011). Chemical composition of the essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Natural Products Journal*, 1, 125-127.
- Hamdan, I. I. & Afifi, F. U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 117-121.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*, 18(6), 435-448.
- Martinez, J-JI. (2008). Impact of a gall-inducing aphid on *Pistacia atlantica* Desf. trees. *Arthropod-Plant Interactions*, 2(3), 147-151.
- Mecherara-Idjeri, S.; Hassani, A.; Castola, V. & Casanova, J. (2008). Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 20(3), 215-219.
- Sifi, I.; Gourine, N.; Gaydou, E. M. & Yousfi, M. (2015). Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Nat Prod Res*, 29(20), 1945-1949.
- Takhi, D.; Ouinten, M. & Yousfi, M. (2011). Study of antimicrobial activity of secondary metabolites extracted from spontaneous plants from the area of Laghouat, Algeria. *Adv. Environ. Biol.*, 5(2), 469-475.
- Tufféry, S. (2005). *Data mining et statistique décisionnelle*: Eds. Technip, Paris, 93-99p.
- Tzakou, Olga; Bazos, Ioannis & Yannitsaros, Artemios. (2007). Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and fragrance journal*, 22(5), 358-362.
- Yoram, G. & Moshe, I. (2011). Distinct antimicrobial activities in aphid galls on *Pistacia atlantica*. *Plant signaling & behaviour*, 6, 2008-2012.



Chromatogramme de l'huile essentielle des galles de *Pistaciaatlantica* d'échantillon d'*Ain-Oussera*



Chromatogramme de l'huile essentielle des galles de *Pistaciaatlantica* d'échantillon de *Laghouat*

CHAPITRE 4 :

Activité Biologiques des huiles Essentielles

(Activité antimicrobienne, Antioxydante, anti-inflammatoire, Cytotoxicité)

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUCTION..... | 71 |
| 2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE..... | 72 |
| 2.1. EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 73 |
| 2.2. EVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 74 |
| 2.3. SOUCHES MICROBIENNES UTILISES DANS CETTE ETUDE | 75 |
| 3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE..... | 77 |
| 3.1. PROTECTION CONTRE LE STRESS OXYDATIF..... | 78 |
| 3.2. EVALUATION QUALITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 82 |
| 3.3. EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 82 |
| 4. ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE..... | 83 |
| 4.1. MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION | 83 |
| 4.2. ESPECES OXYDATIVES COMME MEDiateUR INFLAMMATOIRE..... | 85 |
| 4.3. PLANTE PHYTOCHIMIQUES COMME AGENTS ANTI-INFLAMMATOIRES | 86 |
| 4.4. MECANISMES DE MODELES DE TEST ANTI-INFLAMMATOIRES..... | 86 |
| 5. MATERIEL ET METHODES..... | 87 |
| 5.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE..... | 87 |
| 5.2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE..... | 92 |
| 5.3. ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE..... | 95 |
| 5.4. ACTIVITE DE CYTOTOXICITE CELLULAIRE IN-VITRO (TEST MTT) | 98 |
| 5.5. ANALYSE STATISTIQUE..... | 100 |
| 6. RESULTATS ET DISCUSSION..... | 101 |
| 6.1. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 101 |
| 6.2. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 113 |
| 6.3. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE | 120 |
| 6.4. RESULTATS DE L'CYTOTOXICITE CELLULAIRE | 128 |
| 7. CONCLUSION..... | 134 |
| 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 135 |

1. INTRODUCTION

Un nombre important d'huiles essentielles ont été extraites, analysées et leurs principaux composants identifiés, caractérisés et ensuite publiés, sans tests biologiques (Lahlou, 2004). Cependant, récemment, des travaux ont rapporté une large gamme d'applications des huiles essentielles et de leurs composants dans les industries de la parfumerie, la conservation, arôme alimentaire et autres. Par conséquent, une attention considérable a été portée aux diverses activités biologiques des produits naturels (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Par ailleurs il a été prouvé que les huiles essentielles et/ou certains de leurs constituants sont efficaces contre une grande variété d'organismes ; y compris les bactéries (Baser *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2006) et les champignons (Pawar & Thaker, 2006; Soylu *et al.*, 2006)

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits végétales a constitué la base de nombreuses applications telles que la conservation des aliments et des produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles (Cosentino *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 2008).

La capacité cytotoxique des huiles essentielles, sur la base d'une activité pro-oxydante, peut en faire d'excellents agents antiseptiques et antimicrobiens pour des usages personnels, tels que la purification de l'air, l'hygiène corporelle, la consommation par voie orale ou la préservation des cultures et des stocks alimentaires (effet insecticide) (Bakkali *et al.*, 2008).

C'est pour ces raisons, que des études en cours visent la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, soit par la conception et la synthèse ou bien la recherche de sources naturelles d'agents antimicrobiens originaux (Cock, 2008).

2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

En raison de l'effet secondaire des produits chimiques antimicrobiens et de la résistance que les micro-organismes pathogènes développent contre les antibiotiques, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits de plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives, une alternative pour le traitement de maladies infectieuses (Yakhlef *et al.*, 2011).

Des plantes et leurs extraits ont été utilisés par les populations rurales pour le traitement des maladies infectieuses, pendant des siècles. Vue la composition complexe et diversifiée d'extraits de plantes, leur utilisation comme agents antimicrobiens présente un faible risque de développement de la résistance ; adaptation microbienne très difficile.

Les mécanismes d'action des extraits de plantes utilisés pour inhiber la croissance des microorganismes sont très variés et peuvent être dus, en partie, au caractère hydrophobe de certains composants des extraits végétaux (Nascimento *et al.*, 2000). De nombreuses techniques, différentes, ont été appliquées pour élucider le mode d'action des huiles essentielles et de leurs constituants (Hyldgaard *et al.*, 2012). Les approches expérimentales du mode d'action antimicrobiennes plus courantes ont été présentées dans le *Chapitre (2) Section (5.2)*.

Les tests d'activité antimicrobienne peuvent être classés en (1) la méthode de diffusion, (2) la dilution et (3) la méthode bioautographique (Figure 17). Les principes et la pratique de ces méthodes d'essai sont décrites dans la littérature (Rios *et al.*, 1988), mais il semblerait qu'aucun test de normalisation n'a été mis au point pour évaluer l'activité antibactérienne potentielle contre les micro-organismes liés à l'alimentation (Burt, 2004).

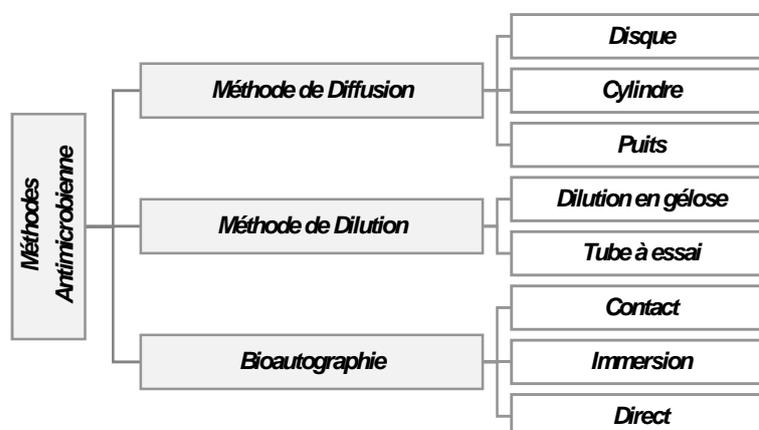


Figure 17 : Classification des méthodes antimicrobienne (Choma & Grzelak, 2011)

2.1. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne

Les méthodes antimicrobiennes quantitatives les plus communément utilisées dans l'évaluation de l'activité d'extraits de plantes sont le test de diffusion sur gélose (Greenwood, 1989) et le dosage de micro-dilutions en série (Eloff, 1998). La sensibilité des deux protocoles et leurs mécanismes varient considérablement.

Méthode de diffusion

Dans la méthode de diffusion, un test d'évaluation de la sensibilité aux agents antimicrobiens, il est fréquemment utilisée des substances pures, de préférence polaires (Steward *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2000).

Dans cette technique, les disques de papier-filtre (de diamètre d'environ 6 mm), contenant le composé à tester, sont placés sur la surface de la gélose, préalablementensemencée avec les microorganismes d'essai. L'agent antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance des microorganismes testés. Les boîtes de Pétri sont mises à incuberet les diamètres des zones d'inhibition de croissance sont mesurés. Une procédure similaire est réalisée dans l'*E*-test, où des bandes sont utilisées à la place des disques (Kelly *et al.*, 1999). En revanche, la méthode de diffusion en puits ou en cylindre consiste à confectionner un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'un extrait de concentration connue. Elle assure une diffusion radiale de l'extrait à partir du puits ; ce qui délimite une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (Dorman & Deans, 2000). Certains essais, de diffusion sur gélose, peuvent parfois conduire à un résultat faussement négatif, en raison de l'influence du type d'agar, de la concentration en sel, de la taille moléculaire des composants antimicrobiens, de la température d'incubation et de la diffusion limitée de composants bioactifs apolaires, dans un milieu agar (Greenwood, 1989).

Méthode de dilution

Dans cette technique, on procède à l'incubation d'un milieu de culture avec une dilution de doses croissantes de l'extrait à tester. Ce procédé nous permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices, "CMI", par contact direct en milieu gélosé ou liquide. Il consiste à disperser la solution de l'extrait en concentrations variables de façon homogène et stable dans le milieu de culture en présence d'un germe test. Cette méthode, reproductible, est très fiable pour les substances antimicrobiennes hydrosolubles.

Cependant, pour les composés présentant une faible solubilité, dans les milieux de culture, l'utilisation d'émulsifiants ou de solvants, comme l'éthanol, est nécessaire.

A cause des problèmes techniques associés à la méthode de diffusion, une technique de micro-dilution a été développée, par **Eloff (1998)**, à l'aide de microplaques de 96 puits contenant des sels de *tétrazolium* pour détecter la croissance bactérienne. Cette méthode, rapide, est bien adaptée pour l'étude d'extraits non aqueux de nombreuses plantes sur des souches bactériennes pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**Ahmad et al., 2006**).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration d'extrait de plante qui inhibe toute croissance visible d'une culture bactérienne après une incubation à 37°C, pendant 24 heures. La valeur de la CMI caractérise l'effet *bactériostatique* d'un extrait. Quant à la concentration minimale bactéricide (CMB), c'est la plus petite concentration d'antibiotique laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial, après 24 heures de culture à 37°C ; ce qui caractérise l'effet *bactéricide* d'un extrait (**Archambaud, 2001**). La CMI et CMB sont déterminées par la plupart des chercheurs pour mesurer la performance antibactérienne de molécules bioactives.

2.2. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

Bioautographie

La bioautographie est une méthode d'analyse par chromatographie planaire associée aux méthodes de détection biologique. C'est une technique efficace et peu coûteuse. Elle est utilisée pour l'analyse phytochimique et l'identification de molécules bioactives d'extraits de plantes (**Dewanjee et al., 2015**).

Il s'agit d'un test direct de bio-activité, réalisé sur des plaques de CCM, développé comme un moyen de localisation de l'activité biologique telle que l'inhibition de la croissance microbienne, l'inhibition enzymatique ou bien la détermination des propriétés antioxydantes d'extraits au composé actif particulier. Elle met en relief les éléments pertinents d'un extrait (**Saxena et al., 1995**). Le fractionnement des extraits de plantes médicinales combiné à la bioautographie fournit une méthode plus efficace que l'isolement guidé des composés cibles bioactifs (**Hostettmann et al., 1997**). L'application pratique de la bioautographie en isolement guidé des molécules actives comprend le test d'inhibition

enzymatique (la méthode *Ellman*, 1961) pour les inhibiteurs du cholinestérase. Dans ce procédé, la plaque de CCM développée est pulvérisée avec un substrat, un enzyme et l'indicateur pour déterminer l'inhibition par la variation de couleur (zone blanche sur fond jaune) (**Rhee et al., 2001**).

2.3. Souches microbiennes utilisées dans cette étude

Les microorganismes choisis pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, dans cette étude, sont des agents pathogènes de l'homme et d'animaux. Certains sont des opportunistes et des entéropathogènes couramment rencontrés (*Escherichia coli*, par exemple). Quant aux souches pathogènes, elles sont impliquées dans l'apparition de maladies ou de symptômes graves, tels que la diarrhée, la rectocolite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (**Bell & Kyriakides, 1998**).

Salmonella typhimurium est une bactérie flagellée Gram négative pouvant causer des maladies graves telles que la gastro-entérite et la typhoïde (**Mathur et al., 2012**). Cette bactérie peut être transmise par voie fécale-orale ; elle est excrétée par l'homme dans les selles et peut être, aussi, transmise dans l'eau contaminée, la nourriture, ou par contact, de personne à personne (**Randi, 2012**).

Staphylococcus aureus, une bactérie à Gram positive, provoque la mammite, le syndrome de choc toxique (*Toxic Shock Syndrome* "TSS") et l'intoxication alimentaire (*Staphylococcal Food-Poisoning* "SFP"), chez l'homme et l'animal.

Les symptômes de SFP causés par l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines staphylococciques thermostables (fixe) comprennent des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et de la diarrhée (**Rosengren et al., 2010**). Le microbe a également été impliqué dans l'apparition de l'infection de la peau telle que les furoncles, l'abcès et le sepsis des plaies.

Bacillus cereus est une bactérie Gram positive mobile, aéro-anaérobie facultative. Elle est facilement propagée dans de nombreux types d'aliments, mais fréquemment isolée à partir de la viande, des œufs et des produits laitiers. L'espèce *Bacillus cereus* fait partie des agents pathogènes. Elle peut causer des intoxications alimentaires de différents types, émétique et diarrhéique. Le type diarrhéique est, très probablement, causé par des entérotoxines, produites par *Bacillus cereus*, pendant la croissance végétative dans l'intestin grêle (**Tham & Danielsson-Tham, 2013**).

Candida albicans est l'un des champignons opportunistes qui peuvent infecter la bouche, la peau, l'intestin ou le vagin. L'augmentation rapide des maladies associées à l'infection fongique, comme la candidose, serait liée à l'augmentation du taux d'infection par le VIH (Shai *et al.*, 2008).

Cryptococcus neoformans est un champignon pathogène (levure) opportuniste de l'environnement. Il est responsable d'infections graves, chez les patients immunodéprimés. Il provoque des maladies, dans tous les organes du corps humain, après la diffusion dans les poumons à d'autres organes par le biais de la circulation sanguine. Ces maladies comprennent la méningo-encéphalite du système nerveux central, la cryptococcose cérébrale, la pneumonie et la cryptococcose colique (Vecchiarelli & Monari, 2012).

Mycobacterium spp sont des bacilles Gram positive, largement répandus dans l'environnement. Ces bactéries sont très diversifiées dans leur biologie et leur importance clinique. La plupart d'entre elles semblent être saprophytes colonisant l'eau et le sol. D'autres sont des agents pathogènes importants pour l'homme et les animaux. L'espèce la plus importante est *Mycobacterium tuberculosis*. Ces mycobactéries représentent des agents infectieux de la tuberculose, l'un des grands soucis en médecine (Belyi, 1996).

3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le revêtement de la muqueuse intestinale est constamment exposé aux oxydants et aux toxines, provenant de l'alimentation, ainsi qu'aux radicaux libres endogènes et autres espèces hautement réactives, appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives de l'azote (RNS). Ces espèces réactives sont produites de façon endogène, dans le corps, par des processus biochimiques de base, au cours de la respiration (**Stojiljkovi et al., 2009**) et, aussi, en réponse à certaines fonctions immunitaires à médiation cellulaire (les neutrophiles activés et les macrophages), en réponse à une infection microbienne (**Neish, 2009**).

Les sources enzymatiques des ROS et des RNS sont le NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique (NO) endothéliale synthase, les enzymes de la chaîne de respiration mitochondriale et les enzymes métabolisant l'acide arachidonique, tels que le cytochrome P-450, la lipoxygénase et la cyclooxygénase (**Griendling, 2005; Mueller et al., 2005**). Les radicaux libres tels que le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyle (OH^{\bullet}), le peroxyde (ROO^{\bullet}), et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ainsi que certains dérivés non-radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux (HClO) sont produits dans l'organisme vivant. En outre l'exposition aux rayonnements ionisants, la fumée et les toxines peuvent, également, générer des radicaux libres (**Li & Trush, 1994**).

Le stress oxydatif constitue un mécanisme résultant de l'augmentation des dommages oxydatifs dans de nombreux types de processus de maladies. Il résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des espèces réactives de l'azote (RNS) et les systèmes de défense antioxydants dans le corps. Dans certaines conditions physiopathologiques, telle que dans l'infection due au VIH, cela peut être causé par la surproduction d'espèces réactives ou l'affaiblissement du système de défense antioxydant endogène (**Gil et al., 2003**).

La production de ROS et RNS ont été impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies humaines et animales telles que l'athérosclérose, le diabète sucré, l'inflammation chronique, les troubles neurodégénératifs, des troubles gastro-intestinaux ainsi que certains types de cancer (**Catalá, 2006**). Les réactions nocives au cours de la production des radicaux libres dans le système biologique sont présentées dans la Figure 18.

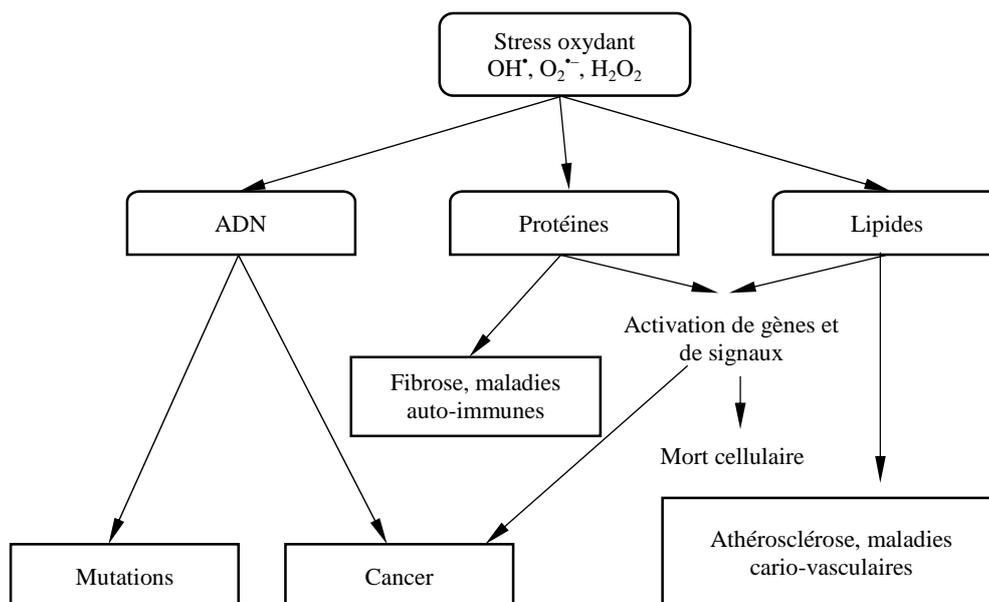


Figure 18 : Conséquences de l'oxydation des biopolymères (Houée-Levin *et al.*, 2005)

3.1. Protection contre le stress oxydatif

Les radicaux libres peuvent être efficacement éliminés par décomposition, à l'aide d'antioxydants, naturels ou synthétiques (Rice-evans *et al.*, 1995). Un antioxydant biologique a été défini comme étant toute substance qui retarde ou empêche l'oxydation de d'un substrat, de manière significative, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles, par rapport à celles du substrat oxydable. (Halliwell & Gutteridge, 1995). En d'autres termes, les antioxydants sont des agents chimiques et biologiques qui, en faibles concentrations, peuvent protéger les biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides insaturés et sucres) de la dégradation oxydante, et plus particulièrement des espèces oxygénées réactives (par exemple les radicaux hydroxyles) (Dangles *et al.*, 1999). L'organisme, grâce aux mécanismes de défense endogènes et exogènes, se protège en permanence contre la formation et l'agression par des agents oxydants ; avec une prépondérance pour les agents enzymatiques.

Dans les conditions dites « physiologiques », il y a équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes endogènes de défenses antioxydantes. Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (*superoxydedismutase* ou SOD, *catalase*, *gluthationperoxydase* ou Gpx), ainsi que des molécules antiradicalaires

("scavengers"), qui piègent les radicaux libres (vitamines antioxydantes A, C, E), thiols et -carotène)(Vouldoukis *et al.*, 2004).

3.1.1. Défense enzymatique

Superoxyde dismutase (SOD)

Le rôle déterminant de la superoxyde dismutase (SOD) dans les systèmes de défenses antioxydantes de l'organisme est connu depuis 1968. On sait que l'ion superoxyde (O_2^-) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade, précoce, la superoxyde dismutase inactive l'ion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite, rapidement, catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O) (Figure 19). Ainsi, différentes études ont confirmé que la production de H_2O_2 sous l'action de la SOD était bien le facteur déclenchant des mécanismes naturels de défenses antioxydantes. La SOD apparaît donc comme l'enzyme clé de la défense naturelle contre les radicaux libres(Menvielle-Bourg, 2005).

Catalase

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est éliminé par le catalase, qui catalyse sa dismutation en simple molécule d'eau (H_2O). Elle est principalement présente dans les peroxysomes de diverses cellules, dans les plaquettes et le stroma des érythrocytes(Houée-Levin *et al.*, 2005).

Glutathion peroxydase (GPx)

Le GPx élimine le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mais, aussi, tous les peroxydes lipidiques ROO^* (où R représente un acide gras polyinsaturé)(Houée-Levin *et al.*, 2005). Il s'agit d'un enzyme à sélénium (Se-GPx) utilisant le glutathion réduit (GSH), comme cofacteur. Il est localisé dans le cytosol et les mitochondries des cellules.

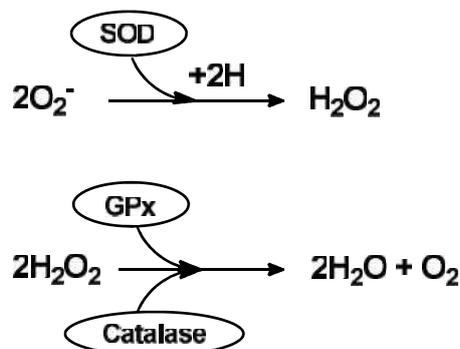


Figure 19 : Rôle des enzymes antioxydants dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde

3.1.2. Défense non enzymatique

La vitamine E (-tocophérol)

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (*alpha, beta, gamma, delta*) (Figure 20). Le caractère hydrophobe de la Vitamine E lui permet de s'insérer dans les acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines. Les tocophérols sont des antioxydants largement utilisés comme additifs alimentaires efficaces, soluble dans la graisse. Ce sont des inhibiteurs des réactions d'oxydation ; ce qui démontre leur efficacité contre la peroxydation lipidique et d'autres situations oxydatives causées par la présence de radicaux libres(**Barbosa-Pereira et al., 2013**).

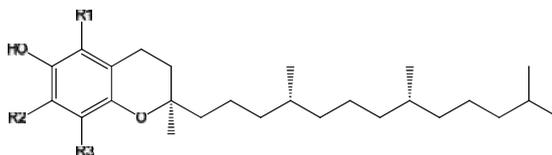


Figure 20 : Structure chimique de tocophérols

La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. C'est un excellent piègeur des espèces oxygénées activées (ROS) qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Il peut réduire le risque d'artériosclérose, les maladies cardio-vasculaires et certaines formes de cancer(**Rekha et al., 2012**).

Le - carotène

Outre l'activité pro-vitaminique A, le -carotène possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Une molécule de -carotène (Figure 21) est capable de piéger jusqu'à 250 molécules de $^1\text{O}_2$ (**Foote & Denny, 1968**). Le -carotène est présent dans les légumes verts, les épinards, les carottes, la papaye et d'autres fruits jaunes. Des études récentes suggèrent un manque de dommages secondaires causés par l'utilisation du -carotène, pendant la radiothérapie contre le cancer de la prostate(**Margalit et al., 2012**).

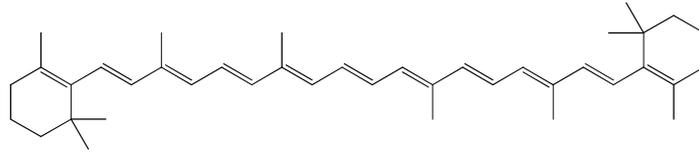


Figure 21 : Structure chimique du β -carotène

3.2. Evaluation qualitative de l'activité antioxydante

Les méthodes qualitatives utilisées pour repérer l'activité antioxydante de divers composés sont relativement peu nombreuses. Elles font intervenir, en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique, en présence d'agents antioxydants. Une de ces méthodes est la chromatographie sur couche mince (CCM) (Peiwu *et al.*, 1999).

Le criblage antiradicalaire par chromatographie sur couche mince (CCM), technique d'autographie, fournit un moyen facile, rapide et efficace pour étudier les profils d'extraits de plantes. Aucun échantillon de purification n'est nécessaire car cette technique fournit, simultanément, une séparation et une mesure d'activité de piégeage de radicaux libres de composés antioxydants de l'extrait de plante (Badarinath *et al.*, 2010).

3.3. Evaluation quantitative de l'activité antioxydante

Il existe beaucoup de méthodes pouvant être appliquées pour l'estimation directe de l'activité antioxydante. La production d'un radical libre est directement liée à l'oxydation, dans les denrées alimentaires et dans les systèmes biologiques. Les principales méthodes comportent le balayage des radicaux de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le balayage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le balayage d'acide hypochloreux (HOCl), le balayage du radical d'hydroxyle (OH^{\bullet}) ou le balayage du radical de peroxyde (ROO^{\bullet}) (Sánchez-Moreno, 2002).

Certaines méthodes emploient l'azo-composant pour produire des radicaux de peroxydes. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer la méthode d'ORAC (*capacité d'absorbance du radical de l'oxygène*) (Cao *et al.*, 1993), la méthode d'ABTS (le balayage du radical cation 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (Re *et al.*, 1999), le balayage du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (la méthode du radical DPPH $^{\bullet}$) (Blois, 1958; Molyneux, 2004), la méthode de Photochemiluminescence (PLC) (Lewin *et al.*, 2000) et la méthode de réduction du Fer et le (TPTZ)2,3,5-triphényl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride (la méthode de FRAP) (Benzie & Strain, 1998).

Deux articles de revue (Chanda & Dave, 2009; Badarinath *et al.*, 2010) ont été publiés sur l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante. Ils fournissent des avantages prolifiques aux chercheurs, en réduisant leur temps pour l'examen de la littérature et le développement de la méthode.

4. ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE

L'inflammation est une composante importante de la réponse immunitaire aux agents pathogènes et cellules endommagées. Elle est caractérisée par hausse de température, des rougeurs, des douleurs, un gonflement et, parfois, la perte de fonctionnalité de tissus, dans une situation chronique (**MacNaughton, 2006**). Bien que la réponse inflammatoire est un mécanisme de défense important aux agents nuisibles, une blessure à des cellules saines au niveau de site inflammatoire pourrait également se produire (**Sprague & Khalil, 2009**).

Les systèmes immunitaires cellulaires, y compris celui du tube digestif agissent, en tant que mécanismes de défense, en mobilisant les globules blancs (leucocytes et autres molécules) pour lutter contre les infections et les stimulants nocifs. La réaction du corps à ce phénomène peut déclencher des réactions inflammatoires en libérant des eicosanoïdes pro-inflammatoires, telles que les prostaglandines, les prostacyclines et les leucotriènes (**Nardi et al., 2007**), ainsi que les cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines (IL1, IL3, IL6), les interférons (IFN), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (**Kunkel et al., 1996; Conforti et al., 2008**).

La cyclooxygénase (COX), la lipoxigénase (LOX) et l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI), tels que l'acide arachidonique ou l'acide linoléique formant les eicosanoïdes bioactifs, sont les principales caractéristiques de la réponse inflammatoire (**Haeggström et al., 2010**). La production et la libération d'espèces réactives (ROS/RNS), par les cellules inflammatoires en réponse à des agents pathogènes et des stimuli, sont considérées comme le principal mécanisme antimicrobien dans le corps. Toutefois, la production excessive de ROS/RNS augmente les réponses inflammatoires pouvant conduire au développement des maladies.

4.1. Médiateurs de l'inflammation

Histamine

L'histamine est libérée par les mastocytes et par les voies respiratoires des cellules musculaires lisses contractées. Elle augmente les fuites microvasculaire et la sécrétion de mucus des voies respiratoires et attire d'autres cellules inflammatoires (**Barnes, 1996**). L'histamine contribue donc à la bronchoconstriction et à la réponse inflammatoire dans l'asthme, en provoquant une inflammation directe (**Andriopoulou et al., 1999**) ou indirecte (**Marone et al., 1999**).

Prostaglandines

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques provenant du métabolisme de l'acide arachidonique. Elles sont produites lors d'une inflammation par les enzymes cyclooxygénase (COX) et prostaglandine synthétase. Les prostaglandines sont des molécules lipidiques à forte activité biologique (**Hata & Breyer, 2004**). Elles sont, généralement, considérées comme des médiateurs pro-inflammatoires puissants, comme indiqué par le terme médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens ; utilisé pour décrire les agents pharmacologiques qui bloquent la biosynthèse des prostaglandines. L'enzyme cyclooxygénase existe sous deux formes principales d'isoenzymes (COX-1 et COX-2) qui diffèrent dans la répartition tissulaire et la régulation de l'expression (**Dubois *et al.*, 1998**). La synthèse de prostaglandine a été impliquée dans un large éventail de maladies (le cancer, des inflammations, les maladies cardio-vasculaires et l'hypertension).

Leucotriènes

Les leucotriènes proviennent de l'acide arachidonique (acide gras polyinsaturé). Deux classes de leucotriènes peuvent être distinguées sur la base des voies de synthèse et leurs activités biologiques. Le leucotriène B₄ (LTB₄) est un dérivé dihydroxylé de l'acide arachidonique. Il a été montré comme un médiateur chimiotactique très puissant pour les neutrophiles et les éosinophiles. Les leucotriènes C₄, D₄ et E₄ sont synthétisés à partir d'acide arachidonique : la fixation du tripeptide glutathion donne le LTC₄ ; l'enlèvement ultérieur des résidus d'acide glutamique et de glycine produisant, respectivement, le LTD₄ et le LTE₄. Les leucotriènes sont, aussi, appelés les cystéinyl-leucotriènes. (**Capra *et al.*, 2007**). Les cystéinyl-leucotriènes sont des médiateurs spasmogéniques puissants affectant l'incorporation des cellules inflammatoires, la production de mucus, le remodelage des voies respiratoires et la fuite vasculaire pulmonaire (**Ogawa & Calhoun, 2006**).

Cytokines

Les cytokines jouent un rôle important dans l'organisation de la réponse inflammatoire associée à une inflammation chronique. De nombreuses cellules inflammatoires différentes sont capables de synthétiser et libérer des cytokines. On distingue, à titre d'exemple, les macrophages, les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes. Des cellules structurelles, telles que des cellules épithéliales et endothéliales, peuvent, aussi, libérer un certain nombre de cytokines et, de ce fait, participer à la réponse inflammatoire (**Barnes, 1994**).

D'autres cytokines, libérées à partir des macrophages et des cellules épithéliales, sont importantes dans l'amplification de la réponse inflammatoire. On distingue l'interleukine (IL-1 et IL-6), le facteur de nécrose tumorale- (TNF-) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF). Le TNF- est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle critique dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires (**Russo & Polosa, 2005**).

Facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) est un phospholipide pro-inflammatoire synthétisé et sécrété par les mastocytes, les monocytes et les macrophages tissulaires fixes. Le PAF possède un large éventail d'effets: l'activation des neutrophiles, des macrophages, des éosinophiles et des lymphocytes ; il augmente le pouvoir d'adhérence de la plupart des cellules inflammatoire induisant des lésions et une augmentation de la perméabilité de l'endothélium (**Van de Weerd et al., 1995; Vadas et al., 2008**). Le PAF provoque une inflammation dramatique des voies respiratoires et induit, chez les animaux de laboratoire, les symptômes caractéristiques de l'asthme (**Garrett & Grisham, 2000**).

4.2. Espèces oxydatives comme médiateur inflammatoire

La production d'espèces réactives (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ et OH^{\bullet}), l'oxyde nitrique (NO) et le peroxy-nitrite se produit au niveau du site d'inflammation et contribue à l'aggravation des lésions tissulaires et des maladies inflammatoires. Les espèces oxydatives stimulent la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale- (TNF-). En outre, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par les neutrophiles activés, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages, pendant le processus d'inflammation, entraînent une lésion des tissus en endommageant les macromolécules et affectant la peroxydation lipidique membranaire. Dans les inflammations aiguës ou chroniques, la production d' $O_2^{\bullet-}$ est augmentée. Elle atteint un taux qui dépasse les capacités de défense enzymatique endogène du superoxyde dismutase (SOD). Une réduction de la production d' $O_2^{\bullet-}$ peut diminuer les effets secondaires du radical dans des conditions inflammatoires (**Meier et al., 1989; Sánchez-Alcázar et al., 2003; Hughes et al., 2005**).

L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre gaz synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS), à partir de L-arginine. Il déclenche divers processus physiologiques et pathologiques. Les réponses inflammatoires sont associées à la production de grandes

quantités de NO. Le monoxyde d'azote (NO) constitue un médiateur important dans le processus inflammatoire. Il est produit sur les sites d'inflammation par l'iNOS (inducible NOS). Des niveaux élevés de NO ont été liés à un certain nombre de processus pathologiques (diverses formes d'inflammation, un choc circulatoire et la cancérogenèse). Par conséquent, un inhibiteur de la NOS pourrait être efficace en tant qu'agent thérapeutique pour les maladies inflammatoires (Lee *et al.*, 2007).

4.3. Plante phytochimiques comme agents anti-inflammatoires

Les extraits de plantes sont suspectés de contenir un potentiel composant bioactif qui peut fortement inhiber l'expression de la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase (LOX). Par conséquent, il existe un besoin continu de recherche de nouveaux médicaments à partir de produits naturels présentant des propriétés anti-inflammatoires avec un minimum d'effets secondaires.

Il a été montré que des composés phénoliques, des alcaloïdes et des triterpénoïdes présentent une activité anti-inflammatoire grâce à des propriétés antioxydantes, réduction de l'O₂^{•-} et production du malondialdéhyde (MDA), l'extravasation du plasma et la migration cellulaire, notamment des leucocytes, et potentialisation de l'activité de la SOD dans le piégeage des radicaux (Nardi *et al.*, 2007). Les espèces réactives (ROS/RNS) sont des médiateurs importants. Ils provoquent les processus inflammatoires et, par conséquent, leur désintégration par des antioxydants et le piégeage de radicaux tels que les composés phénoliques (Geronikaki & Gavalas, 2006), les huiles essentielles (thymol et carvacrol) (Peana *et al.*, 2002), peuvent soulager l'inflammation.

4.4. Mécanismes de modèles de test anti-inflammatoires

Le pouvoir anti-inflammatoire a été déterminé par des essais *in vitro* basés sur l'effet inhibiteur sur la biosynthèse des 12(S)-hydroxy-(5Z, 8E, 10E)-heptadecatriénoïque (12-HHT) et 12(S)-hydroxy-(5Z, 8Z, 10E, 14Z)-éicosatétraénoïque (12-HETE). Le 12-HHT et le 12-HETE sont des médiateurs inflammatoires dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique, qui est catalysé par les enzymes de la réponse inflammatoire, la cyclooxygénase (COX-1) et de la lipoxygénase (15-LOX), respectivement. L'avantage de ce type d'expérience est d'éviter l'indésirable test *in vivo* sur des animaux de laboratoire, car le test couramment utilisé pour détecter l'activité anti-inflammatoire est le carraghénane induit un œdème de la patte chez le rat.

5. MATERIEL ET METHODES

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du *laboratoire de microbiologie, Département de Biologie, Université de Laghouat* – (Algérie), avec la collaboration de *Phytomedicine Programme, Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria* – (Afrique de sud).

5.1. Activité antimicrobienne

Deux types de microorganismes ont été choisis pour les tests d'activités antimicrobiennes : des souches bactériennes, d'une part, et des champignons, d'autre part. Ces agents microbiens étudiés sont pathogènes de l'homme et d'animaux.

5.1.1. Source des souches microbiennes

L'huile essentielle des galls de *Pistacia atlantica* a été testée sur onze (11) souches microbiennes, dont deux Gram négative (*Escherichia coli* ATCC®25922 et *Salmonella typhimurium* ATCC®14028), deux Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC®25923 et *Bacillus cereus* ATCC®11778), quatre levures cliniquement pathogènes (*Candida albicans* ATCC®24433, *Candida albicans* ATCC®18804, un isolat de *Candida tropicalis* et un isolat *Cryptococcus neoformans*), et trois mycobactéries (*Mycobacterium smegmatis* ATCC®1441, *Mycobacterium aurum* ATCC®23366 and *Mycobacterium fortuitum* ATCC®6841).

Les bactéries nous ont été fournies par le *Laboratoire Régional Vétérinaire de Laghouat (LRVL, Algérie)*. Les levures et les mycobactéries ont été obtenues du *Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria* Afrique du Sud.

5.1.2. Pré-culture des souches microbiennes

Pour chaque microorganisme, 10 ml de milieu de culture stérile, fraîchement préparé (Bouillon nutritif, pour les bactéries, et Bouillon Sabouraud, pour les levures) ont été inoculés à partir d'une colonie bien isolée, dans une culture de 24 heures.

Après 18 à 24 heures d'incubation, quelques gouttes de cette culture ont été diluées dans 10ml d'eau physiologique stérile puis le tout a été homogénéisé au Vortex. L'inoculum est ajusté à 0,5 MacFarland (**Lahlou, 2004**) ; ce qui correspond à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm, l'équivalent de 10^8 UFC/ml.

Les mycobactéries ont été cultivées selon le protocole décrit par McGaw *et al.* (2008) : les souches ont été maintenues sur Löwenstein-Jensen gélose incliné, additionné du glycérol. La suspension d'inoculum a été préparée en prélevant quelques colonies microbiennes dans de l'eau distillée stérile. La suspension a été diluée, pour obtenir une concentration de 1 McFarland (4×10^7 UFC/ml), puis on additionne du bouillon Middlebrook 7H9 fraîchement préparé et on complète avec du milieu OADC 10% pour obtenir une densité d'inoculum finale d'environ 4×10^5 UFC/ml.

Dans l'ensemble de notre travail, la préparation de l'inoculum a été réalisée 15 minutes avant l'ensemencement, afin d'assurer la fraîcheur de la culture.

5.1.3. Méthode des disques (Aromatogramme)

L'activité antimicrobienne des différentes huiles essentielles testées a été évaluée avec la méthode de diffusion, rapportée par Remmal *et al.* (1993). Nous avons adopté cette technique, en raison de sa large utilisation. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles dans un milieu nutritif solide coulé en boîtes de Pétri (Figure 22).

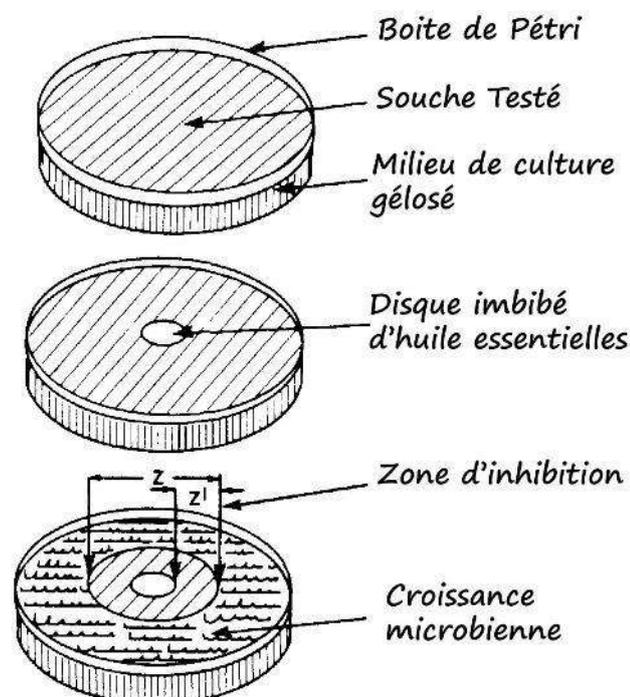


Figure 22 : Schéma représente la méthode d'antibiogramme (Zaika, 1988)

Mode opératoire

Du milieu de culture gélosé Muller-Hinton (M-H) maintenu en surfusion est coulé dans des boîtes de pétri (avant chaque essai). Une suspension de chaque souche est préparée dans de l'eau physiologique stérile et ajustée à 10^8 UFC/ml. L'ensemencement est fait par écouvillonnage et la boîte est tournée 3 fois d'un angle de 60° pour assurer une homogénéité du tapis bactérien. Des disques de papier Whatman (N°3) stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur le milieu de culture (3 disques par boîte de Petri de 9 cm de diamètre), chaque disque est imprégné de $10\mu\text{L}$ d'huile essentielle diluée dans du DMSO. Et, en nous basant sur les travaux de **Lahlou (2004)**, nous avons choisi deux dilutions ($\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$). Ces boîtes de Petri sont, ensuite, mises en incubation, à l'étuve, à 37°C , pendant 24 heures. Au terme de ces délais, nous avons noté les résultats qui sont exprimés en trois niveaux d'activité (**Billerbeck, 2007**) :

- Résistant : Diamètre de zone d'inhibition < 6 mm
- Intermédiaire : 6mm Diamètre de zone d'inhibition 13 mm
- Sensible : Diamètre de zone d'inhibition > 13 mm

5.1.4. Méthode micro-atmosphère

Le protocole des micro-atmosphères est techniquement proche de celui des aromagrammes. Cette méthode, en boîte de Pétri, constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils. Elle consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle ($25\mu\text{l}$ et $50\mu\text{l}$) à tester au centre du couvercle d'une boîte de Pétri, sans que l'huile n'entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes (testé sur le *Candida albicans* seulement) (Figure 23).

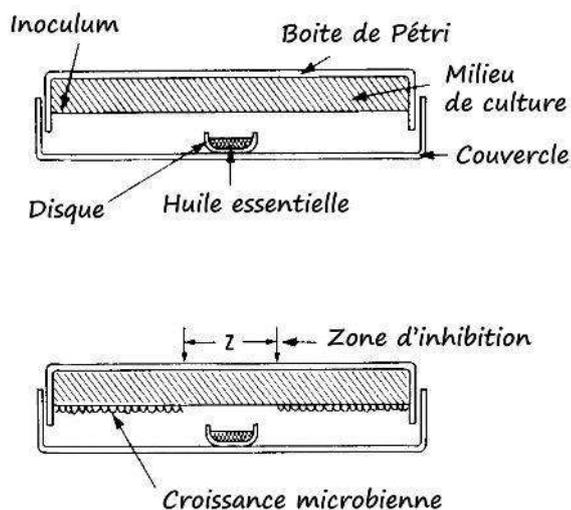


Figure 23 : Schéma récapitulatif illustrant la méthode micro-atmosphère(Zaika, 1988)

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles. Elle montre seulement la sensibilité du microorganisme présent aux constituants volatils, à la température d'incubation.

5.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour l'obtention des valeurs de CMI, de nos échantillons d'huile essentielle, nous avons utilisé la technique de microdilution en bouillon sur des microplaques à 96 puits (Figure 24) tel que décrit par Eloff (1998).

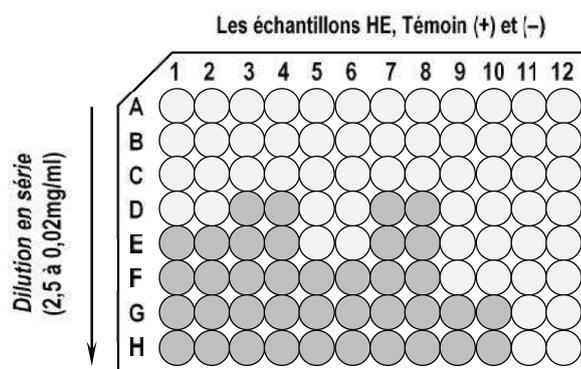


Figure 24 : Schéma illustrant la méthode de microdilution sur une microplaque à 96 puits

Mode opératoire

Cent microlitres, de chaque échantillon d'huile essentielle à une concentration initiale de 10 mg/ml (préparé dans du DMSO 5%), ont été dilués en série en deux essais dans des microplaques à 96 puits, avec des volumes égaux de bouillon (MH pour les bactéries, Sabouraud pour les levures et Middlebrook 7H9 pour les mycobactéries).

Ensuite, 100 μ l d'inoculum a été ajouté dans chaque puits pour donner une concentration finale variant de 0,02 à 2,5 mg/ml. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures et 72 heures pour les mycobactéries, respectivement, à 37 °C.

Pour indiquer la croissance bactérienne, 40 μ l de *p-iodonitrotétrazolium* (INT) à 0,2 mg/ml ont été ajoutés à chaque puits, après incubation. Les plaques ont été incubées une seconde fois à 37°C, pendant 1 heure. La CMI est définie comme étant la plus faible

concentration où il n'y a pas de changement de couleur de l'INT (jaune à rouge).
L'expérience a été réalisée trois fois.

5.2. Activité antioxydante

5.2.1. Test de piégeage de radical libre DPPH[•]

La mise en évidence de l'activité antioxydante a été évaluée par une méthode indirecte. C'est la méthode de DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl). Cette méthode a été mise au point par **Brand-Williams *et al.* (1995)** et modifiée, plus tard, par **Sánchez-Moreno *et al.* (1998)**. C'est la méthode la plus utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits de plantes. La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH[•] en présence d'un donneur d'hydrogène H[•] (le cas d'un antioxydant). La solution de DPPH[•] montre une forte bande d'absorption à 517nm, avec une couleur violet foncé et qui se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure 25). La décoloration qui en résulte est stœchiométrique ; elle concerne le degré de réduction. Le DPPH[•] restant, mesuré après un certain temps, correspond inversement à l'activité de piégeage des radicaux libres par l'antioxydant (**Molyneux, 2004**).

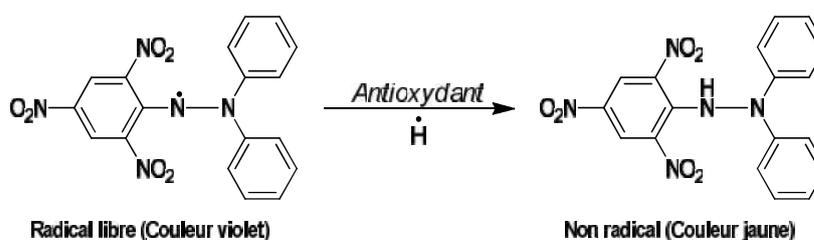


Figure 25 : Réduction du radical libre DPPH[•]

Mode opératoire

Quarante microlitre (40µl) des échantillons préparés en méthanol à différentes concentrations (de 15,62 à 2000 µg/ml) ont été ajoutés à 160µL de DPPH (0,1mM en méthanol) dans une microplaque de 96 puits. Ensuite, le changement d'absorbance (517nm) a été mesuré après 30min par le biais d'un lecteur de microplaques (Epoch; BioTek® Instruments). Le pourcentage (%) d'inhibition des radicaux libres de DPPH[•] est calculé en utilisant la relation suivante :

$$DPPH - scavenging\ effect\ (\%) = \left[1 - \frac{A_{échan}}{A_{témoin}} \right] \times 100$$

$A_{échan}$: Absorbance de la solution de DPPH[•] en présence de l'HE,

$A_{témoin}$: Absorbance de la solution de DPPH[•] en absence de l'HE

Les valeurs des EC₅₀ (µg/ml) sont déterminées sur la courbe $I\% = f(C_{HE})$. elles représentent les concentrations d'huiles essentielles qui neutralisent 50% des radicaux libres (DPPH[•]). Le Trolox, BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme contrôles positifs.

5.2.2. Test de piégeage du radical cation ABTS^{•+}

L'activité antioxydante, la mesure de la capacité de donner de l'hydrogène, est déterminée en utilisant la méthode de décoloration du cation ABTS^{•+} décrite par **Re et al. (1999)** avec modification.

Ce test est basé sur la réaction entre un radical cationique stable ABTS^{•+} (2,2-azinobis-(3-éthyl benzothiazoline-6-sulfonic acide) (générateur de radicaux libres) et une substance donneuse de protonsse produisant, immédiatement, après l'ajout d'une solution de persulfate de potassium K₂S₂O₈. Ce radical cation ABTS^{•+} est un chromogène stable (couleur bleu) à température ambiante (Figure 26). Il peut être mesuré dans un spectromètre à $\lambda = 734$ nm.

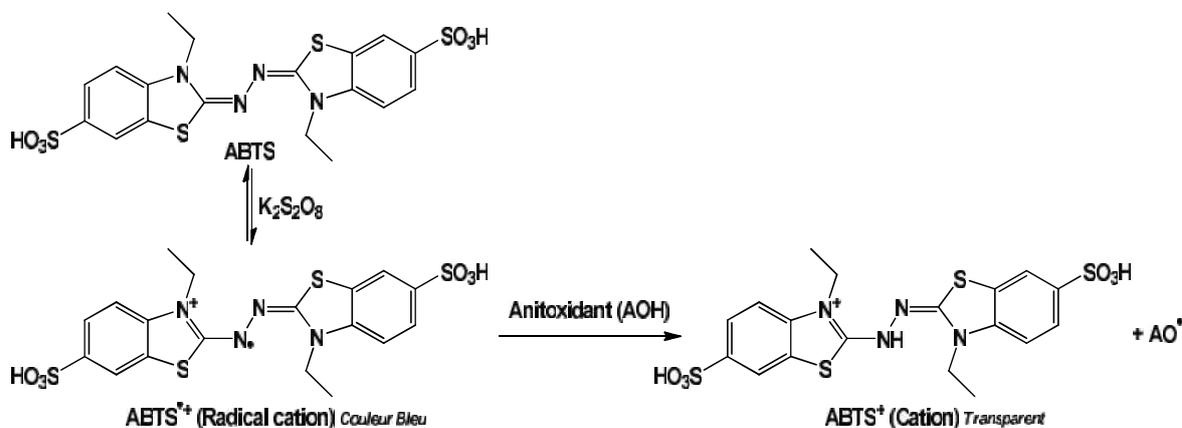


Figure 26 : Réduction du radical cationique ABTS^{•+}

Mode opératoire

Pour préparer le radical ABTS^{•+} nous avons ajouté 7mM de ABTS^{•+} à 2,45mM de persulfate de potassium. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante, pendant 24 heures. Une série de dilutions (de 2000 à 15,62µg/ml), avec du méthanol, d'un volume 40µl, ont été réalisées dans une microplaque de 96 puits. Nous y avons ajouté 160µl d'une solution d'ABTS^{•+} (Absorbance 0,7). Le mélange est incubé pendant 6 minutes, à l'obscurité. Ensuite, l'absorbance a été mesurée contre le blanc à 734nm, avec un lecteur de microplaques (Epoch; BioTek® Instruments). La capacité de piégeage du radical ABTS^{•+} a été calculée en utilisant la formule ci-après :

$$ABTS - scavenging \text{ effect } (\%) = \left[1 - \frac{A_{échan}}{A_{témoin}} \right] \times 100$$

$A_{échan}$: Absorbance de la solution de ABTS^{•+} en présence de l'HE,
 $A_{témoin}$: Absorbance de la solution de ABTS^{•+} en absence de l'HE

Les valeurs EC_{50} sont déterminées (en $\mu\text{g/ml}$) par la courbe $I\% = f(C_{HE})$, qui représentent les concentrations d'huiles essentielles à 50% de neutralisation des radicaux libres ($ABTS^{\bullet+}$). Le Trolox, BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme contrôles positifs.

5.2.3. Test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Le pouvoir réducteur des échantillons d'huiles essentielles a été mesurée par la méthode FRAP, en utilisant du tripyridyltriazine (TPTZ), tel que décrit par **Benzie & Strain (1996)**.

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité, des extraits testés, à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}), présent dans le complexe $[Fe^{3+}]$ -TPTZ, par transfère d'électron, en fer ferreux $[Fe^{2+}]$ -TPTZ. En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de *Fenton* (Figure 27). A un pH faible [3,6], le complexe $[Fe^{2+}]$ -TPTZ est bleu intense ;pouvant être lu par spectrophotométrie à 593nm. Le test FRAP a été largement utilisé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des produits naturels.

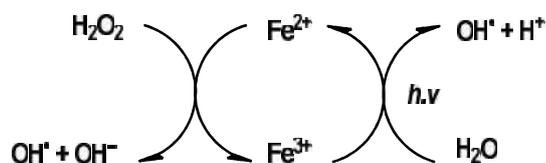


Figure 27 : La réaction de Fenton

Mode opératoire

Vingt microlitres ($20\mu\text{l}$) des échantillons préparés en méthanol à différentes concentrations (de 15,62 à $2000\mu\text{g/ml}$) ont été ajoutés à $180\mu\text{L}$ du réactif FRAP (25ml de tampon acétate [0,3M], 2,5ml de solution de TPTZ [10mM], 2,5ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ [20mM]). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 593nm, à l'aide de lecteur de microplaques (Epoch; BioTek®Instruments) contre, un blanc préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par de le méthanol, afin de calibrer l'appareil.

La solution de $FeSO_4$ ($100 - 2000\mu\text{M}$) a été utilisée pour obtenir la courbe d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en μmol de $FeSO_4/\text{g}$ d'huile essentielle.

5.3. Activité antiinflammatoire

5.3.1. Test d'inhibition de la lipoxygénase (15-LOX)

L'inhibition de la lipoxygénase (LOX) a été déterminée par spectrophotométrie sur des microplaques de 96 puits, selon la méthode décrite par **Waslidge & Hayes (1995)** et modifiée par **Chung *et al.* (2009)**.

Mode opératoire

Dans chaque puits de la microplaque de 96 puits, une aliquote de 50µl de *soybean* 15-LOX, prise dans du tampon Tris-HCl (50mM ; pH 7,4). La concentration finale est de 100ng de protéine par millilitres. Le mélange a été pré-incubé avec 20µl d'échantillon testé (huile essentielle ou inhibiteur standard) à 25°C, pendant cinq (5) minutes. Pour le contrôle, 50µl de solution de LOX et 20µl de tampon contenant 0,2% de DMSO (v/v) ont été pipetés dans les puits. La réaction a été initiée par l'addition de 50µl d'acide linoléique (concentration finale 140µM) dans un tampon Tris-HCl (50mM ; pH 7,4) et le mélange réactionnel a été mis en incubation à 25°C, pendant 20minutes à l'obscurité.

Dans un volume réactionnel total de 120µl, nous avons additionné, à la lipoxygénase et à l'acide linoléique, 100µl de réactif FOX fraîchement préparé (*acide sulfurique (30mM)*, *xylénol orange (100µM)*, *sulfate de Fe(II)(100µM)*, *méthanol/H₂O (9:1)*). Les plaques ont été laissées se développer, pendant 30 minutes à 25°C, avant de procéder à la lecture, à 560nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques (Epoch; BioTek® Instruments). Le pourcentage d'inhibition (%) de l'échantillon a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{\text{échan}} - A_{\text{blanc}}}{A_{\text{témoin}} - A_{\text{blanc}}} \right] \times 100$$

$A_{\text{échan}}$: Absorbance de la solution en présence de l'HE (enzyme avec inhibiteur)

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance de la solution en absence de l'HE (enzyme sans inhibiteur)

Les résultats sont exprimés en IC₅₀. C'est la concentration des extraits qui inhibe 50% de l'activité du 15-LOX.

5.3.2. Test d'inhibition de la cyclooxygénase

L'expérience a été réalisée en utilisant le Kit *COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay* (Item No. 560131 ; **Cayman Chemical (2013)**, USA).

L'enzyme cyclooxygénase (COX), également appelée prostaglandine H synthase (PGHS), contient à la fois les activités des cyclooxygénase et peroxydase. La COX catalyse la première étape dans la biosynthèse des Prostaglandines (PG), des thromboxanes et des prostacyclines ainsi que la conversion de l'acide arachidonique en PGH_2 . Il est maintenant bien établi qu'il existe deux isoformes distincts de COX. La Cyclooxygénase-1 (COX-1) est exprimé constitutivement dans une variété de types de cellules et est impliquée dans l'homéostasie cellulaire normale. Une variété de stimuli mitogènes tels que les esters de phorbol, les lipopolysaccharides et les cytokines conduisent à l'expression induite d'une deuxième isoforme de la COX, cyclooxygénase-2 (COX-2). La COX-2 est responsable de la biosynthèse des PG dans des conditions inflammatoires aiguës (**Xie et al., 1991**). Cette COX-2 inductible est considérée comme l'enzyme cible de l'anti-inflammatoire non stéroïdien.

Le Kit COX (ovine/human) *Inhibitor Screening Assay*, mesure directement la PGF_2 produite par réduction du SnCl_2 de COX-dérivée PGH_2 . Le produit prostanoloïde est quantifié par l'intermédiaire d'enzyme immunosorbent assay (ELISA), en utilisant un anticorps spécifique qui se lie, généralement, à tous les principaux composés des prostaglandines.

Mode opératoire

Les réactions suivantes : la réaction background (BC), l'activité initiale (IA), et la réaction de l'échantillon (H), ont été préparé dans un tampon de 100mM de Tris-HCl contenant $1\mu\text{M}$ d'hème et l'enzyme COX (1 ou 2). Les réactions ont été pré-incubées pendant 10min à 37°C . La réaction a été commencée avec l'ajout de $10\mu\text{l}$ d'acide arachidonique. Au bout de 2min, une quantité de 1M de HCl a été ajoutée dans chaque échantillon, pour l'arrêt du processus de la réaction.

Les produits de ces réactions ont été transférés dans une plaque à 96 puits recouvert par des anticorps (*mouse anti-rabbit IgG*). Le marqueur, la prostaglandine acétylcholinestérase, et l'anticorps primaire ont, ensuite, été ajoutés dans chaque puits. Après 24 heures d'incubation à température ambiante, les mélanges réactionnels ont

été retirés et les puits ont été lavés avec du tampon phosphate de potassium (10mM) contenant 0,05% de Tween 20.

Ensuite, le réactif d'*Ellman* a été ajouté dans les puits. La plaque a été incubée pendant 60min jusqu'à ce que de liaison maximum au puits (de contrôle) atteignent la densité optique (DO) 0,3-0,8 au 405nm.

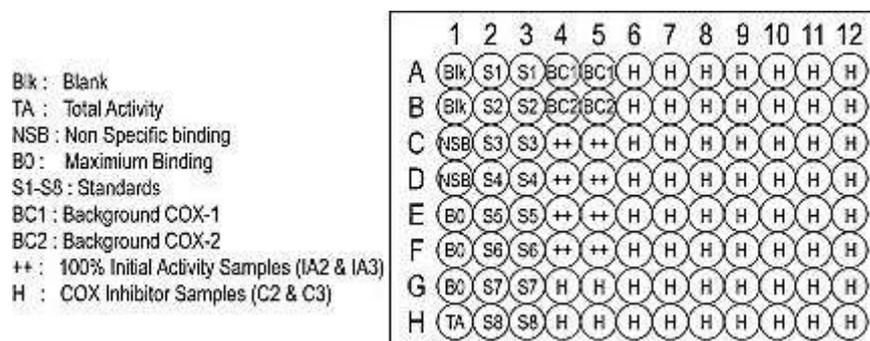


Figure 28 : Exemple de format de microplaque (COX assay)

5.3.3. Test de production de NO par les macrophages activés

Culture de cellule RAW 264.7

Lignée cellulaire macrophage (RAW 264.7) obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) a été cultivée dans des flacons de culture *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contenant L-glutamine complété avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS : *foetal calf serum*) et 1% d'une solution de PSF (Pénicilline /Streptomycine/ Fungizone) sous une atmosphère de 5% CO₂ à 37°C. Les cellules ont étéensemencées dans des microplaques à 96 puits et ont été activées par incubation dans un milieu contenant du LPS (5µg/ml) (témoin) ou le LPS avec différentes concentrations d'huiles essentielles dissoutes dans du DMSO. La quercétine a été utilisée en tant que contrôle positif (inhibiteur de monoxyde d'azote NO) pour la réduction de la production de NO (Mu *et al.*, 2001).

Mesure du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) libéré par les macrophages a été évalué par la détermination de la concentration de nitrite, dans le surnageant de culture, en utilisant le réactif de *Griess* (Huygen, 1970). Après 24 heures d'incubation, 100µl de surnageant provenant de chaque puits de plaque de culture cellulaire a été transféré dans des microplaques à 96 puits et un volume égal de réactif de *Griess* a été ajouté. L'absorbance des solutions résultantes dans les puits a été déterminée, avec un lecteur de microplaques

(Epoch; BioTek®Instruments), après 10 min à 550 nm. Les concentrations de nitrite ont été calculées par l'analyse d'une courbe de régression en utilisant des dilutions en série de NaNO₂ comme étalon.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé sur la base de la capacité des extraits d'huiles essentielles à inhiber la formation d'oxyde nitrique (NO) par les cellules comparativement au témoin (cellules mises en culture dans des milieux, sans extraits, contenant des agents déclenchants et du DMSO), qui a été considéré comme 0% d'inhibition.

Viabilité cellulaire

Pour s'assurer que l'inhibition de l'oxyde nitrique observée n'est pas due à des effets cytotoxiques, la viabilité cellulaire des macrophages a été déterminée par le test MTT, comme décrit par **Mosmann (1983)**, avec modification. Pour la mesure du nitrite, le surnageant de la culture de cellules a été éliminé puis 5µl de (MTT) (5mg/ml pris dans un tampon phosphate salin, PBS) est ajouté dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 4h à 37°C.

Pour dissoudre les cristaux formazan, la solution de MTT a été éliminée et 100µl de DMSO ont été ajoutés à chaque puits. Après 10 min d'incubation, à température ambiante, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm, en utilisant un lecteur de microplaques (Epoch ; BioTek®Instruments). Le pourcentage de viabilité des cellules a été calculé en référence au contrôle (des cellules, sans extraits, contenant des LPS prises comme 100% de viabilité).

5.4. Activité de cytotoxicité cellulaire *in-vitro* (Test MTT)

La cytotoxicité d'huile essentielle a été déterminée par le test MTT (**Mosmann, 1983**), en utilisant des cellules de rein de singe (*VeroCell*) et des carcinome hépatocellulaire humain (*C3A Cell*). Les cellules *C3A* ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC CRL-10741), et la lignée de cellules *Veroa* été obtenues à partir de la collection de culture du Département des maladies vétérinaires tropicales (Université de Pretoria).

La culture de cellules a été préparée suivant le protocole mis au point par **Makhafola et al. (2014)**. Les cellules ont été cultivées dans un milieu essentiel minimal (MEM, Highveld biologique) additionné de 0,1% de gentamycine et 5% de sérum de veau fœtal (FCS, Highveld biologique) pour les cellules *Vero* et 10% de FCS pour les cellules *C3A*. Les

cellules d'une culture sous-confluente ont été récoltées à l'aide de trypsine-EDTA (Sigma), et centrifugés à 200×g pendant 5 minutes et remis en suspension dans un milieu de croissance à 5×10^4 cellules/ml.

Cent microlitres (100µl) de la suspension cellulaire sont introduits à l'aide d'une pipette dans chaque puits des colonnes 2 à 11 d'une plaque stérile de micro-titrage à 96 puits. Deux cents microlitres (200µl) de milieu de culture (MEM) ont été ajoutés aux puits des colonnes 1 et 12 pour minimiser l'effet bordure et maintenir l'humidité (Figure 29).

Les plaques ont été incubées à 37°C, pendant une nuit, dans un incubateur à 5% de CO₂, et 100µl de différentes concentrations d'échantillons d'huile essentielle préparée dans du MEM ont été ajoutés. Chaque dilution de l'échantillon d'essai a été testée avec quatre répétitions. Puis les microplaques ont été incubées à 37°C, pendant 48h, dans l'incubateur à 5% de CO₂.

Un contrôle négatif (cellules non traitées) et un contrôle positif (cellules traitées avec différentes concentrations de chlorure de doxorubicine, Sigma) ainsi qu'un témoin de solvant, de l'acétone, ont été inclus.

Après l'incubation, les cellules ont été lavées avec 200µl de tampon phosphate salin (PBS) puis 200µl de MEM frais et 30µl de MTT (solution mère de 5mg/ml dans du PBS, Sigma) ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 4h à 37°C. Par la suite, le milieu a été soigneusement éliminé des puits (sans perturber le concentré de MTT). Puis nous avons procédé à un double lavage, avec du PBS, et 50µl de DMSO ont été ajoutés à chaque puits, afin de dissoudre le formazan du MTT cristallisé.

La quantité de MTT réduit a été mesurée à 570nm, en utilisant un lecteur de microplaque (VersaMax, Molecular Devices). Les puits dans les colonnes 1 et 12, contenant du milieu et MTT, mais pas de cellules, ont été utilisés comme blanc du lecteur de microplaques. Le pourcentage de viabilité de cellules a été calculé en utilisant la formule ci-dessous:

$$(\%) \text{ Cell viability} = \left[\frac{A_{\text{échan}} - A_{\text{blanc}}}{A_{\text{témoin}} - A_{\text{blanc}}} \right] \times 100$$

Les courbes de dose-réponse ont été obtenues en traçant le pourcentage de croissance des cellules par rapport à la concentration logarithmique du composé. La LC₅₀ (concentration létale pour 50% des cellules) a été calculée à partir d'un modèle de

régression non linéaire sigmoïdale (courbe dose-réponse) en utilisant un logiciel SigmaPlot 12.0®.

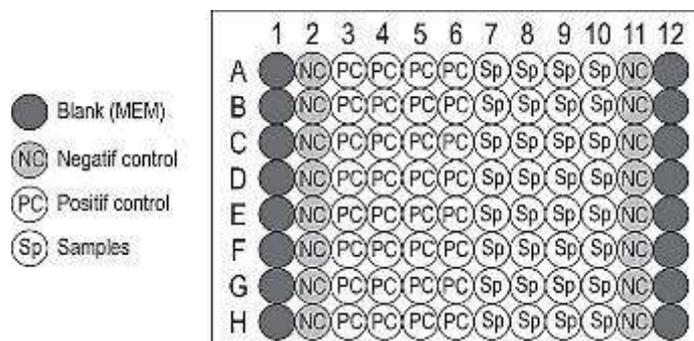


Figure 29 : Exemple de format de microplaque (MTT assay)

Les valeurs de l'indice de sélectivité (SI) de chaque échantillon ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$SI = LC_{50} / CMI$$

Les valeurs de l'indice de sélectivité indiquent la sécurité relative de l'extrait végétal ; ce qui reflète le rapport entre la toxicité et l'activité.

Un indice de sélectivité élevé est une indication d'une grande marge de sécurité entre la concentration de l'extrait qui est capable de tuer les bactéries et la concentration qui est toxique pour les cellules, mammifères dans ce cas.

5.5. Analyse statistique

Les résultats des données ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD), qui ont été calculés à partir de trois mesures. Une valeur de probabilité de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

Les valeurs EC_{50} , IC_{50} et LC_{50} ont été calculées à partir d'un modèle de régression linéaire ou non linéaire soit sigmoïdale ou bien courbe dose-réponse, en utilisant un logiciel SigmaPlot 12.0®.

6. RESULTATS ET DISCUSSION

6.1. Résultats de l'activité antimicrobienne

6.1.1. Résultats de la méthode des disques

Dix microlitres (10µl) d'une dilution (½ et ¼) d'huile essentielle sont déposés sur des disques stériles de 6mm de diamètre, par séries de trois disques par boîte et par dilution. Les résultats de l'aromatogramme sur les souches microbiennes sélectionnées sont illustrés dans le Tableau 10.

Ainsi, ces résultats obtenus avec la méthode de Vincent (Aromatogramme), illustrent une large variation des diamètres de zones d'inhibition, allant de 6,8 à 27,7mm.

Toutes les souches microbiennes (bactéries et levures) montrent une sensibilité aux échantillons d'huiles essentielles d'*Ain-oussera* et *Laghouat* (diamètre de zone d'inhibition supérieur à 13 mm). De plus, les souches bactériennes à Gram (+) révèlent une sensibilité plus importante que les souches à Gram (-).

La comparaison des résultats obtenus pour les échantillons des deux régions *Ain-oussera* et *Laghouat* nous révèle que l'huile essentielle de *Laghouat* est plus active que celle d'*Ain-oussera* (Figure 30) ; tel que, le diamètre d'inhibition maximum étant de 27,7 mm pour la bactérie *Staphylococcus aureus* et de 27,3 mm pour la levure *Candida albicans*. Par ailleurs, le diamètre d'inhibition maximum de l'huile essentielle de la région d'*Ain-oussera*, est de 25,5 mm vis-à-vis de la souche *Bacillus cereus* testée.

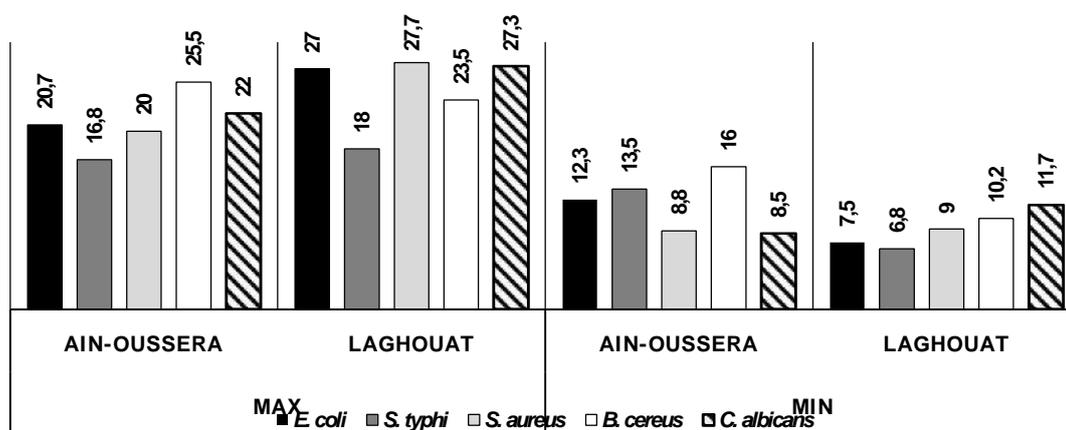


Figure 30 : Histogrammes illustrant les valeurs maximales et minimales des diamètres des zones d'inhibition mesurés pour les échantillons des deux régions d'étude (*Ain oussera* et *Laghouat*)

Tableau 10 : Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition, en millimètres, notés après application des HE, pour les différentes souches testées

| Souches microbiennes | Diamètre de la zone d'inhibition en (mm) (10µl/disque) | | | | | | | |
|--|--|------------|------------|------------|----------------|------------|------------|------------|
| | <i>Ain-oussera</i> | | | | <i>Laghout</i> | | | |
| | A1 | | A2 | | L1 | | L2 | |
| Gram (-) | ½ | ¼ | ½ | ¼ | ½ | ¼ | ½ | ¼ |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC©25922 | 13,3 ± 2,1 | 12,3 ± 0,6 | 20,7 ± 0,6 | 16,5 ± 2,1 | 27,0 ± 1,7 | 07,5 ± 0,7 | 19,3 ± 1,5 | 12,2 ± 1,0 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC©14028 | 16,8 ± 1,9 | 14,5 ± 0,7 | 15,3 ± 1,5 | 13,5 ± 2,2 | 18,0 ± 0,5 | 09,8 ± 0,3 | 08,8 ± 0,8 | 6,8 ± 0,3 |
| Gram (+) | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC©25923 | 20,0 ± 1,7 | 08,8 ± 0,3 | 13,7 ± 0,6 | 12,8 ± 1,7 | 27,7 ± 0,6 | 18,3 ± 1,4 | 15,5 ± 0,8 | 09,0 ± 0,9 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC©11778 | 20,5 ± 0,5 | 18,7 ± 0,6 | 25,5 ± 2,2 | 16,0 ± 1,4 | 23,5 ± 0,7 | 13,5 ± 1,3 | 14,5 ± 0,7 | 10,2 ± 0,7 |
| Mycobactéries | | | | | | | | |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC©1441 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>Mycobacterium aurum</i> ATCC©23366 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC©6841 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Levures | | | | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©24433 | 22,0 ± 0,8 | 09,0 ± 0,9 | 8,50 ± 0,7 | 8,70 ± 0,4 | 27,3 ± 0,3 | 20,0 ± 0,9 | 25,5 ± 1,5 | 11,7 ± 1,5 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©18804 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>Candida tropicalis</i> Isolat | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> Isolat | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

ND: non déterminer

ATCC: American Type Culture Collection

Isolat: Souches isolé depuis un cas clinique.

La souche *Escherichiacoli* présente une sensibilité allant de 13,3 à 20,7mm et 19,3 à 27,0mm respectivement pour l'échantillon d'*Ain-oussera* et *Laghouat*.

Par contre la souche *Salmonellatyphimurium* est moyennement sensible aux extraits d'huiles essentielles, avec un diamètre d'inhibition allant de 16,8 à 18,0 mm et 8,8 à 18,0 mm, respectivement, pour les échantillons d'*Ain-oussera* et *Laghouat*.

Par ailleurs, une inhibition remarquable des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* ont été obtenues pour les dilutions $\frac{1}{2}$ des échantillons d'*Ain-oussera* (de 13,7 à 20,0mm et de 20,5 à 25,5mm) et de *Laghouat* (de 15,5 à 27,7mm et de 14,5 à 23,5mm), respectivement.

Nous avons remarqué, d'une façon générale, que *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, sont les plus sensibles aux huiles essentielles, dans les deux régions.

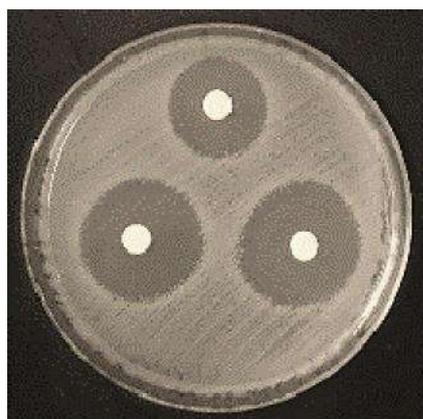
D'après l'ensemble de nos résultats, nous pouvons déduire que le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* Desf., a affecté beaucoup plus les bactéries à Gram positive que les bactéries à Gram négative. Ce résultat concorde avec ceux des travaux de **Tassou & Nychas (1995)**, menés sur les huiles essentielles de la résine de *Pistacialentiscus*.

Les zones d'inhibition sont de 22,0 mm, pour l'échantillon A1, de 27,3 mm, pour l'échantillon L1 et de 25,5mm, pour l'échantillon L2 ; ce qui constitue une activité importante. Cependant, l'échantillon A2 a montré une activité plus faible (avec un diamètre d'inhibition de 8,5mm).

La variation notée, entre les échantillons, semble refléter la différence de la composition chimique constatée.

Nous avons constaté que les huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* Desf., sont dotées d'une activité antifongique importante, vis-à-vis la souche *Candidaalbicans*, comparée aux souches bactériennes étudiées (Figure 31).

L'étude menée par **Benabderrahmane et al. (2009)**, sur l'activité des huiles essentielles de la résine du *Pistaciaatlantica* Desf. vis-à-vis de *Candidaalbicans* ATCC 20027 et de *Candidaalbicans* ATCC 20032, a révélé des zones d'inhibition variant entre 7,3 et 17,3mm. La comparaison de ces résultats avec les nôtres révèle une activité, relativement, importante des huiles essentielles de nos échantillons de galles de Pistachier de l'Atlas.



Escherichia coli (A2)



Salmonella tphi (A1)



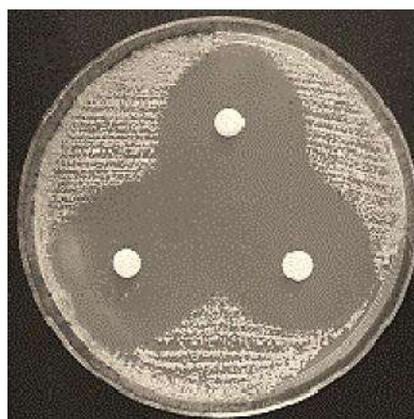
Bacillus cereus (L1)



Staphylococcus aureus (L1)



Candida albicans (A1)



Candida albicans(L1)

Figure 31 : Des photos illustrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* Desf., par la méthode de disques pour les deux régions d'étude

6.1.2. Résultats de la méthode micro-atmosphère

Les résultats de l'effet antifongique (sur *Candida albicans*) des huiles essentielles étudiées par la méthode micro-atmosphère sont illustrés dans la Figure 32.

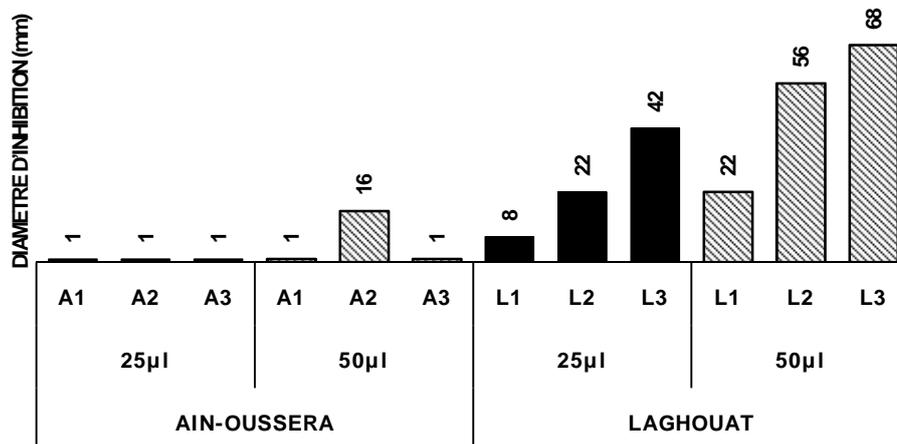


Figure 32 : Histogrammes représentant les diamètres des zones d'inhibition (en millimètres) résultant de l'activité antimicrobienne des échantillons d'huile essentielle testée, sur *Candida albicans*, par la méthode micro-atmosphère

Une forte activité a été observée pour les échantillons d'huiles essentielles de la région de *Laghouat*, avec des zones d'inhibition atteignant 56 et 68mm (volume 50µl d'extrait pur), pour les échantillons L2 et L3, respectivement (Figure 33) ; le même résultat a été obtenu pour le volume 25µl (L2 : 22mm et L3 : 42mm). L'échantillon L1 a montré une activité plus faible (8mm pour 25µl et 22mm pour 50µl).

Les échantillons d'*Ain-oussera* pour les deux volumes d'essai (25 et 50µl) ont montré une activité inhibitrice presque nulle contre l'espèce *Candida albicans*, sauf l'échantillon A2 (50µl) révèle une faible activité avec un diamètre de zone d'inhibition est de 16mm.

D'une façon générale, l'espèce *Candida albicans* a révélé une résistance, relativement, importante vis-à-vis des vapeurs d'huiles essentielles des échantillons de la région d'*Ain-oussera*. En revanche, les échantillons de *Laghouat* montrent une activité inhibitrice plus forte.

Echantillons de "Ain-oussera"



A1 (25µl)

Echantillons de "Laghouat"



L2 (25µl)



A2 (25µl)



L2 (50µl)



A2 (50µl)



L3 (50µl)

Figure 33 : Photos illustrant l'activité anti *candidaalbicans* des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf., par la méthode micro-atmosphère pour les deux régions d'étude (*Ain oussera* et *Laghouat*)

6.1.3. Résultats de la détermination de (CMI)

Après la mise en évidence de l'activité des huiles essentielles par la méthode d'aromatogramme (méthode de disque), la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour les souches bactériennes ayant présenté une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle. Les résultats de la CMI sont rapportés dans le Tableau 11.

Il ressort de ces résultats que les valeurs des CMI obtenues par l'application de l'huile essentielle des galles de *Pistacia atlantica* Desf., varient sensiblement de 16 à 1024 µg/ml, selon la région et la souche (Figure 34 et 35).

La souche *S. aureus* montre une forte sensibilité aux huiles essentielles ; avec une CMI de 16 et 32 µg/ml, pour la région d'*Ain-oussera* et *Laghouat*, respectivement.

Les souches d'*E. coli*, *S. typhi*, *B. cereus* et *C. neoformans* révèlent une sensibilité élevée vis-à-vis des échantillons d'huile essentielle de la région de *Ain-oussera* ; avec une CMI de 64 µg/ml. La comparaison de la sensibilité de ces souches aux huiles essentielles de la région de *Laghouat*, révèle une sensibilité modeste ; avec une CMI de 512 et 128 µg/ml pour les souches *S. typhi* et *B. cereus*, respectivement.

Les levures révèlent une sensibilité variable ; avec des valeurs de CMI allant de 32 à 256 µg/ml, pour les deux échantillons d'huiles essentielles (*Ain-oussera* et *Laghouat*). Quant aux espèces de mycobactéries, nous avons obtenu une résistance quasi-totale, pour les huiles des deux régions.

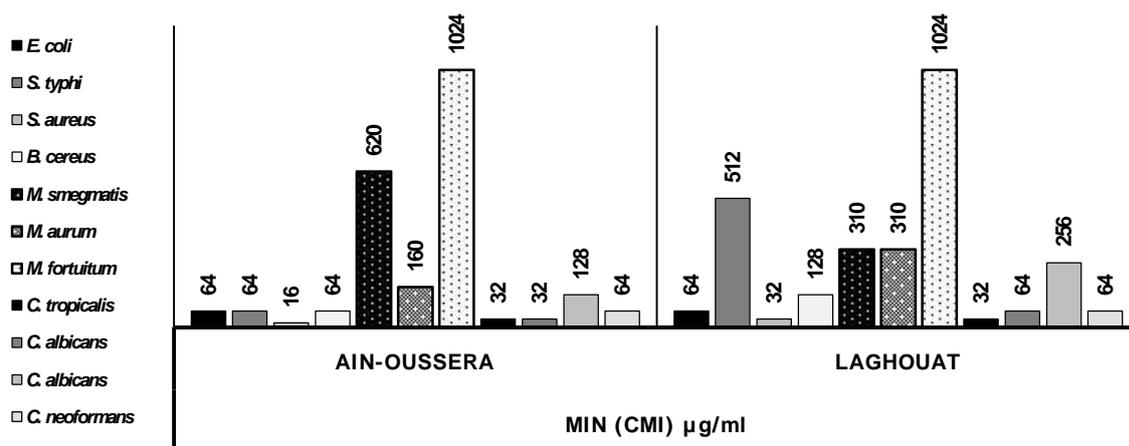


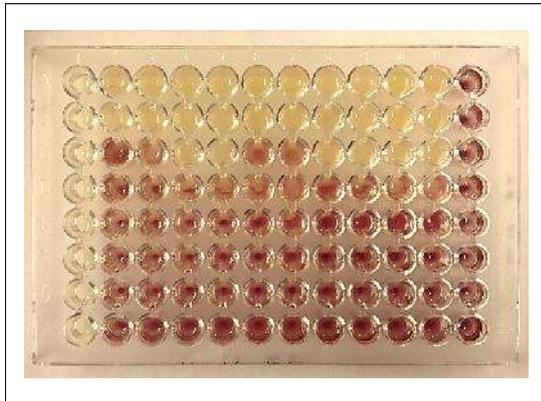
Figure 34 : Histogrammes illustrant les valeurs minimales des CMI (µg/ml) pour les deux régions d'étude (*Ain oussera* et *Laghouat*)

Tableau 11 : La concentration minimale inhibitrice en ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf.

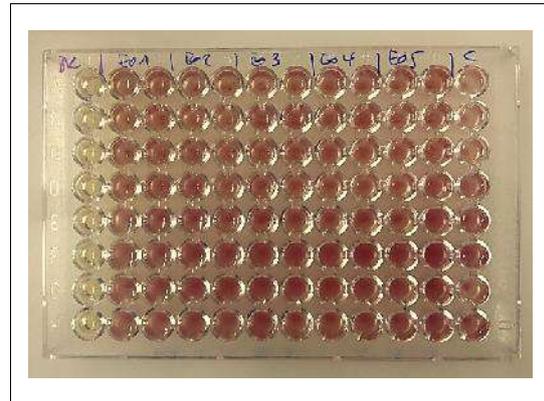
| Souches microbiennes | Concentration minimale inhibitrice (CMI) en $\mu\text{g/ml}$ | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|------|------|
| | <i>Ain-oussera</i> | | | | | | | | <i>Laghouat</i> | | | | | | CP* |
| | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | |
| Gram (-) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichiacoli</i> ATCC©25922 | 64 | 256 | 256 | 256 | 512 | 64 | 64 | 128 | 64 | 64 | 128 | 64 | 128 | 64 | 0,4 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC©14028 | 512 | 512 | 512 | 512 | 64 | 512 | 256 | 256 | 512 | 512 | 512 | 512 | 512 | 512 | 0,4 |
| Gram (+) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC©25923 | 128 | 128 | 256 | 128 | 128 | 16 | 32 | 32 | 32 | 64 | 64 | 128 | 256 | 64 | 0,4 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC©11778 | 128 | 256 | 128 | 512 | 512 | 256 | 64 | 128 | 128 | 128 | 256 | 128 | 128 | 128 | 0,4 |
| Mycobactéries | | | | | | | | | | | | | | | RF** |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC©1441 | 1024 | 620 | 1024 | 620 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 310 | 310 | 1024 | 1024 | 310 | 50 |
| <i>Mycobacterium aurum</i> ATCC©23366 | 1024 | 1024 | 160 | 1024 | 1024 | 160 | 1024 | 1024 | 1024 | 310 | 1024 | 310 | 1024 | 1024 | 3,12 |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC©6841 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 12,5 |
| Levures | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©24433 | 512 | 512 | 512 | 256 | 512 | 256 | 128 | 256 | 256 | 256 | 512 | 256 | 256 | 256 | ND |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©18804 | 32 | 32 | 32 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 128 | 128 | 64 | 64 | 64 | ND |
| <i>Candida tropicalis</i> Isolat | 64 | 32 | 64 | 128 | 512 | 32 | 32 | 64 | 128 | 256 | 32 | 128 | 128 | 128 | ND |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> Isolat | 128 | 128 | 128 | 128 | 256 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 128 | 128 | 64 | 64 | ND |

* CP : Ciprofloxacine (antibiotique standards)

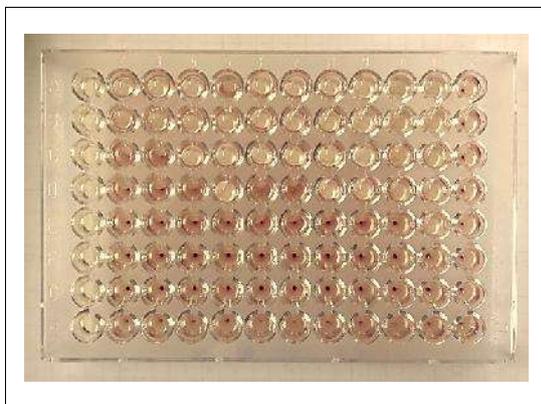
**RF : Rifampicin ($\mu\text{g/mL}$)



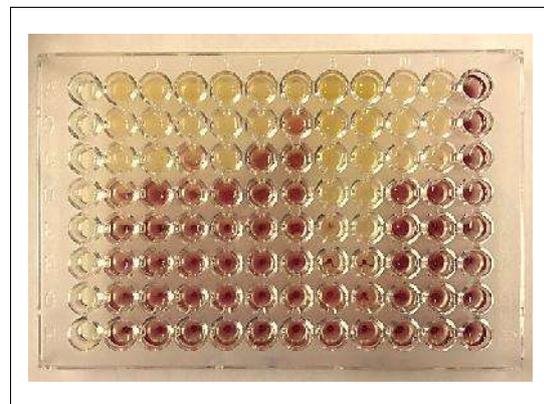
Escherichia coli ATCC©25922



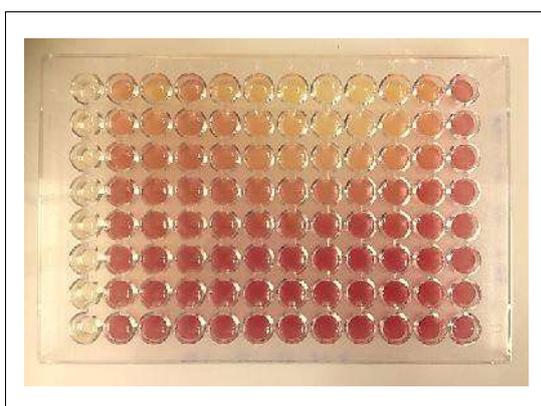
Salmonella typhimurium ATCC©14028



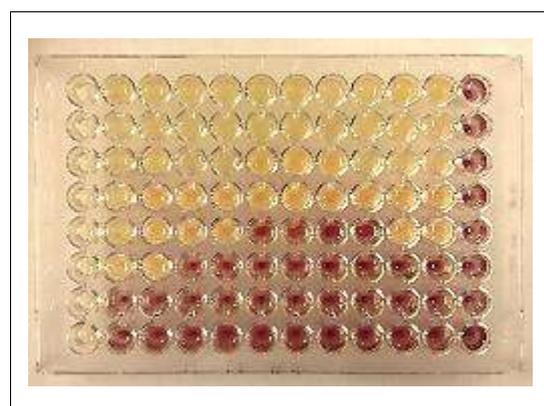
Staphylococcus aureus ATCC©25923



Bacillus cereus ATCC©11778



Mycobacterium smegmatis ATCC©1441



Candida albicans ATCC©18804

Figure 35 : Photos illustrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des galls de *Pistacia atlantica* Desf., par la méthode micro-dilution (CMI) pour les deux régions d'étude (*Ain oussera* et *Laghouat*)

6.1.4. Discussion

De façon générale, les échantillons d'huiles essentielles de l'espèce *Pistacia atlantica* Desf., sont capables d'inhiber la croissance de différentes espèces microbiennes (Bactérie, à Gram positive ou à Gram négative, levures et mycobactéries).

Les différences observées pour les valeurs de CMI peuvent s'expliquer par la différence dans les pourcentages de composés antibactériens dans l'huile essentielle, du *Pistacia atlantica* Desf.

Selon **Benabderrahmane et al. (2009)**, cette différence n'est pas due, seulement, à la variation dans la composition chimique des huiles essentielles, elle est, aussi, due aux limites techniques du test utilisé pour déterminer l'activité.

De plus, selon **Lawrence (1993)**, la variabilité du pouvoir bactéricide des huiles essentielles serait due à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques.

Comme l'ont proposé **Sonboli et al. (2005)**, sur des molécules de synthèse, cette activité antimicrobienne serait, probablement, associée à certains composés majoritaires tels que *-Pinène*, *-Pinène*, *Sabinène* et *Terpinène-4-ol*, déterminés dans nos échantillons.

En revanche, les travaux de **Lis-Balchin & Deans (1997)**, de **Lachowicz et al. (1998)**, de **Belaïche et al. (1995)** ainsi que ceux de **Cosentino et al. (1999)** montrent que l'effet inhibiteur, de certaines huiles essentielles de plantes aromatiques, sur les bactéries Gram positive, serait dû non pas à des constituants majoritaires mais à la présence de certains composés mineurs.

L'activité antimycobactérienne des deux huiles essentielles varie de modéré à faible. Des résultats similaires ont été révélés dans une étude antérieure sur les huiles essentielles de plantes recueillies en Colombie par **Bueno et al. (2011)**.

Néanmoins, l'activité antimycobactérienne de composés dérivés de plantes contre les espèces de mycobactéries à croissance rapide est bien documentée (**Mossa et al., 2004; Seidel & Taylor, 2004**).

Chung et al. (1995), ont montré que l'activité contre *M. aurum* à croissance rapide est hautement prédictive de l'activité contre *M. tuberculosis*, alors que les deux espèces ont des profils de sensibilité similaires aux médicaments.

Dans notre étude, l'huile essentielle d'*Ain-Oussera* présente la plus forte activité contre *M. aurum* ; la CMI étant de 0,16 mg/ml. Ce résultat montre la nécessité de procéder à une étude ultérieure plus poussée, tout en ciblant des espèces de *Mycobacterium* pathogènes.

L'activité antimycobactérienne modérée que nous avons révélée pourrait être attribuée aux dérivés terpénoïdes de notre huile essentielle. Le potentiel antimycobactérien des dérivés terpénoïdes ont été déjà démontré dans des études menées par **Copp (2003)** et **Paduch et al. (2007)**.

Dans notre étude, l'étude de la composition chimique des galles de *Pistacia atlantica* analysée par GC/MS a révélé la présence de deux types de chemotypes différents: un chemotype *-pinene* et un chemotype *-pinene/sabinene/terpinen-4-ol*.

Dans notre cas, nos échantillons d'huiles essentielles sont riches en *terpinen-4-ol*. Il est fort probable que l'activité antimicrobienne inhibitrice, que nous avons révélée par l'utilisation des trois méthodes, soit due à la présence de ce composé.

Selon **Hernández et al. (2005)**, l'activité biologique des huiles essentielles devrait être attribuée aux monoterpènes lipophiles, tels que l'*-pinène*, le *terpinène-4-ol*, le *linalool* et le *-terpinéol*.

Les monoterpènes oxygénés, *1,8-cinéole* et *-terpinéol*, sont connus pour être fortement antimicrobiens contre certains agents pathogènes (**Rosato et al., 2007; Bakkali et al., 2008**).

Une étude récente, menée par **Ait-Ouazzou et al. (2011)** sur l'activité antimicrobienne de huit constituants hydrophobes pure d'huiles essentielles (trois monoterpènes hydrocarbonés : *-pinene*, *-pinene* et *p-cymene* ; et cinq monoterpènes oxygénés : *carvacrol*, *linalool*, *terpineol-4-ol*, *-terpinylacetate* et *1,8-cinéole*) ayant pour but de préserver les aliments contre des souches pathogènes, a montré que les monoterpènes oxygénés comme le *carvacrol* et *terpineol-4-ol* présentent une grande activité inhibitrice contre *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*.

Cependant, d'autres auteurs (**Bounatirou et al., 2007**) ont, également, suggéré que des composants mineurs interagissent avec les composants majoritaires ; ce qui affecte les activités antimicrobiennes des huiles. Il est possible que l'activité des principaux composants est régulée par les autres molécules mineures.

En outre, le spectre d'action du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles s'avère très étendu dans la mesure où il reflète en quelque sorte la diversité de leurs composés chimiques (**Sonboli et al., 2005; Carson et al., 2006**).

De plus, on ne peut écarter une possible action synergétique ou antagoniste de certains composés monoterpéniques cités par plusieurs auteurs (**Didry et al., 1994; Belaïche et al., 1995; Ultee et al., 2002; Koutsoudaki et al., 2005**).

Selon **Inouye et al. (2001)**, l'activité et la stabilité de l'huile essentielle sont variables ; que ce soit à l'état de vapeur ou bien en solution. Ainsi, certains composés des huiles essentielles sont instables à l'état de vapeur, mais stables en milieu aqueux.

Finalement, nous pouvons remarquer dans nos résultats, que l'activité inhibitrice des huiles essentielles de galle de *Pistacia atlantica* Desf a affecté plus les levures (*Candida albicans*) et les bactéries Gram (+) que les bactéries Gram (-) et les mycobactéries.

Ce résultat est cohérent avec ceux de l'étude menée, par **Tassou & Nychas (1995)**, sur les huiles essentielles du mastic de *Pistacia lentiscus*, de la récente investigation réalisée, par **Rezaie et al. (2015)**, sur l'activité antibactériennes des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* ainsi que les travaux de **Ait-Ouazzou et al. (2011)** menés sur des composés purs d'huile essentielles (monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés).

6.2. Résultats de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* a été réalisée par le biais de trois méthodes chimiques (le piégeage du radical libre DPPH[•], le piégeage du radical cationique ABTS^{•+} et la réduction de fer FRAP test).

6.2.1. Résultats de la méthode DPPH[•]

Les valeurs d'EC₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huile essentielle des galles de *Pistacia atlantica* Desf., de la région *Ain-oussera* et de *Laghouat* ont été déterminées à partir d'un modèle de régression linéaire. Le Trolox, le hydroxyanisole butylé (BHA) et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards. Le tableau 12 illustre la moyenne et l'écart type de nos résultats.

Tableau 12 : Valeurs des EC₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huiles essentielles d'*Ain oussera* et de *Laghouat*. Le Trolox, le BHA et l'acide ascorbique sont des standards

| Valeurs des EC ₅₀ en (mg/ml) | | | | | | |
|---|--------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|----------------------|
| <i>Ain-oussera</i> | | <i>Laghouat</i> | | <i>Trolox</i> | <i>BHA</i> | <i>A. ascorbique</i> |
| A1 | >10,00 | L1 | 6,467 ± 0,46 | 0,002 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,004 ± 0,002 |
| A2 | 0,881 ± 0,84 | L2 | 5,796 ± 0,40 | | | |
| A3 | 0,840 ± 0,61 | L3 | 1,651 ± 0,77 | | | |
| A4 | 1,251 ± 0,34 | L4 | 2,240 ± 0,15 | | | |
| A5 | 0,859 ± 0,31 | L5 | 0,955 ± 0,31 | | | |
| A6 | >10,00 | L6 | 1,838 ± 0,75 | | | |
| A7 | >10,00 | | | | | |
| A8 | 2,393 ± 0,15 | | | | | |

Généralement, les huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* Desf., de la plupart des échantillons (*Ain-oussera* et *Laghouat*), présentent une capacité de réduction du radical libre DPPH[•] (Figure 36). Une variation importante et remarquable pour l'ensemble des échantillons a été mise en évidence. Elle varie de 0,840 à 10,00mg/ml pour les échantillons *Ain-oussera*, et de 0,955 à 6,467mg/ml pour les échantillons de *Laghouat*).

La comparaison des valeurs EC₅₀ montre que les échantillons de la région d'*Ain-oussera* présentent un pouvoir anti-radicalaire plus faible que celui des échantillons de la région de *Laghouat*. Les échantillons A2, A3, A5 et L5 ont montré une activité modérée comparés aux autres échantillons.

La comparaison des valeurs d'EC₅₀ de nos résultats avec celles des standards (Trolox, BHA et l'acide ascorbique) révèle une différence nettement significative. Elle est de l'ordre de près 400 fois.

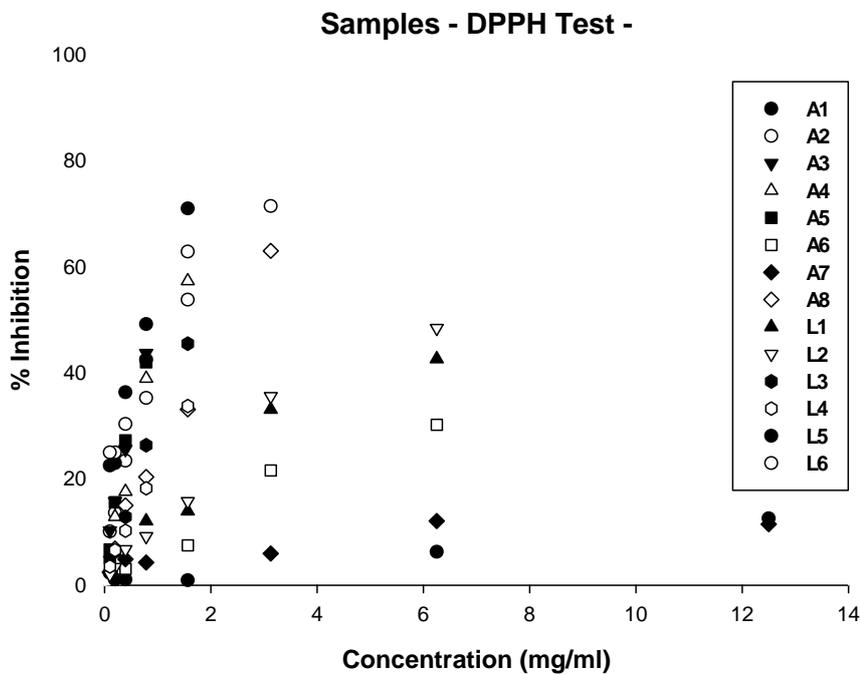
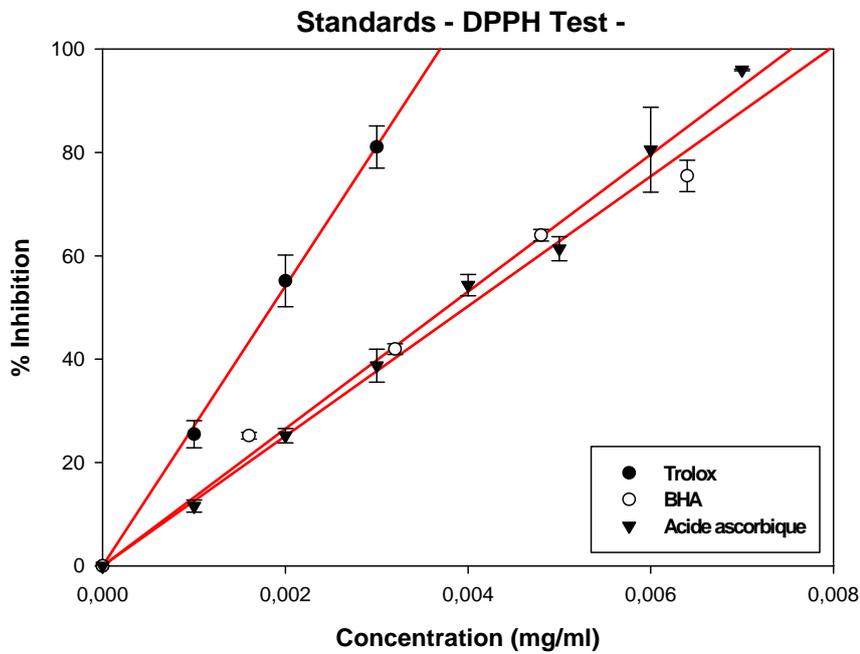


Figure 36 : Courbe représentant le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et des standards dans le test radicalaire DPPH

6.2.2. Résultats de la méthode ABTS^{•+}

Pour évaluer l'activité antioxydant de nos extraits, nous avons utilisé dans notre travail une méthode récente basée sur la réaction entre un radical cationique stable ABTS^{•+} (générateur de radicaux libres) et l'huile essentielle(nos extraits).

Le test ABTS est souvent utilisé dans l'évaluation de la puissance antioxydante totale des composés simples et des mélanges complexes d'extraits de diverses plantes. La mesure de l'absorbance a été faite par spectrophotométrie à $\lambda = 734$ nm. Cette absorbance peut être utilisée, pour les solvants organiques et aqueux, comme un indice qui reflète l'activité antioxydante des extraits d'huile essentielle.

Les valeurs d'EC₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huile essentielle des galles de *Pistacia atlantica* Desf., de la région d'*Ain-oussera* et de *Laghout* ont été déterminées à partir d'un modèle de régression non linéaire. Le Trolox, BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards (Tableau 13).

Tableau 13 : Les valeurs des EC₅₀ (mg/ml) des échantillons d'huiles essentielles des échantillons, de *Ain-oussera* et de *Laghout* (A et L), et du standards

| Valeurs des EC ₅₀ en (mg/ml) | | | | |
|---|--------------|----------------|--------------|---------------|
| <i>Ain-oussera</i> | | <i>Laghout</i> | | |
| | | | | <i>Trolox</i> |
| A1 | >5 | L1 | >5 | 0,003 ± 0,001 |
| A2 | 0,141 ± 0,01 | L2 | >5 | 0,002 ± 0,001 |
| A3 | 0,115 ± 0,02 | L3 | 1,058 ± 0,17 | 0,001 ± 0,001 |
| A4 | 0,104 ± 0,06 | L4 | 0,544 ± 0,04 | |
| A5 | 0,136 ± 0,09 | L5 | 0,563 ± 0,02 | |
| A6 | >5 | L6 | 0,885 ± 0,03 | |
| A7 | >5 | | | |
| A8 | >5 | | | |

Nos échantillons d'huiles essentielles des deux régions d'études montrent une capacité de réduction de 50% des radicaux libres du cation ABTS^{•+} avec des concentrations allant de 0,104 à 5mg/ml et 0,544 à 5mg/ml, pour les échantillons d'*Ain-oussera* et les échantillons de *Laghout*, respectivement (tableau 13).

La capacité de piégeage des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* sur les radicaux libres ABTS est illustrée dans la figure 37. Le pouvoir de piégeage des radicaux libres ABTS par nos échantillons d'huiles essentielles est bien corrélée avec des concentrations croissantes. Cependant, elles sont plus faibles que les standards Trolox,

BHA et l'acide ascorbique ; avec des valeurs d'EC₅₀ de 0,003, de 0,002 et de 0,001mg/ml, respectivement.

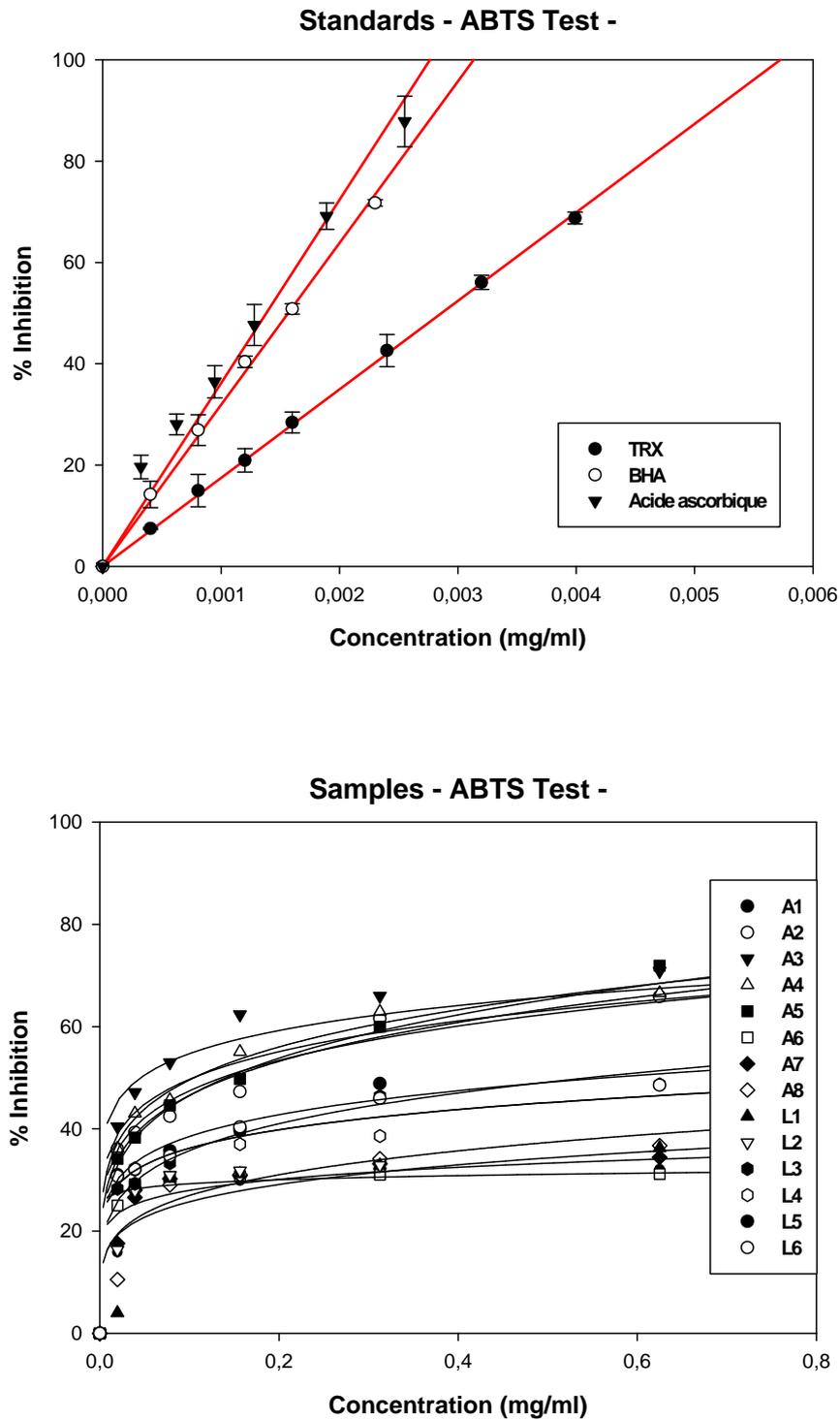


Figure 37 : Courbe représentant le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et des standards par le test ABTS

6.2.3. Résultats de la méthode FRAP

L'activité antioxydant de nos extraits a été évaluée, par la méthode FRAP, basée sur la réduction de fer ferrique présent dans le complexe TPTZ en fer ferreux. Le Tableau 14 présente les moyennes et les écart-types de ces résultats.

Tableau 14 : Valeurs du Test FRAP en $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ d'échantillon d'huiles essentielles (A et L)

| Valeurs FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ d'échantillon) | | | | | |
|--|---------------|-----------------|--------------|---------------|----------------------|
| <i>Ain-oussera</i> | | <i>Laghouat</i> | | <i>Trolox</i> | <i>A. ascorbique</i> |
| A1 | 96,22± 6,73 | L1 | 79,38±3,78 | 5320± 50,67 | 1310± 9,33 |
| A2 | 87,43 ± 4,09 | L2 | 91,21 ± 8,31 | | |
| A3 | 100,31 ± 0,35 | L3 | 80,57 ± 7,34 | | |
| A4 | 99,65 ± 3,74 | L4 | 95,03 ± 4,84 | | |
| A5 | 90,90 ± 4,40 | L5 | 99,60 ± 4,22 | | |
| A6 | 89,36 ± 0,04 | L6 | 94,29 ± 4,26 | | |
| A7 | 78,07 ± 0,79 | | | | |
| A8 | 91,38 ± 1,60 | | | | |

Des solutions de FeSO_4 à diverses concentrations ont été utilisées pour construire une courbe d'étalonnage (Figure 38) ; les résultats étant exprimés en micromoles de FeSO_4 par gramme d'huile essentielle.

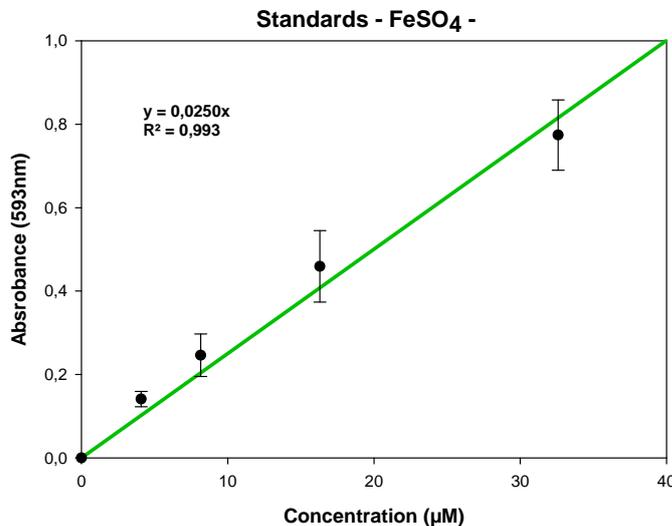


Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la solution de FeSO_4

Nos échantillons d'huiles essentielles, montrent une capacité de réduction de fer ferrique en fer ferreux avec des valeurs de FRAP variant de 78,07 à 100,31 $\mu\text{mol/g}$ et de 79,38 à 99,60 $\mu\text{mol/g}$ pour les échantillons de la région d'*Ain-oussera* et de *Laghouat*, respectivement (Tableau 14). Un pouvoir réducteur de Fe^{3+} plus élevé a été révélé par les standards ; avec des valeurs de FRAP de 5320 et de 1310 $\mu\text{mol/g}$, pour le Trolox et l'acide ascorbique, respectivement.

6.2.4. Discussion

L'activité antioxydante de l'huile essentielle des galles de l'espèce *Pistacia atlantica* a été évaluée par trois méthodes d'essai, DPPH, ABTS et FRAP pouvoir réducteur de fer.

Les échantillons d'huiles essentielles (*Ain-oussera* et *Laghouat*) ont pu réduire le radical libre DPPH en radical stable de couleur jaune, et la même chose pour le radical cation ABTS. Bien que la méthode DPPH et ABTS soient basées sur le même principe, les résultats obtenus à partir du test ABTS sont inférieurs à ceux obtenus à partir de test DPPH. Nous avons obtenu une valeur minimale d'EC₅₀ de 104mg/ml dans le test ABTS et de 0,840mg/ml dans le test DPPH. Afin de comparer ces résultats, les pouvoirs réducteurs des échantillons d'huile essentielle ont été testés, en utilisant un procédé spectrophotométrique où on détermine la teneur en ions ferriques qui ont été réduits par l'huile testée. Nous avons constaté que nos échantillons ont été capable de réduire le fer ferrique en fer ferreux avec des valeurs maximales de 100,31 μmol Fe²⁺/g d'huile essentielle. Notons que cette capacité de réduction reste très faible par rapport aux standards, le Trolox et l'acide ascorbique, dont le pouvoir réducteur est de 5320 et 1310 μmol/g, respectivement.

Nos résultats suggèrent que l'huile essentielle des galles de *Pistacia atlantica* pour les deux régions (*Ain-oussera* et *Laghouat*) présente une activité antioxydante modérée avec une relation dose-réponse dans les trois essais (DPPH, ABTS et FRAP).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est une autre propriété biologique d'un grand intérêt car elle permet la conservation des aliments contre les effets toxiques oxydatifs. Nous avons trouvé très peu de travaux bibliographiques traitant de l'activité antioxydante des huiles essentielles de l'espèce *Pistacia atlantica* à ce sujet, depuis 2010.

Les travaux menés par **Gourine et al. (2010)**, sur les feuilles de *Pistacia atlantica* Desf., des trois stations (*Laghouat*, *Ain-Oussera* et *Hassi R'mel*) ont révélé, une activité antioxydante modérée ; avec des valeurs d'EC₅₀ de 18,95, de 13,91 et de 14,80mg/ml, respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles révélées dans notre travail. Cette différence pourrait être due à une différence de la composition chimique entre les parties étudiées (feuilles et galles).

Selon **avar et al. (2012)**, l'efficacité de l'effet antioxydant d'une huile essentielle dépend de la teneur en composés phénoliques et de l'activité de la réaction du phénol vers les radicaux peroxy et sur la stabilité du radical phénoxy formé dans la réaction.

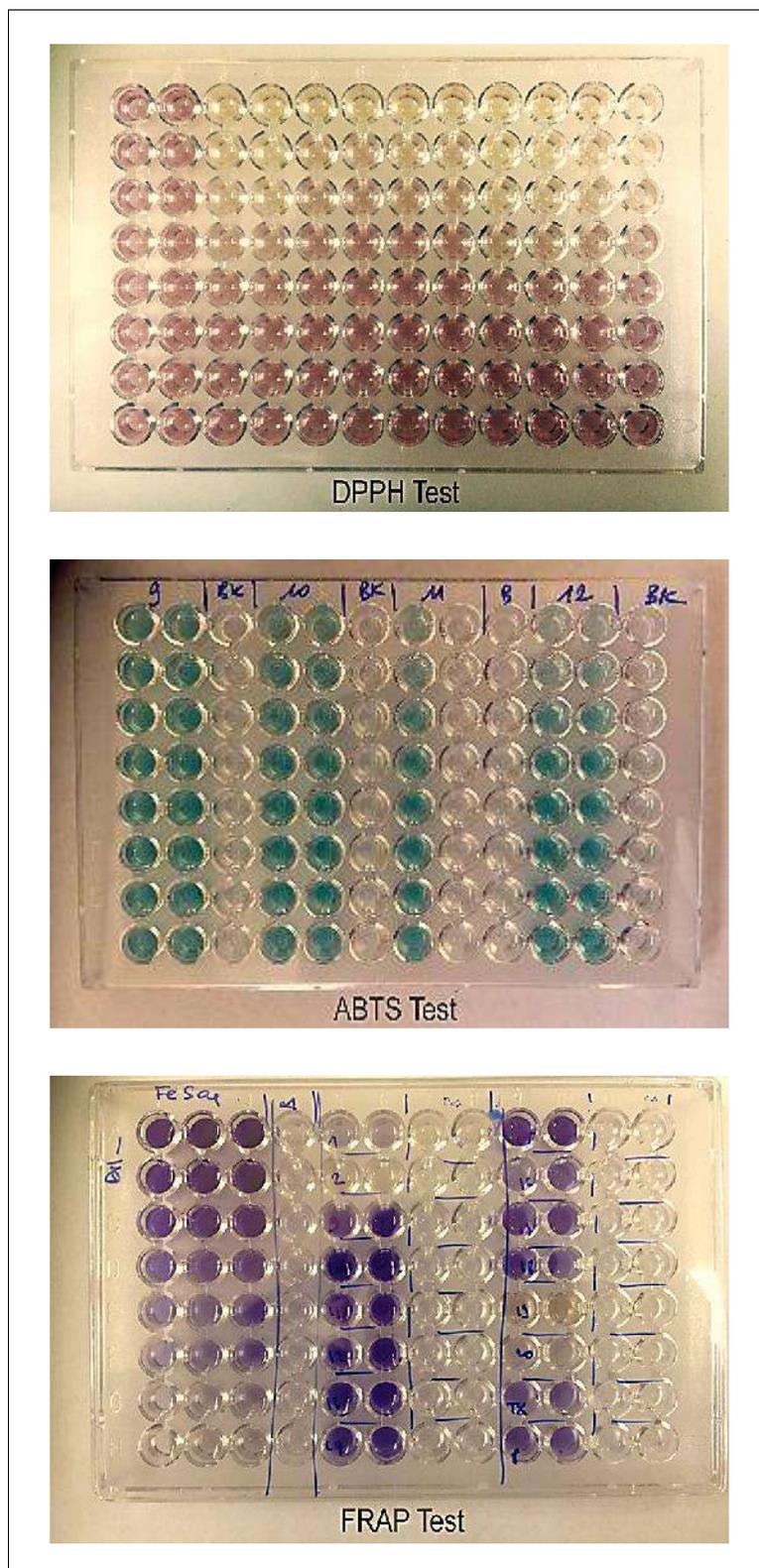


Figure 39 : Photos illustrant l'activité antioxydante dans des plaques de micro-titration (96 puits)

6.3. Résultats de l'activité antiinflammatoire

6.3.1. Résultats du test d'inhibition de la lipoxygénase (15-LOX)

L'activité inhibitrice de la 15-lipoxygénase par les huiles essentielles de nos échantillons a été mesurée en utilisant l'essai de l'oxydation ferrique de l'orange xylénol (FOX reagent) dans des microplaques de 96 puits.

Les résultats de la capacité inhibitrice du 15-lipoxygénase, exprimée en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), est présentée dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs d' IC_{50} (en $\mu\text{g/ml}$) de l'inhibition du 15-LOX par nos échantillons d'huiles essentielles

| Valeurs d' IC_{50} en ($\mu\text{g/ml}$) d'inhibition de 15-lipoxygénase | | | | | |
|--|------------------|-----------------|------------------|------------------|--|
| <i>Ain-oussera</i> | | <i>Laghouat</i> | | <i>Quercétin</i> | |
| A1 | 05,62 \pm 0,27 | L1 | 21,09 \pm 0,85 | 5,08 \pm 0,12 | |
| A2 | 29,09 \pm 1,20 | L2 | 34,06 \pm 1,44 | | |
| A3 | 53,18 \pm 2,45 | L3 | 31,99 \pm 1,35 | | |
| A4 | 64,98 \pm 2,99 | L4 | 96,01 \pm 4,54 | | |
| A5 | 77,54 \pm 1,77 | L5 | 37,61 \pm 1,62 | | |
| A6 | 34,17 \pm 1,45 | L6 | 29,84 \pm 1,28 | | |
| A7 | 04,17 \pm 0,45 | | | | |
| A8 | 38,77 \pm 1,68 | | | | |

La quercétine a été utilisée comme contrôle positif. Il a présenté une forte activité inhibitrice de 15-LOX ; avec une valeur d' IC_{50} de 5,08 $\mu\text{g/ml}$. Quant à l'activité des extraits, elle varie entre 4,17 et 96 $\mu\text{g/ml}$.

En comparant avec la quercétine, l'extrait le plus actif a été obtenu avec l'échantillon des huiles essentielles d'*Ain-oussera* (A1) et (A2) ; avec des valeurs d' IC_{50} de 4,17 et 5,62 $\mu\text{g/ml}$, respectivement.

L'échantillon d'huile essentielle (L1) de *Laghouat* révèle une activité assez importante. La valeur de l' IC_{50} est de 21,09 $\mu\text{g/ml}$. Les autres échantillons d'huiles essentielles révèlent une activité inhibitrice modérée. Elle varie entre 29,84 et 96,01 $\mu\text{g/ml}$.

6.3.2. Résultats du test d'inhibition de (COX-1) et (COX-2)

Les enzymes de cyclooxygénase ont été largement utilisés pour étudier le potentiel anti-inflammatoire des agents naturels. Cette méthode n'est pas d'usage courant dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire elle a été rapportée dans certaines publications (Yoshikawa *et al.*, 2005; Stanikunaite *et al.*, 2009).

L'expérience a été réalisée en utilisant le Kit *COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay* (Item No. 560131; Cayman Chemical) sur trois échantillons d'huiles essentielles de concentration de 2,5µg/ml pour chaque région (*Ain-oussera* et *Laghouat*). La figure 40 représente le pourcentage d'inhibition de chaque échantillon sur l'activité enzymatique de COX-1 et COX-2.

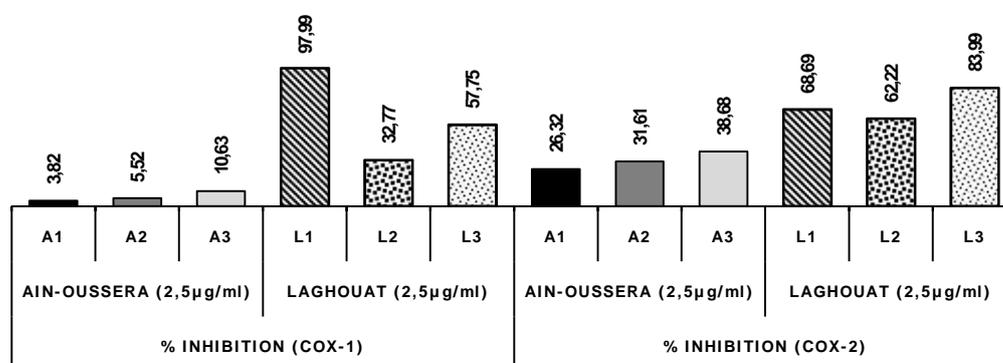


Figure 40 : Histogrammes illustrant le pourcentage d'inhibition de COX-1 et COX-2 par les huiles essentielles (A et L) de *Pistacia atlantica*

Les résultats obtenus ont montré une variabilité dans le pourcentage d'inhibition de la cyclooxygénase par les huiles essentielles de l'espèce *Pistacia atlantica* allant de 3,82% à 97,99% (COX-1) et de 26,32% à 83,99% (COX-2).

L'échantillon (L1) révèle une forte activité inhibitrice contre COX-1 et COX-2 avec un pourcentage d'inhibition de 97,99% et de 68,99% respectivement. L'échantillon (L3) montre aussi une activité inhibitrice importante contre COX-1 (57,75%) et COX-2 (83,99%).

Les échantillons d'huiles essentielles de la région d'*Ain-oussera* ont été révélés un faible pourcentage d'inhibition de [3,82 % - 10,63%] pour (COX-1) et de [26,32 % - 38,68%] pour COX-2. Mais au point de vue d'une inhibition sélective, l'huile essentielle de l'échantillon (A3) a été inhibée l'enzyme COX-2 avec un pourcentage d'inhibition de 38,68% par rapport la COX-1 (10,63%).

6.3.3. Résultats du test de production de NO par les macrophages activés

Le potentielle d'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* a été étudié en déterminant la quantité d'oxyde nitrique (NO) libéré par des cellules macrophages (RAW 264.7).

Dans le dosage de la production de NO, les cellules ont été stimulées avec 5µg/ml de lipopolysaccharide (LPS) et pendant une période d'incubation de 24 heures l'effet de LPS a été déterminé. Il est bien établi que, le traitement des macrophages RAW 264.7 avec LPS induit la production de NO. La quantité peut être déterminée en mesurant la concentration de nitrite, produit oxydé stable de NO, dans les milieu par une procédure colorimétrique basée sur la réaction de Griess (Min *et al.*, 2010).

La figure 41 montre le pourcentage d'inhibition du NO produit par les cellules macrophages type (Raw264.7) et le pourcentage de viabilité cellulaire utilisant les huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* de deux région d'étude (*Ain-oussera* et *Laghout*).

Tous les échantillons d'huile essentielle testés avaient un effet inhibiteur sur la production de NO dépendant de la concentration. A la plus élevée concentration (200µg/ml) utilisée, tous les échantillons ont conduit à une inhibition supérieure à 90% à l'exception des échantillons de *Laghout* L2, L5 et L6 révèlent des pourcentages d'inhibition de 84,01%, 59,20% et 79,52% respectivement.

Bien que les échantillons (A2, A3, A5, A6, A7, A8, L1 et L4) ont une bonne activité contre la production de NO à une concentration de 200µg/ml, l'effet d'inhibiteur semble être due à leur cytotoxicité contre les cellules macrophages avec des pourcentages de viabilité cellulaire est de 11,62%, 0,80%, 19,92%, 1,29%, 6,61%, 1,02% 0,84% et 1,07% respectivement. Dans la même concentration l'échantillon A1 et A4 inhibent la production de NO (99,17 et 99,13% respectivement) sans effet cytotoxique significatif (78,91 et 70,22%).

A la plus faible concentration (4µg/ml), tous les échantillons ont été montrés une faible activité inhibitrice de la production de NO qui ne dépasse pas 30%. La quercétine a été révélé a une concentration de 10µg/ml un pourcentage d'inhibition de 73,99% avec une viabilité cellulaire de 75,43%. Nos échantillons d'huiles essentielles ont montré une modeste activité anti-inflammatoire par rapport la quercétine.

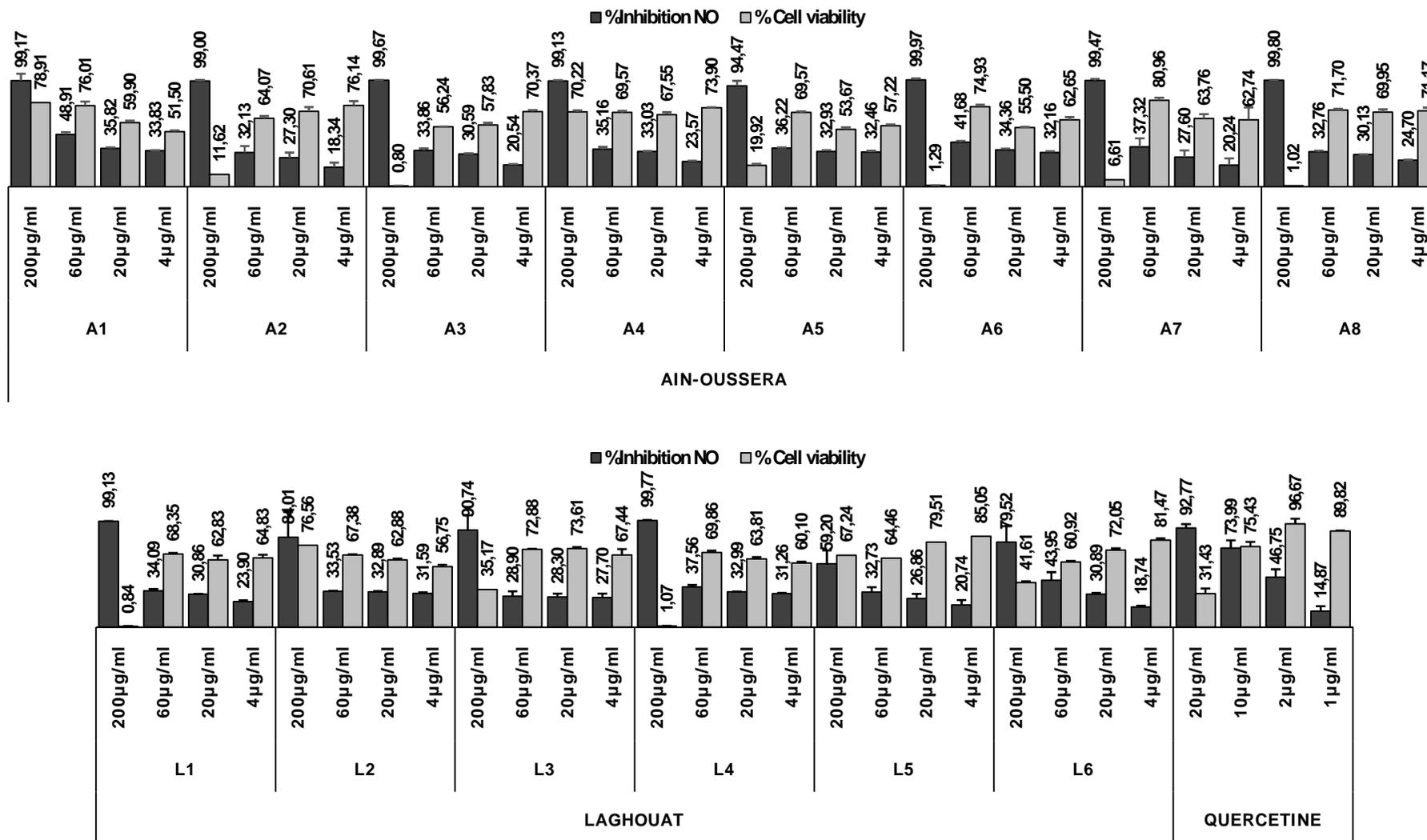


Figure 41 : Histogrammes montre le % d'inhibition du NO produit par des cellules macrophages type (Raw264.7) et le % de viabilité cellulaire utilisant les huiles essentielles des galls de *Pistacia atlantica* de deux région d'étude (Ain-oussera et Laghouat)

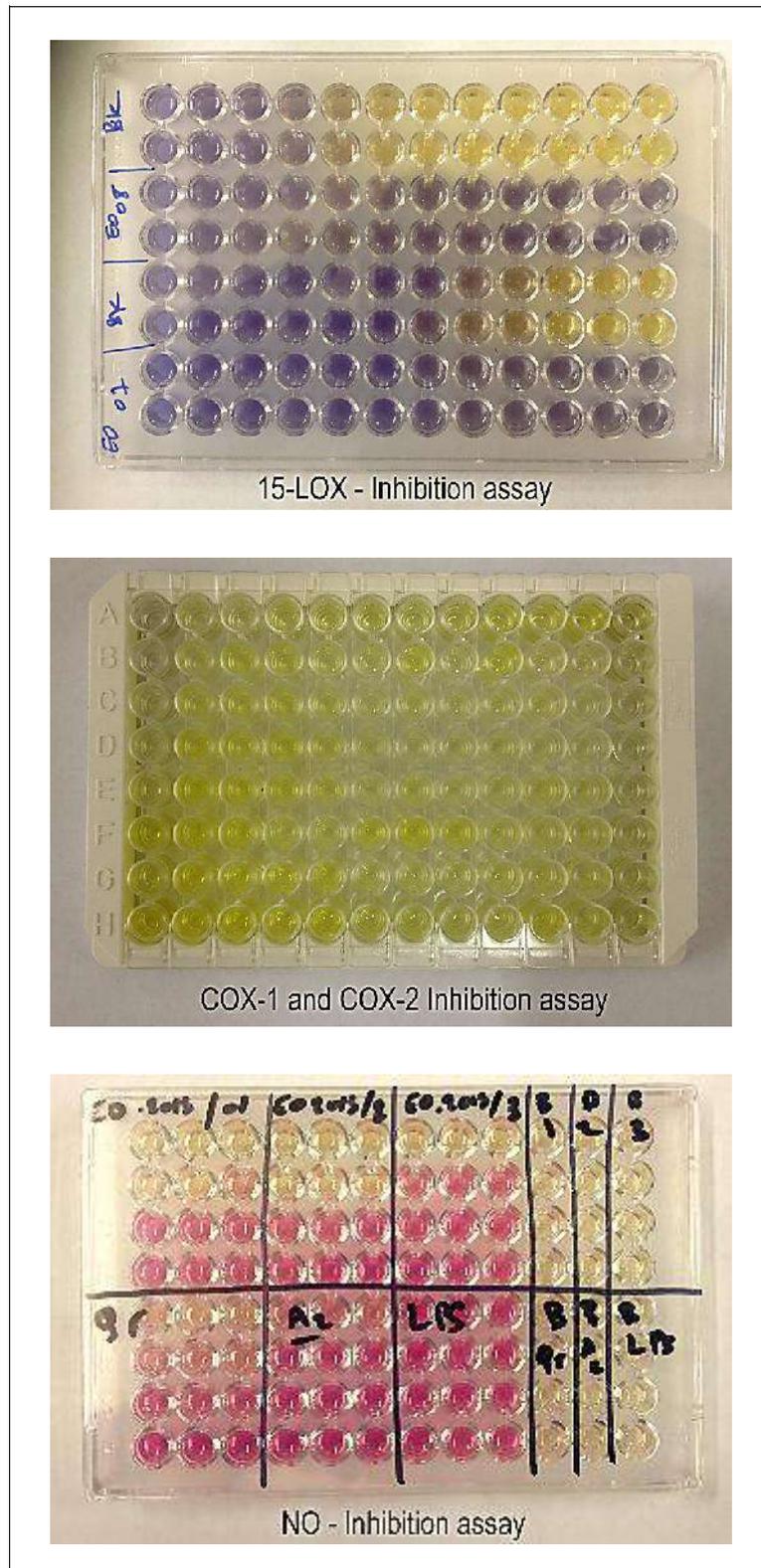


Figure 42 : Photos illustrant l'activité anti-inflammatoire par trois essais (LOX, COX et NO) sur des microplaques de 96 puits

6.3.4. Discussion

L'enzyme 15-lipoxygénase est l'enzyme clé dans la biosynthèse des leucotriènes, catalyse les premières étapes de la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes biologiquement actifs. Les leucotriènes sont considérés comme puissants médiateurs de réactions inflammatoires et allergiques, et en ce qui concerne leurs propriétés pro-inflammatoires, l'inhibition de la voie 15-lipoxygénase est considéré comme intéressant dans le traitement d'une variété de maladies inflammatoires (**Schneider & Bucar, 2005**).

El-Dakhakhny et al. (2002), a été signalé que la *thymoquinone*, qui est présent dans la fraction d'huile volatile de l'espèce *Nigellasativa* L., à une concentration allant jusqu'à 25%, exerce une forte activité d'inhibition de 5-LOX avec IC_{50} est de 0,3µg/ml.

Selon les travaux de **González et al. (2003)** sur l'inhibition de 5-LOX par les extraits méthanoliques et les huiles essentielles de la partie aérienne de l'espèce *Adesmia boronioides* ont été révélé un pourcentage d'inhibition de 50% et 90%, respectivement de 15µg/ml pour l'extrait méthanolique et de 50µg/ml pour l'huile essentielle.

Une étude récente mené par **Sharopov et al. (2015)** sur les huiles essentielles de plusieurs plantes aromatique provenant de Tadjikistan a été révélé que l'huile essentielle de l'espèce *Galaganiafragrantissima* et *Origanumtyttanthum* ont été présenter l'effet le plus fort avec des valeurs d' IC_{50} de 7,34 et 14,78µg/ml respectivement.

L'activité anti-inflammatoire peut être attribuée à la présence de l'aldéhyde insaturé (2E)-*dodecenal*, (le plus dominée au *Galaganiafragrantissima*) et de phénols (carvacrol et thymol) comme les principaux composants de l'huile essentielle d'*Origanumtyttanthum*.

Dans notre étude, Il a observé une variabilité dans le degré d'inhibition de la 15-LOX par les différents échantillons d'huiles essentielles peuvent être attribués à des différences dans leur composition chimique.

Les huiles essentielles ont été rapportées à présenter une activité anti-inflammatoire, alors que les constituants d'huiles essentielles, telles que les hydrocarbures terpéniques, des hydrocarbures sesquiterpéniques et des alcools sesquiterpéniques, ont été rapportées pour une activité inhibitrice de 5-lipoxygénase (**Alexander, 2001; Baylac & Racine, 2003**).

Les résultats obtenus à partir la littérature, indiquent évidemment que la plupart des inhibiteurs de 5-lipoxygénase se trouvent dans la classe des composés phénoliques et les composés analogues de l'acide arachidonique.

Dans la classe des composés phénoliques les inhibiteurs de 5-lipoxygénase les plus efficaces sont les flavonoïdes tels que la *quercétine*, *isoquercitrine*, *apigénine* (**Moon et al., 1999**). La quercétine est souvent utilisé comme un contrôle positif. Dans la classe des analogues de l'acide arachidonique, les inhibiteurs de 5-lipoxygénase puissants ont été trouvés les acides gras tel que l'acide linoléique, l'acide oléique (**Paubert-Braquet et al., 1997**). En outre, en raison des similitudes structurelles avec les acides gras, les aldéhydes aliphatiques (*trans-2-décénal*, *dodécane*, *décanal*) présentent une forte activité d'inhibition de la 5-lipoxygénase (**Baylac & Racine, 2003; Frum & Viljoen, 2006**).

L'analyse chimique de nos échantillons d'huiles essentielles a été révélé un pourcentage faible en acide gras (*palmitique* (0,91%) et *myristique* (6,03%)), probablement les résultats de l'inhibition de 15-LOX due à la présence de ces deux acides gras comme des composés mineurs.

Les valeurs IC₅₀ des extraits de plantes et des composés naturels pures ayant des effets inhibiteurs de 5-lipoxygénase sont principalement comprises entre 1 et 50 μM (**Schneider & Bucar, 2005**). Cependant, la recherche de la littérature a également révélé plusieurs constituants de la plante montrant des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 1 μM.

COX-1 est principalement impliquée dans la régulation des fonctions homéostatiques et est constitutivement exprimé dans une grande variété de cellules, favorisant les fonctions physiologiques, tels que la protection de la muqueuse gastrique, le contrôle du flux sanguin rénal, l'hémostase, les réponses auto-immunes, les poumons, le système nerveux central, système cardio-vasculaire et de la reproduction des fonctions (**Grosser et al., 2006**).

D'autre part, la COX-2 est une iso-forme inductible de la synthase de Prostaglandine dans les macrophages activés, les fibroblastes et les cellules endothéliales qui sont responsables de l'inflammation. Ils sont exprimés de façon significative due à des stimuli tels que des cytokines, des endotoxines, des protéines virales et des facteurs de croissance. COX-2 provient prostaglandines induisant, ce qui contribue au développement des quatre signes cardinaux de l'inflammation : la douleur, la chaleur, rougeur et gonflement, étant ainsi considéré comme la principale cible pour l'action anti-inflammatoire (**FitzGerald, 2004**).

La recherche d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 est considérée comme importante, sur la base de la théorie selon laquelle les effets secondaires, tels que des lésions gastriques, qui se sont produites à partir de l'inhibition de la COX-1, on a observé un certain médicaments anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) non-sélectifs tels que la *dexaméthasone*, *lediclofenac* et *l'indométhacine* (Lu *et al.*, 2013). D'après la littérature, très peu de composés d'origine naturelle ont été signalés comme inhibiteur sélectif de la COX-2.

Une faible inhibition dans le test COX-1 et COX-2 ne signifie pas nécessairement que la plante est sans activité anti-inflammatoire ; le composé(s) actif pourrait avoir d'autres cibles dans les processus complexes de l'inflammation.

L'oxyde nitrique (NO), qui est dérivé de l'oxydation de la L-arginine par trois isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS), à savoir neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS), est reconnu comme un médiateur et régulateur dans les réactions pathologiques, en particulier dans les réponses inflammatoires aigus (Surh *et al.*, 2001). Des niveaux élevés de NO provoquent une variété de processus physiopathologiques, y compris l'inflammation (MacMicking *et al.*, 1997) et la carcinogénèse (Ohshima & Bartsch, 1994).

Le iNOS existe principalement dans les macrophages, il est exprimé à une stimulation par des endotoxines, des facteurs de nécrose tumorale ou de LPS (agents pro-inflammatoires). Le LPS, peuvent augmenter l'oxyde nitrique (NO) de manière significative dans les macrophages par l'activation de iNOS (Park *et al.*, 2000).

L'étude menée par Lin *et al.* (2008) sur l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de fruits de *Cinnamomum insularimontanum* par le dosage de l'activité inhibitrice de l'oxyde nitrique (NO) a été montrée une activité inhibitrice de la production NO significative avec des valeurs d'IC₅₀ de 18,68 et 13,18 µg/ml, respectivement l'huile essentielle brute et le citral.

Une autre étude récente a été réalisée par Yoon *et al.* (2010) sur les effets biologiques du D-limonène sur la production de cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs inflammatoires dans les macrophages RAW 264.7, ont été montrés que le D-limonène est un inhibiteur efficace de NO induit par le LPS dans les cellules macrophages. Ces effets inhibiteurs de D-limonène comprenaient une diminution dose-dépendante de l'expression de protéine d'iNOS. En outre, l'évaluation de la viabilité des cellules après un traitement de

kératinocytes humains HaCaT avec le D-limonène à des concentrations efficaces n'a révélé aucune cytotoxicité apparente du terpène, ce qui confirme son aptitude à l'utilisation dans des applications cosmétiques.

La composition chimique de nos huiles essentielles des galles de l'espèce *Pistacia atlantica* révèle un pourcentage de 7.17% en Limonène. Probablement l'effet inhibiteur de la production de NO peut provenir de l'inhibition de l'expression de l'enzyme iNOS par la présence de Limonène dans nos échantillons d'huiles essentielles.

Donc les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Maruyama *et al.*, 2005).

6.4. Résultats de l'cytotoxicité cellulaire

La cytotoxicité des échantillons d'huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* a été déterminée par le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), en utilisant des cellules de rein de singe (*VeroCell*) et des cellules hépatique humain (*C3ACell*). Doxorubicine a été utilisé comme médicament anticancéreux standard. Les résultats sont indiqués sur la figure 43.

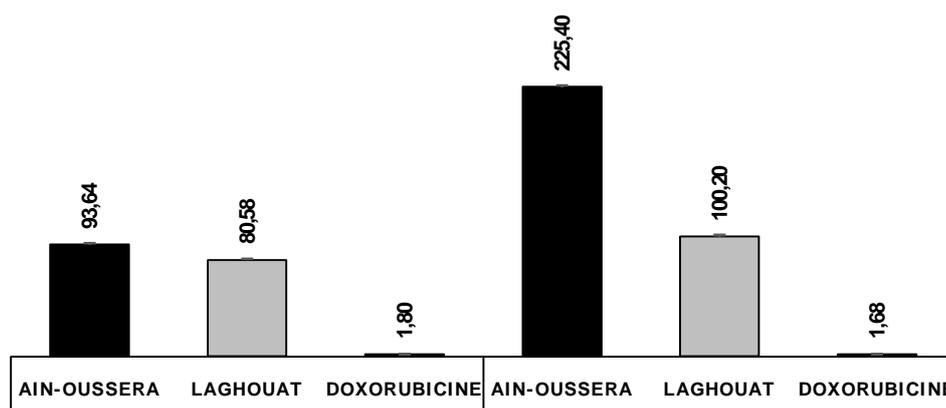


Figure 43 : Histogrammes montre les valeurs de LC₅₀ (µg/ml) des huiles essentielles des galles de *Pistaciaatlantica* Desf sur les cellules *Vero* et *C3A*

Les résultats de la cytotoxicités résumées sur la figure 43 montrent que les échantillons d'*Ain-oussera* et *Laghouat* présente une toxicité faible avec de valeurs LC₅₀ varie entre

93,64 μ g/ml -80,58 μ g/ml pour *Verocell* et de 225,40- 100,20 μ g/ml sur les cellules C3A, respectivement les échantillons d'*Ain-oussera* et de *Laghout*.

Une différence nettement a été observé en comparant ces résultats avec celle de Doxorubicine (LC₅₀ est de 1,80 μ g/ml pour *Verocell* et 1,68 μ g/ml pour les C3A).

Les valeurs de l'indice de sélectivité (SI) calculé pour chaque échantillon d'huile essentielle ont été présentées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Valeurs de l'indice de sélectivité des huiles essentielles de *P. atlantica* sur les cellules Vero Cell et C3A

| Souches | Indice de sélectivité (LC ₅₀ /CMI) | | | |
|--|---|----------------|--------------------|----------------|
| | Vero Cell | | C3A | |
| | <i>Ain-oussera</i> | <i>Laghout</i> | <i>Ain-oussera</i> | <i>Laghout</i> |
| Gram (-) | | | | |
| <i>Escherichiacoli</i> ATCC©25922 | 1,46 | 1,26 | 3,52 | 1,26 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC©14028 | 1,46 | 1,26 | 3,52 | 1,26 |
| Gram (+) | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC©25923 | 5,85 | 5,04 | 14,09 | 5,04 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC©11778 | 1,46 | 1,26 | 3,52 | 1,26 |
| Mycobactéries | | | | |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC©1441 | 0,30 | 0,26 | 0,73 | 0,26 |
| <i>Mycobacterium aurum</i> ATCC©23366 | 0,59 | 0,50 | 1,41 | 0,50 |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC©6841 | 0,09 | 0,08 | 0,22 | 0,08 |
| Levures | | | | |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©24433 | 0,73 | 0,63 | 1,76 | 0,63 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC©18804 | 2,93 | 2,52 | 7,04 | 2,52 |
| <i>Candida tropicalis</i> Isolat | 2,93 | 2,52 | 7,04 | 2,52 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> Isolat | 1,46 | 1,26 | 3,52 | 1,26 |

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 17, les valeurs de l'indice de sélectivité (SI) variaient de 0,09 à 5,85 pour les *Verocell* et de 0,08 à 14,09 pour les cellules C3A.

Les échantillons d'huiles essentielles d'*Ain-oussera* vis-à-vis les cellules Vero ont été révélés des indices de sélectivité supérieur à 2 avec des valeurs de 5,85 ; 2,93 et 2,93 pour *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC©18804 et *Candida tropicalis* Isolat respectivement. Pour les même souches, les échantillons d'huiles essentielles de *Laghout* a été révèles des indices de sélectivité de 5,04 ; 2,52 et 2,52.

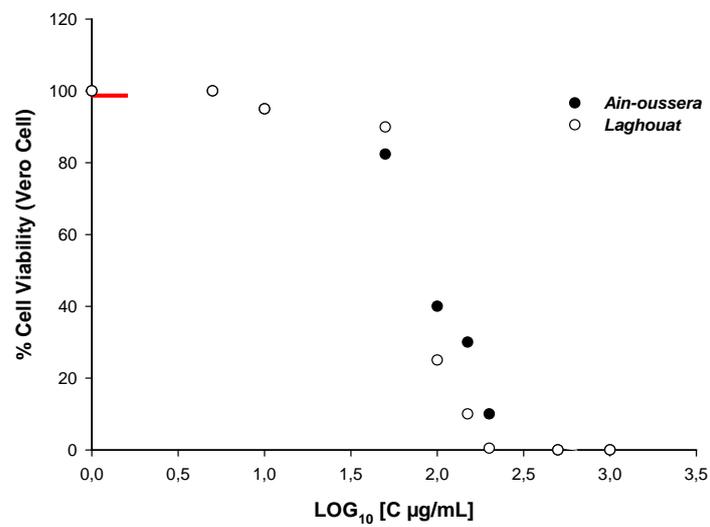
La cytotoxicité des huiles essentielles d'*Ain-oussera* et *Laghout* vis-à-vis les cellules C3A a été montré des valeurs d'indice de sélectivité supérieurs à 2 sur l'*Escherichiacoli*,

Salmonella typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* ATCC©18804, *Candida tropicalis* et *Cryptococcus neoformans*.

Des indices inférieurs à 1 ont été révélés sur les souches mycobactériennes vis-à-vis les *VeroCell* et *C3A*.



Figure 44 : Photo illustre la cytotoxicité des huiles essentielles en utilisant le test MTT



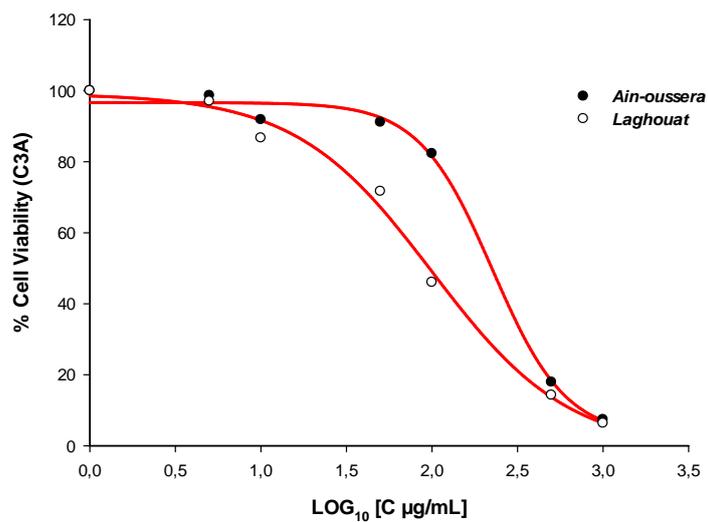


Figure 45 : Courbe présente l'effet des huiles essentielles sur le pourcentage de viabilité des cellules (*Vero* et *C3A*)

6.4.1. Discussion

Pour un nouveau médicament anti-infectieux pour être utile dans l'application clinique, la préparation doit être sélectivement toxique vers le microorganisme ciblé sans effets majeurs sur les cellules hôtes ou des interférences avec les voies physiologiques normales.

Par conséquent, les deux huiles essentielles étudiées (*Ain-oussera* et *Laghout*) ont été testés pour leur toxicité vis-à-vis *VeroCell* et les lignées cellulaires normales C3A. La doxorubicine est couramment utilisé pour traiter certaines leucémies et les lymphomes de Hodgkin, ainsi que les cancers de la vessie, du sein, de l'estomac, du poumon, des ovaires et d'autres (Tacar *et al.*, 2013).

Selon le programme de dépistage des plantes *TheUSNational Cancer Institute* (NCI) dans la catégorisation de la sécurité des extraits bruts, les valeurs de LC₅₀ inférieur ou égale de 20µg/ml sont considérés comme cytotoxique (Kueté *et al.*, 2011). Dans cette étude, des valeurs de LC₅₀ sont supérieures à 20µg/ml ont été enregistrés pour les deux huiles essentielles testées, par conséquent, leur toxicité pourrait considérer comme relativement faible.

Les valeurs de l'indice de sélectivité indiquent la sécurité relative de l'extrait végétal, ce qui reflète le rapport entre la toxicité et l'activité. Un indice de sélectivité élevée est une indication d'une grande marge de sécurité entre la concentration de l'extrait qui est capable de tuer les bactéries et la concentration qui est toxique pour les cellules mammifères dans ce cas.

Fait intéressant, l'indice de sélectivité obtenu avec l'huile essentielle de *Pistaciaatlantica* recueillies auprès d'*Ain-Oussera* était prometteur.

Une valeur d'indice de sélectivité supérieur à 1 pour un échantillon, augmente la probabilité que ses composants toxiques et antibactériens sont différents (Cho-Ngwa *et al.*, 2010). Ainsi, l'élimination de ces composants toxiques par la manipulation de cette huile essentielle peut donner un produit antimicrobien plus approprié.

Le facteur nucléaire-kB (NF-kB) est un facteur de transcription qui est très fréquemment activé dans les tumeurs et impliqués dans la croissance tumorale, la progression et la résistance à la chimiothérapie.

Les travaux de **Zhou et al. (2004)**, sur les cellules THP-1 prétraitées avec *-pinène*, ont montré que la translocation de NF- κ B a été fortement réduite. Même si elle constitue un puissant inhibiteur de NF- κ B, pour inhiber la translocation, *-pinène* n'a pas réduit la viabilité de ces cellules.

Le limonène est, aussi, capable d'inhiber la signalisation NF- κ B dans les cellules de lymphome et induit l'apoptose dépendant de NF- κ B (**Berchtold et al., 2005**).

Sur la base de la littérature, dans la plupart des cas, les principaux constituants des huiles essentielles (le bisabolol, le carvacrol, le carvone, le cinnamaldéhyde, le citronellol, l'eucalyptol, l'eugénol, le farnesol, le farnesène, le géraniol, le limonène, le linalol, le nérol, le saffrole, le santalol, le terpinéol, et le thymol) ont été analysés.

Habituellement, les composants majoritaires révèlent un assez bon potentiel biochimique, biophysique et thérapeutique des huiles essentielles desquels ils ont été isolés (**Ipek et al., 2005**). Cependant, l'efficacité thérapeutique dépend de la concentration du composant principal, et de sa combinaison avec les autres composés mineurs (**Hoet et al., 2006**).

En outre, il est probable que plusieurs éléments tels que la pénétration cellulaire, la distribution cellulaire, le magnétisme hydrophile et lipophile, la fixation sur les parois cellulaires et sur les membranes ainsi que la couleur, la densité, le parfum et la texture des huiles essentielles sont, également, affectés par l'ensemble des composés de l'huile essentielle (**Cal, 2006**).

La pénétration et la diffusion dans la cellule sont très importantes, car la répartition de l'huile dans les compartiments de cellule détermine l'intensité des effets thérapeutiques. A des fins biologiques et thérapeutiques, il est plus utile d'étudier l'huile entière plutôt que certains de ses composants individuels parce que le concept de synergie et d'antagonisme semble être important (**Sharma et al., 2013**).

7. CONCLUSION

Sur la base des résultats de cette partie de l'étude, nous pouvons conclure que les huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf., sont capable d'inhiber, in-vitro, la croissance de différentes souches de *Candida albicans*, comparées autres souches microbiennes ; avec une toxicité, relativement, faible vis-à-vis des cellules *Vero* et *C3A*.

Les valeurs de l'indice de sélectivité dans cette étude, qui indiquent la sécurité relative de nos échantillons en huiles essentielles, montrent une faible toxicité avec une bonne activité antimicrobienne.

Les huiles essentielles présentent une activité antioxydante modérée en terme de piégeage des radicaux libres. Cependant, elles présentent une activité anti-inflammatoire importante, vis-à-vis de la production de NO et l'inhibition de 15-lipooxygénase.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmad, I.; Aqil, F. & Owais, M. (2006). *Modern Phytomedecine*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 405p.
- Ait-Ouazzou, Abdenour; Cherrat, Lamia; Espina, Laura; Lorán, Susana; Rota, Carmen & Pagán, Rafael. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 320-329.
- Alexander, Michael. (2001). Aromatherapy & immunity: How the use of essential oil aids immune potentiality: Part 3 immune responses to inflammation and essential oils useful in inhibiting them. *International Journal of Aromatherapy*, 11(4), 220-224.
- Andriopoulou, Paraskevi; Navarro, Pilar; Zanetti, Adriana; Lampugnani, Maria Grazia & Dejana, Elisabetta. (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(10), 2286-2297.
- Archambaud, M. (2001). Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. *Brûlures, Ed. Carr. Méd., 1*.
- Badarinath, AV; Rao, K Mallikarjuna; Chetty, C Madhu Sudhana; Ramkanth, S; Rajan, TVS & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475.
- Barbosa-Pereira, Letricia; Cruz, José Manuel; Sendón, Raquel; de Quirós, Ana Rodríguez Bernaldo; Ares, Ana; Castro-López, Mar, . . . Paseiro-Losada, Perfecto. (2013). Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, 31(1), 236-243.
- Barnes, Peter J. (1994). Cytokines as mediators of chronic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 150(5_pt_2), S42-S49.
- Barnes, Peter J. (1996). Pathophysiology of asthma. *British journal of clinical pharmacology*, 42(1), 3-10.
- Baser, K Hüsnü Can; Demirci, Betül; Iscan, Gökalp; Hashimoto, Toshihoro; Demirci, Fatih; Noma, Yoshiaki & Asakawa, Yoshinori. (2006). The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(2), 222-225.

- Basile, Adriana; Senatore, Felice; Gargano, Rosalba; Sorbo, Sergio; Del Pezzo, Marisa; Lavitola, Alfredo, . . . Vuotto, Maria Luisa. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 240-248.
- Baylac, Sabine & Racine, Philippe. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2), 138-142.
- Belaïche, T.; Tantaoui-Elaraki, A. & Ibrahimy, A. (1995). Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. *Sciences Des Aliments*, 15, 571-578.
- Bell, Chris & Kyriakides, Alec. (1998). *E. coli: A practical approach to the organism and its control in foods*: Blackie Academic and Professionel, London (United Kingdom), 200p.
- Belyi, Yuri F. (1996). *Mycobacterium Intracellular Parasitism of Microorganisms* (pp. 149-159). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Benabderrahmane, M.; Benali, M.; Aouissat, H. & Jordan Bue, M.-J. (2009). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie*, 7, 304–308.
- Benzie, IF & Strain, JJ. (1998). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
- Benzie, Iris FF & Strain, JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berchtold, Craig M; Chen, Kai-Shun; Miyamoto, Shigeki & Gould, Michael N. (2005). Perillyl alcohol inhibits a calcium-dependent constitutive nuclear factor- B pathway. *Cancer research*, 65(18), 8558-8566.
- Billerbeck, V. -G. (2007). Essential oils and antibiotic-resistant bacteria. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
- Blois, Marsden S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bounatirou, S.; Smiti, S.; Miguel, M.G. ; Faleiro, L.; Rejeb, M.N.; Neffati, M. , . . . Pedro, L.G. (2007). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of

- the Essential Oils Isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem*, 105, 146-155.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.
- Bueno, J.; Escobar, P.; Martinez, JR.; Leal, SM. & Stashenko, EE. (2011). Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Nat Prod Commun*, 11(6), 1743-1748.
- Burns, Jane L; Saiman, Lisa; Whittier, Susan; Larone, Davise; Krzewinski, Jay; Liu, Zhenling, . . . Jones, Ronald N. (2000). Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 38(5), 1818-1822.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 223-253.
- Cal, Krzysztof. (2006). Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta medica*, 72(4), 311-316.
- Cao, Guohua; Alessio, Helaine M & Cutler, Richard G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.
- Capra, Valérie; Thompson, Miles D; Sala, Angelo; Cole, David E; Folco, Giancarlo & Rovati, G Enrico. (2007). Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Medicinal research reviews*, 27(4), 469-527.
- Carson, CF; Hammer, KA & Riley, TV. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 50-62.
- Catalá, Angel. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1482-1495.
- avar, Sanja; Maksimovi, Milka; Vidic, Danijela & Pari, Adisa. (2012). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 479-485.

- Cayman Chemical. (2013). COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Item 560131). from <https://www.caymanchem.com/product/560131>
- Chanda, S. & Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981-996.
- Cho-Ngwa, Fidelis; Abongwa, Melanie; Ngemenya, Moses & Nyongbela, Kennedy. (2010). Selective activity of extracts of *Margaritaria discoidea* and *Homalium africanum* on *Onchocerca ochengi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 62.
- Choma, Irena M & Grzelak, Edyta M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691.
- Chung, G. A.; Aktar, Z.; Jackson, S. & Duncan, K. (1995). High-throughput screen for detecting antimycobacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(10), 2235-2238.
- Chung, Lip Yong; Soo, Wei Kwan; Chan, Kit Yee; Mustafa, Mohd Rais; Goh, Swee Hock & Imiyabir, Zamrie. (2009). Lipoxygenase inhibiting activity of some Malaysian plants. *Pharmaceutical Biology*, 47(12), 1142-1148.
- Cock, IE. (2008). Antimicrobial Activity of *Aloebarbadensis* Miller Leaf Gel Components. *Int. J. Microbiol.*, 4(2).
- Conforti, Filomena; Sosa, Silvio; Marrelli, Mariangela; Menichini, Federica; Statti, Giancarlo A; Uzunov, Dimitar, . . . Della Loggia, Roberto. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.
- Copp, B. R. (2003). Antimycobacterial natural products. *Nat Prod Rep*, 20(6), 535-557.
- Cosentino, S.; Tuberoso, C. I.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol*, 29(2), 130-135.
- Dangles, Olivier; Dufour, Claire & Bret, Stephan. (1999). Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(4), 737-744.
- Dewanjee, Saikat; Gangopadhyay, Moumita; Bhattacharya, Niloy; Khanra, Ritu & Dua, Tarun K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84.

- Didry, N.; Dubreuil, L. & Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm Acta Helv*, 69(1), 25-28.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88, 308-316.
- Dubois, Raymond N; Abramson, Steven B; Crofford, Leslie; Gupta, Rajnish A; Simon, Lee S; Van De Putte, Leo BA & Lipsky, Peter E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*, 12(12), 1063-1073.
- El-Dakhakhny, M; Madi, NJ; Lembert, N & Ammon, HPT. (2002). Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of ethnopharmacology*, 81(2), 161-164.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, 64(8), 711-713.
- FitzGerald, Garret A. (2004). Coxibs and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 351(17), 1709-1711.
- Foote, Christopher S & Denny, Robert W. (1968). Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by. beta.-carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 90(22), 6233-6235.
- Frum, Yakov & Viljoen, AM. (2006). In vitro 5-lipoxygenase and anti-oxidant activities of South African medicinal plants commonly used topically for skin diseases. *Skin pharmacology and physiology*, 19(6), 329-335.
- Garrett, RH & Grisham, CM. (2000). *Biochimie* (2 édition ed.): De Boeck et Larcier, 1235p.
- Geronikaki, Athina A & Gavalas, Antonios M. (2006). Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 9(6), 425-442.
- Gil, Lizette; Martinez, Gregorio; González, Ivón; Tarinas, Alicia; Álvarez, Alejandro; Giuliani, A, . . . León, Olga Sonia. (2003). Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacological research*, 47(3), 217-224.
- González, S. B.; Houghton, P. J. & Houlst, J. R. S. (2003). The activity against leukocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronioides* Hook.f. *Phytotherapy Research*, 17(3), 290-293.

- Gourine, N.; Yousfi, M.; Bombarda, I.; Nadjemi, B.; Stocker, P. & Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops Products*, 31, 203-208.
- Greenwood, D. (1989). *Antibiotic sensitivity testing*. England: Oxford ; New York : Oxford University Press, 91-100p.
- Griendling, Kathy K. (2005). ATVB In Focus Redox Mechanisms in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(2), 272-273.
- Grosser, Tilo; Fries, Susanne & FitzGerald, Garret A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 4-15.
- Haeggström, Jesper Z; Rinaldo-Matthis, Agnes; Wheelock, Craig E & Wetterholm, Anders. (2010). Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 135-139.
- Halliwell, Barry & Gutteridge, John MC. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126.
- Hata, Aaron N & Breyer, Richard M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*, 103(2), 147-166.
- Hernández, T; Canales, M; Avila, JG; García, AM; Martínez, A; Caballero, J, . . . Lira, RI. (2005). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf.(Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 551-554.
- Hoet, Sara; Stévigny, Caroline; Hérent, Marie-France & Quetin-Leclercq, Joëlle. (2006). Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta medica*, 72(5), 480.
- Hostettmann, K; Terreaux, Ch; Marston, A & Potterat, O. (1997). The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *JPC. Journal of planar chromatography, modern TLC*, 10(4), 251-257.
- Houée-Levin, C.; Sicard-Roselli, C. & Bergès, J. (2005). *Chimie et Biochimie radicalaires* (Collection "Echelles" ed.): Belin, 160p.
- Hughes, Gillian; Murphy, Michael P & Ledgerwood, Elizabeth C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor B to

- modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochemical journal*, 389(1), 83-89.
- Huygen, C. (1970). Reaction of nitrogen dioxide with Griess-type reagents. *Analytical chemistry*, 42(3), 407-409.
- Hyldgaard, Morten; Mygind, Tina & Meyer, Rikke Louise. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.
- Inouye, Shigeharu; Takizawa, Toshio & Yamaguchi, Hideyo. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Ipek, Evrim; Zeytinoglu, Hulya; Okay, Sezer; Tuylu, Berrin A; Kurkcuoglu, Mine & Baser, K Husnu Can. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(3), 551-556.
- Kalemba, D & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kelly, Linda M; Jacobs, Michael R & Appelbaum, Peter C. (1999). Comparison of Agar Dilution, Microdilution, E-Test, and Disk Diffusion Methods for Testing Activity of Cefditoren against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), 3296-3299.
- Koutsoudaki, Christina; Krsek, Martin & Rodger, Alison. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7681-7685.
- Kuete, V.; Krusche, B.; Youns, M.; Voukenga, I.; Fankam, A. G.; Tankeo, S., . . . Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol*, 134, 803-812.
- Kunkel, Steven L. ; Lukacs, Nickolas & Strieter, Robert M. (1996). Cytokines and Inflammatory Disease. In A. E. Sirica (Ed.), *Cellular and molecular pathogenesis* (pp. 23-36). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Lachowicz, KJ; Jones, GP; Briggs, DR; Bienvenu, FE; Wan, J; Wilcock, A & Coventry, MJ. (1998). The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), 209-214.

- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*, 18(6), 435-448.
- Lawrence, B.M. (1993). *A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries*. In: Janick J, Simon JE, eds. *New crops: exploration, research, commercialization*: John Wiley & Sons, Inc, NY 1, 6-9., 6-9p.
- Lee, Mu Hong; Lee, Jeong Min; Jun, Sung Hoon; Lee, Seung Ha; Kim, Nam Wook; Lee, Jun Ho, . . . Lim, Beong Ou. (2007). The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *Journal of ethnopharmacology*, 112(1), 49-54.
- Lewin, G; Magin, DV; Ismailov, D Yu & Popov, IN. (2000). Photochemiluminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems. Mathematic modeling. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 46(4), 419-426.
- Li, Yunbo & Trush, Michael A. (1994). Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Research*, 54(7 Supplement), 1895s-1898s.
- Lin, Chien-Tsong; Chen, Chi-Jung; Lin, Ting-Yu; Tung, Judia Chen & Wang, Sheng-Yang. (2008). Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technology*, 99(18), 8783-8787.
- Lis-Balchin, M & Deans, SG. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(6), 759-762.
- Lu, Mei-Chin; El-Shazly, Mohamed; Wu, Tung-Ying; Du, Ying-Chi; Chang, Tun-Tschu; Chen, Chieh-Fu, . . . Chang, Fang-Rong. (2013). Recent research and development of *Antrodia cinnamomea*. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), 124-156.
- MacMicking, John; Xie, Qiao-wen & Nathan, Carl. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15(1), 323-350.
- MacNaughton, Wallace K. (2006). CHAPTER 45 - Mechanisms and Consequences of Intestinal Inflammation A2 - Johnson, Leonard R *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fourth Edition)* (pp. 1115-1135). Burlington: Academic Press.
- Makhafola, Tshepiso J.; McGaw, Lyndy J. & Eloff, Jacobus N. (2014). In vitro cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. *South African Journal of Botany*, 91(0), 9-13.

- Margalit, Danielle N.; Kasperzyk, Julie L.; Martin, Neil E.; Sesso, Howard D.; Gaziano, J. Michael; Ma, Jing, . . . Mucci, Lorelei A. (2012). Beta-Carotene Antioxidant Use During Radiation Therapy and Prostate Cancer Outcome in the Physicians' Health Study. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 83(1), 28-32.
- Marone, G.; Granata, F.; Spadaro, G.; Onorati, A. M. & Triggiani, M. (1999). Antiinflammatory effects of oxatomide. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 9(4), 207-214.
- Maruyama, Naho; Sekimoto, Yuka; Ishibashi, Hiroko; Inouye, Shigeharu; Oshima, Haruyuki; Yamaguchi, Hideyo & Abe, Shigeru. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2(1), 1.
- Mathur, Ramkumar; Oh, Hyunju; Zhang, Dekai; Park, Sung-Gyoo; Seo, Jin; Koblansky, Alicia, . . . Ghosh, Sankar. (2012). A Mouse Model of Salmonella Typhi Infection. *Cell*, 151(3), 590-602.
- McGaw, L. J.; Lall, N.; Hlokwe, T. M.; Michel, A. L.; Meyer, J. J. & Eloff, J. N. (2008). Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. *Biol Pharm Bull*, 31(7), 1429-1433.
- Meier, Beate; Radeke, HH; Selle, S; Younes, M; Sies, H; Resch, K & Habermehl, GG. (1989). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- . *Biochemical Journal*, 263(2), 539-545.
- Menvielle-Bourg, F. Joanny. (2005). Superoxide dismutase (SOD), the powerful natural antioxidant, now available orally. *Phytotherapie*, 3(3), 118-121.
- Min, Hye-Young; Song, Su-Hyun; Lee, Boeun; Kim, Sanghee & Lee, Sang Kook. (2010). Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production by Antofine and Its Analogues in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Chemistry & biodiversity*, 7(2), 409-414.
- Molyneux, Philip. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Moon, Tae Chul; Park, JO; Chung, KW; Son, KH; Kim, HP; Kang, SS, . . . Chung, KC. (1999). Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. *Yakhak Hoeji*, 43(1), 117-123.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mossa, J. S.; El-Feraly, F. S. & Muhammad, I. (2004). Antimycobacterial constituents from *Juniperus procera*, *Ferula communis* and *Plumbago zeylanica* and their in vitro synergistic activity with isonicotinic acid hydrazide. *Phytother Res*, 18(11), 934-937.
- Mu, Mya Mya; Chakravortty, Dipshikha; Sugiyama, Tsuyoshi; Koide, Naoki; Takahashi, Kazuko; Mori, Isamu, . . . Yokochi, Takashi. (2001). The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of endotoxin research*, 7(6), 431-438.
- Mueller, Cornelius FH; Laude, Karine; McNally, J Scott & Harrison, David G. (2005). Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(2), 274-278.
- Nardi, GM; Junior, JM Siqueira; Delle Monache, F; Pizzolatti, MG; Ckless, K & Ribeiro-do-Valle, RM. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine*, 14(2), 115-122.
- Nascimento, Gislene GF; Locatelli, Juliana; Freitas, Paulo C & Silva, Giuliana L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 247-256.
- Neish, Andrew S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.
- Ogawa, Yoshiko & Calhoun, William J. (2006). The role of leukotrienes in airway inflammation. *Journal of allergy and clinical immunology*, 118(4), 789-798.
- Ohshima, Hiroshi & Bartsch, Helmut. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 305(2), 253-264.
- Paduch, Roman; Kandefler-Szersze, Martyna; Trytek, Mariusz & Fiedurek, Jan. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 315-327.
- Park, Young Chul; Rimbach, Gerald; Saliou, Claude; Valacchi, Giuseppe & Packer, Lester. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- secretion, and NF- B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS letters*, 465(2), 93-97.

- Paubert-Braquet, M; Huerta, J-M Mencia; Cousse, H & Braquet, P. (1997). Effect of the lipidic lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on the ionophore A23187-stimulated production of leukotriene B₄ (LTB₄) from human polymorphonuclear neutrophils. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 57(3), 299-304.
- Pawar, V. C. & Thaker, V. S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49(4), 316-323.
- Peana, Alessandra Tiziana; D'Aquila, Paolo Stefano; Panin, Francesca; Serra, Gino; Pippia, P & Moretti, Mario Domenico Luigi. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726.
- Peiwu, Li; Hopia, Anu; Jari, S; Yrjönen, Teijo & Vuorela, Heikki. (1999). *TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology*. Paper presented at the Proceedings of the 10 th International Rapeseed Congress.
- Randi, Giorgia. (2012). Gallbladder Cancer. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 1490-1493). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rekha, C; Poornima, G; Manasa, M; Abhipsa, V; Devi, J Pavithra; KUMAR, H T VIJAY & KEKUDA, T R PRASHITH. (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 1(2), 303-310.
- Remmal, A.; Bouchikhi, T.; Tantaoui-Elaraki, A. & Ettayebi, M. (1993). Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J Pharm Belg*, 48(5), 352-356.
- Rezaie, Mitra; Farhoosh, Reza; Sharif, Ali; Asili, Javad & Iranshahi, Mehrdad. (2015). Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull essential oil. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6784-6790.
- Rhee, In Kyung; van de Meent, Michiel; Ingkaninan, Kornkanok & Verpoorte, Robert. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 217-223.

- Rice-evans, Catherine A; Miller, Nicholas J; Bolwell, Paul G; Bramley, Peter M & Pridham, John B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- Rios, JL; Recio, MC & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149.
- Rosato, A.; Vitali, C.; De Laurentis, N.; Armenise, D. & Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727-732.
- Rosengren, Åsa; Fabricius, Ane; Guss, Bengt; Sylvén, Susanne & Lindqvist, Roland. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International journal of food microbiology*, 144(2), 263-269.
- Russo, Cristina & Polosa, Riccardo. (2005). TNF- as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical science*, 109(2), 135-142.
- Sánchez-Alcázar, José A; Schneider, Erasmus; Hernández-Muñoz, Inmaculada; Jesús, RUIZ-CABELLO; Siles-Rivas, Eva; de la TORRE, Paz, . . . Garesse, Rafael. (2003). Reactive oxygen species mediate the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells. *Biochemical Journal*, 370(2), 609-619.
- Sánchez-Moreno, Concepción. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sánchez-Moreno, Concepción; Larrauri, Jose A & Saura-Calixto, Fulgencio. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Saxena, Geeta; Farmer, Susan; Towers, GHN & Hancock, REW. (1995). Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical analysis*, 6(3), 125-129.
- Schneider, Isabella & Bucar, Franz. (2005). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase [sol] cyclooxygenase. *Phytotherapy Research*, 19(2), 81-102.

- Seidel, V. & Taylor, P. W. (2004). In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 23(6), 613-619.
- Shai, L. J.; McGaw, L. J.; Masoko, P. & Eloff, J. N. (2008). Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany*, 74(4), 677-684.
- Sharma, Ajay; Bajpai, Vivek K & Shukla, Shruti. (2013). Sesquiterpenes and cytotoxicity *Natural Products* (pp. 3515-3550): Springer.
- Sharopov, Farukh; Braun, Markus Santhosh; Gulmurodov, Isomiddin; Khalifaev, Davlat; Isupov, Salomiddin & Wink, Michael. (2015). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Tajikistan. *Foods*, 4(4), 645-653.
- Sifi, I.; Gourine, N.; Gaydou, E. M. & Yousfi, M. (2015). Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Nat Prod Res*, 29(20), 1945-1949.
- Sonboli, Ali; Eftekhari, Fereshteh; Yousef Zadi, Morteza & Kanani, Mohammad Reza. (2005). Antibacterial and antioxidant activity and essential oil composition of *Grammosciadium scabridum* Boiss. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences*, 60(7-8), 30-34.
- Soylu, E. M.; Soyulu, S. & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161(2), 119-128.
- Sprague, Alexander H. & Khalil, Raouf A. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(6), 539-552.
- Stanikunaite, Rita; Khan, Shabana I; Trappe, James M & Ross, Samir A. (2009). Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. *Phytotherapy Research*, 23(4), 575-578.
- Steward, Christine D; Stocker, Sheila A; Swenson, Jana M; O'Hara, Caroline M; Edwards, Jonathan R; Gaynes, Robert P, . . . Tenover, Fred C. (1999). Comparison of Agar Dilution, Disk Diffusion, MicroScan, and Vitek Antimicrobial Susceptibility Testing Methods to Broth Microdilution for Detection of Fluoroquinolone-Resistant Isolates of the Family Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 544-547.
- Stojiljkovi, Vesna; Todorovi, Ana; Peji, Snežana; Kasapovi, Jelena; Sai i, Zorica S; Radlovi, Nedeljko & Pajovi, Snežana B. (2009). Antioxidant status and lipid

- peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. *Clinical biochemistry*, 42(13), 1431-1437.
- Surh, Young-Joon; Chun, Kyung-Soo; Cha, Hyun-Ho; Han, Seong Su; Keum, Young-Sam; Park, Kwang-Kyun & Lee, Sang Sup. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 243-268.
- Tacar, Oktay; Sriamornsak, Pornsak & Dass, Crispin R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157-170.
- Tassou, C.C. & Nychas, G.J.E. (1995). Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int Biodeterior Biodegradation*, 411-420.
- Tham, Wilhelm & Danielsson-Tham, Marie Louise. (2013). *Bacillus cereus* Food Poisoning *Food associated pathogens* (1 ed., pp. 20-33): CRC Press.
- Ultee, A.; Bennik, M. H. & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 68(4), 1561-1568.
- Vadas, Peter; Gold, Milton; Perelman, Boris; Liss, Gary M; Lack, Gideon; Blyth, Thomas, . . . Yeung, Jupiter. (2008). Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *New England Journal of Medicine*, 358(1), 28-35.
- Van de Weerd, ML; Desmecht, Daniel & Lekeux, Pierre. (1995). Physiologie et physiopathologie du facteur d'activation plaquettaire et perspectives thérapeutiques de ses antagonistes. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 139, 99-119.
- Vecchiarelli, A. & Monari, C. (2012). Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. *Mycopathologia*, 173(5), 375-386.
- Vouldoukis, Ioannis; Conti, Marc; Krauss, Pascal; Kamate, Caroline; Blazquez, Samantha; Tefit, Maurel, . . . Dugas, Bernard. (2004). Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytotherapy Research*, 18(12), 957-962.
- Waslidge, Neil B & Hayes, David J. (1995). A colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity suitable for use in a high throughput assay format. *Analytical biochemistry*, 231(2), 354-358.

- Xie, WL; Chipman, Jeffrey G; Robertson, Donald L; Erikson, RL & Simmons, Daniel L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2692-2696.
- Yakhlef, G.; Laroui, S.; Hambaba, L.; Aberkane, M.-C. & Ayachi, A. (2011). Assessment of antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Laurus nobilis*, plants which are used in traditional medicine. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.
- Yoon, Weon-Jong; Lee, Nam Ho & Hyun, Chang-Gu. (2010). Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *Journal of oleo science*, 59(8), 415-421.
- Yoshikawa, Kazuko; Inoue, Megumi; Matsumoto, Yuki; Sakakibara, Chika; Miyataka, Hideki; Matsumoto, Hitoshi & Arihara, Shigenobu. (2005). Lanostane Triterpenoids and Triterpene Glycosides from the Fruit Body of *Fomitopsis pinicola* and Their Inhibitory Activity against COX-1 and COX-2. *Journal of natural products*, 68(1), 69-73.
- Zaika, Laura L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
- Zhou, JY; Tang, FD; Mao, GG & Bian, RL. (2004). Effect of α -pinene on nuclear translocation of NF- κ B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 25(4), 480-484.

Conclusion Générale

1. CONCLUSION

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent.

Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicaux tels que les antimicrobiennes, les anti-inflammatoires et les antioxydantes.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires des galls du Pistachier de l'Atlas qui poussent sauvagement dans les régions arides et semi-arides de l'Algérie.

Rappelant que, l'aridité du milieu saharien par rapport aux autres endroits biologiques a développé des modifications non seulement au niveau de la morphologie mais aussi au niveau du métabolisme de la plante.

Le choix de cette plante est basé sur quelques données ethno-pharmacologiques (traiter les maux d'estomac, la toux, le stress, anti-diarrhéique, désodorisant, le diabète et les infections oculaires).

Dans cette étude, la première partie est l'analyse de la composition chimique d'échantillons d'huile essentielle de galls de l'espèce *P. atlantica*.

L'analyse statistique multivariée par la méthode ACP et la méthode CAH a été utilisée dans cette étude scientifique qui a impliqué l'étude d'un grand nombre d'échantillons d'huile essentielle de galls de l'espèce *P. atlantica* provenant de différentes régions (*Ainoussera*, *Laghout*, *Kheneg* et *Tilghemt*), a révélé l'existence d'un deuxième chemotype (-pinène / sabinène / terpinène-4-ol), non encore publié précédemment. Ce nouveau chemotype se caractérise par des teneurs plus élevées de *sabinène* et *terpinène-4-ol*.

En revanche, il a été constaté que les rendements (%v/m) en huiles essentielles de galls verts (jusqu'à 1,89%) sont effectivement plus importants et plus intéressants que ceux qui ont été enregistrés pour les galls bruns.

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antiinflammatoire des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* et leur toxicité cellulaire.

Les résultats de cette étude, montre que les huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf., capable d'inhiber in-vitro la croissance de différentes espèces de *Candida albicans* par rapport les autres souches microbiennes, avec une toxicité faible vis-à-vis des cellules *Vero* et *C3A*.

Les valeurs de l'indice de sélectivité indiquent la sécurité relative de l'huile essentielle, ce qui reflète le rapport entre la toxicité et l'activité.

Les huiles essentielles présentent une activité antioxydante modérée en termes de piégeage des radicaux libres. Par contre, ont été présentée une activité anti-inflammatoire importante vis-à-vis la production de NO et l'inhibition de 15-lipooxygénase (IC₅₀ de 05,62µg/ml).

2. PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer l'activité antimicrobienne, antioxydante et antiinflammatoire du Pistachier de l'Atlas et de sélectionner les activités biologiques les plus importants, afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ❖ Elargir le panel des activités antifongique (*Candida albicans*) in vitro et in vivo.
- ❖ Entreprendre une expérimentation qui permettrait de mettre le point sur une éventuelle action synergique ou antagoniste des composés des huiles essentielles.
- ❖ Caractériser la ou les molécules responsables de l'activité antimicrobienne et antiinflammatoire puis d'étudier leurs modes d'action.
- ❖ Étudier l'activité antiinflammatoire des extraits phénoliques et lipidiques des galles du *P. atlantica*.

Annexe :

Vero Cells (Cell Culture results)

Parameter Values

| | | | |
|-----------|---------|---------|----------|
| min | -1,0325 | 0,7299 | 4,2884 |
| max | 98,847 | 98,6039 | 100,7594 |
| logEC50 | 1,9687 | 1,904 | 1,4215 |
| Hillslope | -2,3549 | -4,6614 | -2,7475 |
| EC50 | 93,04 | 80,16 | 26,39 |

Std. Errors

| | | | |
|-----------|--------|--------|--------|
| min | 3,4167 | 1,6663 | 1,2722 |
| max | 2,5641 | 1,6666 | 2,0384 |
| logEC50 | 0,0304 | 0,0159 | 0,043 |
| Hillslope | 0,3421 | 0,5434 | 0,3726 |

95% Confidence Intervals

| | | | |
|-----------|------------------|------------------|-----------------|
| min | -9,815 to 7,751 | -3,554 to 5,013 | 1,018 to 7,559 |
| max | 92,26 to 105,4 | 94,32 to 102,9 | 95,52 to 106, |
| logEC50 | 1,891 to 2,047 | 1,863 to 1,945 | 1,311 to 1,532 |
| Hillslope | -3,234 to -1,476 | -6,058 to -3,265 | -3,705 to -1,79 |
| EC50 | 77,73 to 111,4 | 72,96 to 88,07 | 20,46 to 34,05 |

Goodness of Fit

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Degrees of Freedom | 5 | 5 | 5 |
| R2 | 0,9937 | 0,9977 | 0,9981 |
| Residual Sum of Squares | 94,9283 | 42,1264 | 32,713 |
| Sy.x | 4,3573 | 2,9026 | 2,5579 |
| Fit Status | Converged | Converged | Converged |

Data

| | | | |
|--------------------------|---|---|---|
| Number of X Values | 9 | 9 | 9 |
| Number of Y Replicates | 1 | 1 | 1 |
| Total Number of Y Values | 9 | 9 | 9 |
| Number of Missing Values | 0 | 0 | 0 |

C3A-Cells (Cell Culture results)

Parameter Values

| | | | |
|---------|----------|----------|----------|
| min | 100,641 | 100,1509 | 101,8473 |
| max | -43,5638 | -3,9606 | -8,0711 |
| logEC50 | 2,6763 | 2,0226 | 1,9458 |
| EC50 | 474,6 | 105,3 | 88,26 |

Std. Errors

| | | | |
|---------|---------|--------|---------|
| min | 4,1122 | 2,703 | 11,7628 |
| max | 29,0248 | 4,578 | 18,0377 |
| logEC50 | 0,2213 | 0,0806 | 0,3127 |

95% Confidence Intervals

| | | | |
|---------|-----------------|----------------|-----------------|
| min | 89,22 to 112,1 | 92,65 to 107,7 | 69,19 to 134,5 |
| max | -124,1 to 37,02 | -16,67 to 8,75 | -58,15 to 42,01 |
| logEC50 | 2,062 to 3,291 | 1,799 to 2,246 | 1,078 to 2,814 |
| EC50 | 115,3 to 1953, | 62,92 to 176,3 | 11,96 to 651,6 |

Goodness of Fit

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Degrees of Freedom | 4 | 4 | 4 |
| R2 | 0,9794 | 0,9933 | 0,9047 |
| Residual Sum of Squares | 194,3023 | 60,1817 | 1082,496 |
| Sy.x | 6,9696 | 3,8788 | 16,4507 |
| Fit Status | Converged | Converged | Converged |

Data

| | | | |
|--------------------------|---|---|---|
| Number of X Values | 7 | 7 | 7 |
| Number of Y Replicates | 1 | 1 | 1 |
| Total Number of Y Values | 7 | 7 | 7 |
| Number of Missing Values | 0 | 0 | 0 |

يَهْدَفُ هَذَا الْعَمَلُ إِلَى دِرَاسَةِ التَّرَكِيبِ الكِيمِيَاءِيِّ لِلزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ لنبَاتِ الفُسْتُقِ الأَطْلَسِيِّ
 نَشَاطِهَا البِيُولُوجِي (لِلجَرَاثِيمِ، المَضَادَّةِ لِلأكْسِيدَةِ، وَالمَضَادَّةِ لِلإلْتِهَابَاتِ)، مَعَ دَرَجَةِ سُمِّيَّتِهَا .
 نُهَجُ مُتَعَدِّدِ المَتَعَيَّرَاتِ بِاسْتِخْدَامِ طَرِيقَةِ تَحْلِيلِ المُرْكَبِ الرَّئِيسِيِّ وَالتَّحْلِيلِ العُنُقُودِيِّ الهَرَمِيِّ فِي تَحْلِيلِ هَذِهِ الدِّرَاسَةِ العِلْمِيَّةِ
 رَاسَةً عَدَدَ كَبِيرٍ مِّنَ العَيِّنَاتِ لِلزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ مِّنَ مَنَاطِقٍ مُخْتَلِفَةٍ (يِنَ وَسَارَةَ، الأَيمْتِ) حَيْثُ
 عَنَ وَجُودِ نَمَطٍ كِيمِيَاءِيِّ ثَانِي (α-pinène/sabinene/terpinène-4-ol) لَمْ يَتَمَّ نُشْرُهُ فِي السَّابِقِ وَيَتَمَيَّزُ هَذَا النَّمَطُ
 الجَدِيدِ مُسْتَوِيَاتٍ أَعْلَى مِّنَ (sabinene terpinène-4-ol) .
 وَالمَضَادَّةِ لِلإلْتِهَابَاتِ وَكَذَلِكَ سُمِّيَّتِهَا ضِدَّ الخَلَايَا) لِلزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ لنبَاتِ الفُسْتُقِ الأَطْلَسِيِّ. تُشِيرُ نَتَائِجُ
 لِلجَرَاثِيمِ
 هَذِهِ الدِّرَاسَةِ إِلَى أَنَّ الزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ قَادِرَةٌ عَلْتَنبِيطِ نُمُوتِ أَنْوَاعٍ مُخْتَلِفَةٍ مِّنَ سَلَالَاتِ *Candida albicans*
 السَّلَالَاتِ الجُرْثُومِيَّةِ الأُخْرَى، مَعَ سُمِّيَّةٍ مُنْخَفِضَةٍ ضِدَّ خَلَايَا *C3A Vero*. قِيمَةُ مُؤَسِّرِ الإِنْتِفَائِيَّةِ تُشِيرُ إِلَى السَّلَامَةِ النَّسَبِيَّةِ بَيْنَ
 دَرَجَةِ سُمِّيَّةِ وَنَشَاطِ الزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ لنبَاتِ الفُسْتُقِ الأَطْلَسِيِّ. الزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ لنبَاتِ الفُسْتُقِ الأَطْلَسِيِّ فِي
 مُعْتَدِلٍ مِّنَ حَيْثُ مَحَاصِرَةِ الجُدُورِ الحَرَّةِ وَمَعَ ذَلِكَ، قُدِمَتْ نَشَاطًا هَامًا كَمَضَادَّةٍ لِلإلْتِهَابَاتِ لِمَا
 NO وَتَنبِيطِ إِنْزِيمِ 15-lipoxygenase.
 كَلِمَاتُ مُفْتَاخِيَّة: الزُّيُوتِ العِطْرِيَّةِ، نَشَاطُ مُضَادِّ الجَرَاثِيمِ، مُضَادَّ الإلْتِهَابِ

Résumé :

Le présent travail a pour objectif l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des galls de *P. atlantica* Desf., de différentes régions, ainsi que leur activité biologique (antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire) et leur toxicité. Dans la première partie, l'analyse statistique multivariée par la méthode ACP et la méthode CAH a été utilisée dans cette étude scientifique qui a impliqué l'étude d'un grand nombre d'échantillons d'huile essentielle de galls de l'espèce *P. atlantica* provenant de différentes régions (*Ain oussera, Laghouat, Kheneg et Tilghemt*), a révélé l'existence d'un deuxième chemotype (-pinène / sabinene / terpinène-4-ol), non encore publié précédemment. Ce nouveau chemotype se caractérise par des teneurs plus élevées de *sabinene* et *terpinène-4-ol*. En revanche, il a été constaté que les rendements (% v/m) en huiles essentielles de galls (jusqu'à 1,89%) sont effectivement plus importants et plus intéressants à ceux qui enregistrent dans la bibliographie. Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des galls de *Pistacia atlantica* et leur toxicité cellulaire. Les résultats de cette étude, montre que les huiles essentielles des galls de *Pistacia atlantica* Desf., capable d'inhiber in-vitro la croissance de différentes espèces de *Candida* par rapport les autres souches microbiennes, avec une toxicité faible vis-à-vis des cellules *Vero* et *C3A*. Les valeurs de l'indice de sélectivité indiquent la sécurité relative de l'huile essentielle, ce qui reflète le rapport entre la toxicité et l'activité. Les huiles essentielles présentent une activité antioxydante modérée en termes de piégeage des radicaux libres. Cependant, ont été présentée une activité anti-inflammatoire importante vis-à-vis la production de NO et l'inhibition de 15-lipoxygénase (IC₅₀ de 05,62μg/ml).

Mots clés : Huiles essentielles, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité anti-inflammatoire, *Pistacia atlantica* Desf.

Abstract

The present work aims to study the chemical composition of essential oils from galls of *Pistacia atlantica* Desf. in different regions, and their biological activity (antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory) and also their cytotoxicity. In the first part, multivariate statistical analysis by the principal component analysis (PCA), and the hierarchical cluster analysis (HCA) method, was used in this scientific study. Which involved the study of a large number of essential oil samples of galls of *Pistacia atlantica* species from different regions has revealed the existence of a second chemotype (-pinene / sabinene / terpinene-4-ol), not yet published previously. This new chemotype was characterized by higher contents of *sabinene* and *terpinene-4-ol*. However, it was found that the yields (v/w) of essential oils of galls (up 1.89%) are effectively more important and interesting to those who registered in the bibliography. In the second part, we are interested by antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils of *Pistacia atlantica* and their cytotoxicity. The results of this study show that essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. able to inhibit in-vitro a growth of different species of *Candida albicans* compared to other microbial strains with low toxicity against *Vero* cells and *C3A* cells. The selectivity index values indicate the relative safety of the essential oil, which reflects the ratio between toxicity and activity. The essential oil presents a moderated free radical scavenging activity. However, were presented an important anti-inflammatory activity to inhibit the production of NO and the inhibition of 15-lipoxygenase (IC₅₀ of 05.62μg/ml).

Keywords: Essential oil, Antimicrobial activity, Antioxidant, Anti-inflammatory, *Pistacia atlantica* Desf.