



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : de la BIOCHIMIE et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de  
L'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : BIOCHIMIE

Intitulé :

**EVALUATION IN VITRO DES ACTIVITES  
BIOLOGIQUES DE PISTACIA LENTISCUS  
L. ET DE PINUS PINASTER**

Présenté et soutenu par:

Mlle BELKSIR DOUNIA

Le : 23/09/2021

Mlle FERDI LAMIS

Devant le Jury d'évaluation :

Président:  
Dr. BENAAMOUN L.

Maitre de Conférences B

Université Frères Mentouri Constantine 1

Rapporteur:  
Dr. DJAALAB I.

Maitre de Conférences A

Institut des Sciences Vétérinaires.  
Université Frères Mentouri Constantine 1

Examineur:  
Dr. MANSOUR H.

Maitre de Conférences A

Institut des Sciences Vétérinaires.  
Université Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire : 2020/2021

## **Remerciements**

*Avant toute chose nous remercions **Allah** le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens et qui nous a aidé à élaborer cet humble travail.*

*Nos sincères remerciements s'adressent à Mme **DJAALAB Imen**, notre encadreur, Maître de conférences A à l'institut des Sciences Vétérinaires Elkhroub pour avoir dirigé ce travail.*

*Nous remercions très sincèrement Mme **Benaamoun Leila** Maitre de conférences B à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie d'avoir présidé le jury de notre soutenance ainsi que Mme **MANSOUR Hadria** Maitre de conférences A à l'institut des Sciences Vétérinaires El khroub d'avoir examiné notre travail.*

*Nous voudrions également remercier Mr **Zitouni M.** Chef de laboratoire régional de la police scientifique qui nous a accueilli pour la réalisation de notre stage dans son laboratoire. Ainsi que le lieutenant de police Mr **Boumadienne B.**, Mr **Kbaili F.** et M<sup>elle</sup> **ZADRI M.** du laboratoire régional de la police scientifique pour leurs aide et leurs encouragements.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à toute l'équipe des laboratoires de biochimie de production animale et de mycologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine pour leurs précieux conseils tout au long de notre stage.*

*Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*Ames parent, en témoigne de ma profonde affection et reconnaissance pour leurs amour leur aides leurs recommandations éclairées et attentives. Pour leurs sacrifices et leurs efforts qu'ils ont déployé, afin de me permettre à frayer le bon chemin dac cette vie.*

*A ma sœur **Houda** et mes frères **Lamine, Adel, Mahmoud et M<sup>ed</sup> Elhadi** pour leur appui, leur encouragements et leur aide incessante.*

*A mon équipière et mon binôme **Lamis** pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble pendant ces deux ans et surtout la période du stage.*

*A mes chère amies **Kanza, Lamia** et l'adorables **Hadia et Lina** qui mon inspirés et qui mon témoignés de la sympathie durant toutes les années qu'on a passé ensemble.*

*Sans oublier l'homme qui ma encouragé a fin de continuer mes études  
**Ms BICILA H.** vraiment un grand merci.*

*A toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères.*

***Belksir Dounia***

## ***Dédicace***

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui sont chers,  
A la mémoire de ma chère **mère**, qui restera toujours présent dans mon cœur,  
que dieu garde son âme dans son vaste paradis.*

*A Mon très agréable **père**, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours  
donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de  
ce qu'il attend de moi.*

*A mon binome **Dounia**, Merci énormément pour ton soutien moral, ta patience  
et ta compréhension tout au long de ce projet.*

*A mes frères **Mehdi** et **Chouaib**, qui m'ont toujours soutenu et encouragé  
durant ces année d'études.*

*A ma belle sœur **Asma** et ses petites **Siradj** et **Assef**.*

*A mes cheres amies : **Rahil**, **Roumaissa** et **Hanane**.*

*A toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères.*

***Ferdi lamis***

## LISTE DES ABREVIATIONS

**A0.5** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance

**ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**ACh** : Acétylcholine

**AChE** : Acétylcholinestérase

**CI50** : Concentration d'inhibition à 50%

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**D** : Diamètre

**DNA** : Acide désoxyribonucléique

**DO** : Densité optique

**DPPH** :  $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl E-D : éther di-éthylique

**DTNB** : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

**EAG** : Équivalent de l'acide gallique

**EQ** : Équivalent de la quercétine

**Fe**: Fer

**FLOH** : flavoxyles

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power

**g**: Gramme

**H**: Heure

**m**: Mètre

**MeOH** : Méthanol

**mg** : Milligramme

**min** : Minute

**ml** : Millilitre

**mm** : millimètre

**mmol** : Millimole

**nm** : Nanomètre

**PBE** : extrait d'écorce de pin maritime

**PH**: Potentiel hydrogène

**PLE** : *pistacia lentiscus*

**PPI** : *pinus pinaster*

**RL** : Radicaux libres

**SM** : Métabolites secondaires

**TEAC** : Capacité antioxydante équivalente Trolox

**TFC** : Total Flavonoïde Content

**TPC** : Total polyphénole Content

**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

**v** : Volume

**%** : pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**µg** : Microgramme

**µl** : Microlitre

**µmol** : Micromole

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Pages
1	Les Acideshydroxy-benzoïques.....	5
2	Les acides hydroxycinnamiques.....	6
3	Classes distinctes des flavonoïdes.....	6
4	Structure d'un tannin hydrolysable.....	7
5	Structure d'un tannin condensé.....	7
6	Structure de quelques alcaloïdes.....	8
7	Procédé général de l'extract0ion solide/liquide.....	11
8	Schéma des trois étapes élémentaires de l'extractionsolide/liquide par un solvant dans un solide végétal.....	12
9	Structure de base des flavonoïdes.....	14
10	Notion de l'équilibre oxydants/antioxydants dans les systèmes biologiques (a), induction du stress oxydant et son implication dans le développement des maladies chroniques (b).....	15
11	Transformation du radical DPPH <sup>•</sup> en DPPHH.....	16
12	Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>•</sup> .....	17
13	Mécanisme réactionnel du test FRAP.....	18
14	Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline.....	18
15	Formation du complexe amylose-iode en absence de l'α-amylase.....	20
16	Principe de la transmission cholinergique.....	21
17	Arbuste de pistachier lentisque.....	26
18	Les différentes parties du <i>Pistacia lentiscus</i> .....	28
19	Distribution de <i>Pistacia Lentiscus</i> dans le bassin méditerranéen.....	29
20	Le Pin maritime.....	31
21	Les différentes parties de <i>Pinus pinaster</i> .....	33
22	Les cônes.....	33
23	Air de répartition (Bleu) de pin maritime en Europe et en Afrique du Nord.....	35
24	a) Les feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L;b) la région du récolte.....	41
25	a) le tronc du pin maritime; b) la région du récolte.....	42
26	Séchage des feuilles de PLE.....	42

<b>27</b>	Broyage des feuilles de PLE.....	<b>42</b>
<b>28</b>	Procédure de la décoction.....	<b>44</b>
<b>29</b>	Eppendorfs contiennent les dilutions des deux extraits.....	<b>48</b>
<b>30</b>	Préparation des dilutions et mode opératoire sur une microplaque 96 puits.....	<b>48</b>
<b>31</b>	Réaction d'Ellman.....	<b>52</b>
<b>32</b>	Préparations des cultures jeunes dans les différents milieux de culture.....	<b>54</b>
<b>33</b>	Préparation des suspensions bactériennes.....	<b>54</b>
<b>34</b>	Préparation des dilutions pour les deux extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et de <i>Pinus pinaster</i> .....	<b>55</b>
<b>35</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	<b>58</b>
<b>36</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	<b>58</b>
<b>37</b>	Plaques de dosage des polyphénols (TPC) et des flavonoïdes (TFC) des deux extraits de <i>pistacia lentiscus</i> et de <i>Pinus pinaster</i> .....	<b>59</b>
<b>38</b>	Teneur en composés phénoliques totaux des extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>60</b>
<b>39</b>	Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>60</b>
<b>40</b>	La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>62</b>
<b>41</b>	Valeurs $CI_{50}$ du test DPPH .....	<b>63</b>
<b>42</b>	Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS) des extraits des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>65</b>
<b>43</b>	Valeurs des $CI_{50}$ du test ABTS pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>65</b>



<b>44</b>	La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>67</b>
<b>45</b>	Valeurs des A <sub>0,5</sub> du pouvoir réducteur FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>68</b>
<b>46</b>	La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline par les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>69</b>
<b>47</b>	Valeurs des A <sub>0,5</sub> dutest phénanthroline réalisé pour les extraits aqueux desfeuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>70</b>
<b>48</b>	La plaque de dosage de l'activité anti diabétique (inhibition de alpha-amylase) des extraits des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>72</b>
<b>59</b>	La plaque de dosage de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par les extraits desfeuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>72</b>
<b>50</b>	Valeurs des <b>CI</b> <sub>50</sub> test anticholinestérase pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	<b>73</b>
<b>51</b>	Effet de PPI et PLE sur <i>S.aureus</i> .....	<b>75</b>
<b>52</b>	Effet de PPI et PLE sur <i>E. coli</i> .....	<b>75</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titres	Page
1	Classification des terpènes.....	9
2	Processus élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal.....	12
3	Classification botanique du <i>Pistacia Lentiscus</i> .....	27
4	Classification botanique du <i>pinus pinaster</i> .....	32
5	Les stations favorables du pin maritime.....	34
6	Teneur en extractibles et en Polyphénols des écorces de pin maritime obtenus selon plusieurs méthodes d'extraction.....	38
7	Les dilutions de la gamme d'étalon de l'acide galique.....	46
8	Les dilutions de la gamme d'étalon de la quercetin.....	47
9	Le rendement d'extraction.....	57
10	Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits bruts des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> ...	59
11	Inhibition du radical DPPH par les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	63
12	Inhibition du cation radical ABTS <sup>+</sup> par les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	65
13	Réduction du fer par la méthode FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	67
14	Réduction du fer par la méthode phénanthroline pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	69
15	Inhibition de l'enzyme Acétylcholinestérase pour les extraits aqueux des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (PLE) et de l'écorce de <i>Pinus pinaster</i> (PPI).....	73

## LISTE DES EQUATIONS

<b>Equation</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Equation du rendement de l'extraction.....	<b>45</b>
<b>2</b>	Pourcentage d'inhibition du DPPH.....	<b>49</b>
<b>3</b>	Pourcentage d'inhibition d'ABTS.....	<b>50</b>
<b>4</b>	Pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.....	<b>52</b>
<b>5</b>	Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	<b>53</b>

# EVALUATION IN VITRO DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE *PISTACIA LENTISCUS* L. ET DE *PINUS PINASTER*

## Résumé

L'utilisation des plantes a toujours fait partie de notre environnement. L'homme les utilise pour se guérir ou pour procurer un bien fait à son organisme. Leur diversité en propriétés biologiques est attribuée à une gamme extraordinaire de molécules bioactives qui agissent comme agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicaux. Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique des extraits bruts queux des parties aériennes de deux plantes *Pistacia lentiscus* et *Pinus pinaster*, appartenant respectivement aux familles des *Anacardiaceae* et *Pinaceae*. Ceci afin d'évaluer la possibilité de leurs utilisations en tant que source de substances bioactives.

Pour cela, l'activité antioxydante est évaluée en utilisant quatre différentes méthodes (DPPH, ABTS, pouvoir réducteur, et le test au phénanthroline). De plus, l'effet inhibiteur des extraits bruts contre les enzymes acétylcholinestérase et  $\alpha$ -amylase a été également évalué. Le dosage biochimique a révélé une teneur très élevée en polyphénols et en flavonoïdes dans les feuilles de *Pistacia lentiscus* et dans l'écorce de *Pinus Pinaster*. A cet effet, les deux espèces ont manifesté une excellente activité antioxydante avec les tests DPPH, ABTS et Phenanthroline. Neanmoins, il faut signaler que les extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* et de *Pinus pinaster* n'ont présenté aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

**Mots clés :** *Pistacia lentiscus* L. - *Pinus pinaster* - activités biologiques- extraits aqueux.

# IN VITRO EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *PISTACIA LENTISCUS* L. AND *PINUS* *PINASTER*

## Abstract

The use of plants has always been part of our environment. Man uses them to heal himself or to provide good for his body. Their diversity in biological properties is attributed to an extraordinary range of bioactive molecules which act as chemical agents against diseases, herbivores and predators but also as medicinal agents. This work is devoted to the phytochemical and biological study of crude extracts from the aerial parts of two plants *Pistacia lentiscus* and *Pinus pinaster*, belonging respectively to the families of *Anacardiaceae* and *Pinaceae*. This is to assess the possibility of their uses as a source of bioactive substances.

For this, antioxidant activity is assessed using four different methods (DPPH, ABTS, reducing power, and the phenanthroline test). In addition, the inhibitory effect of crude extracts against acetylcholinesterase and  $\alpha$ -amylase enzymes was also evaluated.

The biochemical assay revealed a very high content of polyphenols and flavonoids in the leaves of *Pistacia lentiscus* and in the bark of *Pinus Pinaster*. To this end, both species showed excellent antioxidant activity with the DPPH, ABTS and Phenanthroline tests.

It should be noted that the aqueous extracts of *Pistacia lentiscus* and *Pinus pinaster* did not show any antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** *Pistacia lentiscus* L. - *Pinus pinaster* - biological activities - aqueous extracts.

**BELKSIR Dounia**  
**FERDI Lamis**

# TABLE DE MATIERES

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des équations	
Résumé	
Introduction	

## *PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

### **CHAPITRE I : LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES MEDICINALE**

I. Phytothérapie.....	3
I.1.Généralités .....	3
I.2. Définition .....	3
I.3.Les préparations à base des plantes (phytomédicament et complément alimentaire).	3
II.Plantes médicinales .....	4
II.1.Généralités .....	4
II.2. Définition .....	4
III.Les métabolites secondaires .....	4
III.1.Les composés phénoliques .....	4
III.1.1.Les acides phénoliques .....	5
III.1.2. Les flavonoïdes .....	6
III.1.3. Les tanins .....	7
III.2. Les composés azotés (les alcaloïdes) .....	8
III.3. Les terpènes.....	8
IV. Effet antioxydants .....	9
IV.1. Le stress oxydatif .....	9
IV.2. les radicaux libre.....	9
V. Mode de préparation des extraits végétaux .....	9
V.1.L'extraction solide/liquide .....	9
V.2.Les extraits végétaux .....	10
V.3. Les facteurs qui influencent l'extraction solide /liquide .....	11

### **CHAPITRE II: LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PLANTES MEDICINALES**

I. Détermination du total en polyphénols et flavonoïdes .....	13
I.1. contenu total phénolique (TPC) .....	13
I.2. Contenu total flavonoïque (TFC) .....	13
II. Activité antioxydante et les antioxydants .....	14
II.1 Généralités .....	14
II.2.Mise en évidence de l'activité anti-radicalaire .....	15
II.2.1. Activité anti-radicalaire au DPPH• .....	16

II.2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>+</sup> .....	16
II.2.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	17
II.2.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline .....	18
III. Activité enzymatique.....	19
III.1. Evaluation de l'activité antidiabétique .....	19
III.1.1. Inhibition de l'alpha amylase .....	19
III.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase .....	20
VI. Activité antibactérienne .....	21
IV.1. Généralités .....	21
IV.2. Les principales substances antimicrobiennes .....	22
IV.2.1. Les bactéries .....	22
IV.2.1.1. Les infections bactériennes .....	22
IV.2.1.2. Description des bactéries étudiées .....	22
IV.2.2. Les antibiotiques .....	23
IV.2.2.1. Mode d'action .....	24
IV.2.2.2. Résistance aux antibiotiques .....	24
IV.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	24
IV.3.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) .....	24
IV.3.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution).....	25
IV.3.2.1. La dilution en bouillon .....	25
IV.3.2.2. La dilution en gélose .....	25
IV.3.3. Méthode bio autographique .....	25

## **CHAPITRE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES PLANTES ETUDIÉES**

I. Etude botanique et phytochimique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	26
I.1. Description botanique.....	26
I.2. Taxonomie .....	27
I.3. Morphologie de l'espèce .....	27
I.4. Répartition géographique .....	28
I.5. Nomenclature .....	29
I.6. Usage thérapeutique .....	29
I.6.1. Propriétés biologique et pharmacologique .....	30
I.7. Etude chimique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	30
I.7.1. Métabolites secondaires.....	30
II. Etude botanique et phytochimique de <i>Pinus pinaster</i> .....	31
II.1. Description botanique .....	31
II.2. Taxonomie.....	32
II.3. Morphologie de l'espèce .....	32
II.4. Répartition géographique .....	34
II.5. Nomenclature .....	35
II.6. Usage thérapeutique .....	35
II.6.1. Propriétés biologique et pharmacologique .....	36
II.7. Etude chimique de <i>pinus pinaster</i> .....	37

II.7.1. Les métabolites secondaires.....	37
--	----

## ***PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE***

### **MATERIEL ET METHODES**

I. Matériels .....	41
I.1 Matériels végétales .....	41
II. Méthodes .....	43
II.1. Préparation des extraits aqueux bruts .....	43
II.1.1. Procédure de l'extraction.....	43
II.1.2. Le rendement.....	45
II.2 Dosage colorimétrique des polyphénols .....	45
II.2.1 Dosage des polyphénols totaux .....	45
II.2.3. Dosage des flavonoïdes .....	47
II.3. Les activités antioxydantes .....	47
II.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH .....	49
II.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS•+ .....	49
II.3.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	50
II.3.4. L'activité de phénanthroline .....	51
II.4. Activité enzymatique .....	51
II.4.1. Inhibition de l'α-amylase .....	51
II.4.2. Inhibition de l'acétylcholinestérase .....	52
II.5. Activité antibactérienne.....	53
II.5.1.Souches bactériennes.....	53
II.5.2.Les milieux de culture.....	53
II.5.3. Préparation des cultures jeunes.....	54
II.5.4. Préparation de l'inoculum.....	54
II.5.4. Méthode de diffusion .....	55
II.5.5. Préparation des dilutions .....	55

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Rendement d'extraction .....	57
II. Dosage des polyphénols et flavonoïdes .....	58
III. Activité antioxydant .....	61
III.1.Activité anti-radicalaire au DPPH .....	62
III.2.Activité du piégeage du cation radical ABTS .....	64
III.3.Pouvoir réducteur du fer par la méthode FRAP .....	67
III.4.Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>2+</sup> phénantroline .....	69
IV.Activité enzymatique .....	71
IV.1.Evaluation de l'activité antidiabétique .....	71
IV.1.1.Inhibition de l'alpha amylase .....	71
IV.2.Evaluation de l'activité anticholinestérase .....	72
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	74
V.1.Méthode de diffusion par disque .....	74
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>78</b>



<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>93</b>

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Les plantes ont existé sur la surface du globe terrestre depuis la vie sur terre, elles ont un rôle prépondérant dans l'évolution des sociétés humaines. Le végétal constitue la base de vie de l'être humain (**Daaboul, 2004**).

Le monde arabe a joué un rôle efficace dans la diffusion des connaissances des plantes médicinales de la Chine et de l'Inde vers les côtes occidentales de l'Afrique et de l'Espagne. Les musulmans ont été parmi les premiers ethnobotanistes (**Malu et al., 1982**). Ce n'est qu'au VIII<sup>ème</sup> siècle, avec le développement de la chimie analytique, qu'on est arrivé à connaître et isoler les principes actifs des plantes, ce qui a constitué le point de départ de ce qu'on appelle : la chimie des produits naturels médicinaux qui s'appuie sur une base scientifique (**Ghyath, 1999**).

Actuellement, cette médication par les plantes connaît un regain d'intérêt notable, grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien-fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales (**Lahsissene et al., 2009**). Parmi les disciplines scientifiques qui s'intéressent à la phytothérapie traditionnelle, l'ethnobotanique est considérée comme une science qui permet de traduire le savoir-faire populaire en savoir scientifique. Chaque culture a une histoire d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies. En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de Bloued et Baba Aissa (**Bloued, 1998 et Baba Aissa, 1999**).

L'Algérie par son emplacement géographique particulier et ces qualités climatiques très variées, présente une végétation riche et diverse. On compte plus de 3000 espèces de plantes, dont 15% endémiques, appartenant à plusieurs familles botaniques (**Gaussen et Leroy, 1982**). Les plantes médicinales sont une bonne source de produits naturels pouvant avoir une activité antimicrobienne, antidiabétique, anti-alzheimer et anti-inflammatoire. Ceci en raison de leur richesse en métabolites secondaires tels que les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Donc la présence des antioxydants naturels dans les plantes peut fournir une protection contre un certain nombre de maladies et leur utilisation a été inversement associée à la morbidité et à la mortalité dues aux troubles dégénératifs (**Baba et Malik, 2015**).

Parmi ces plantes médicinales différentes espèces du *Pistacia* et du *Pinus*, ont été considérées comme un bon remède pour le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les calculs rénaux et la jaunisse (**Villar et al., 1987; Ali-Shtayeh et al., 2000; Rohdewald, 2002 et Gardeli et al., 2008**). Plusieurs travaux de recherche ont montré la richesse de ces deux plantes en molécules bioactives. Ce sont une source de composés poly phénoliques dont nous citons le trans-resvératrol, les pro anthocyanidines et une quantité remarquable de la daidzéine et la génistéine isoflavones (**Gentile et al., 2007**).

C'est dans ce contexte que se présente ce travail de recherche dont le but principal est la valorisation de la richesse de l'Algérie en plantes médicinales et la recherche de nouvelles molécules naturelles qui peuvent remplacer les molécules synthétiques. Pour cela notre étude a pour objectif principal l'évaluation des activités biologiques (l'activité antimicrobienne et les activités antioxydantes et enzymatiques) de deux espèces *Pistacia lentiscus* et *Pinus pinaster*.

Ce travail comporte une partie bibliographique structurée comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à des généralités bibliographiques sur les plantes médicinales et leurs métabolites secondaires ainsi que le mode de préparations des extraits végétaux.
- Le deuxième chapitre renseigne sur les activités biologiques à savoir ; l'activité antioxydante
- , antibactérienne, anti-alzheimer et l'activité enzymatiques.
- Le troisième chapitre comprend l'étude ethnobotanique et chimique des plantes étudiées.

Tandis que l'étude expérimentale concerne la description du matériel végétal, les méthodes d'extractions ainsi que les méthodes d'évaluation des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne, anti-alzheimer et l'activité enzymatiques). Par ailleurs, nous présenterons les résultats et nous discuterons les activités biologiques des deux plantes étudiées.

***PARTIE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

**CHAPITRE I :****LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES MEDICINALES****I. Phytothérapie****I.1. Généralités**

A l'état naturel, la végétation recouvre la quasi- totalité de la zone émergée de planète. Grace aux rapports entre la plante et l'homme, aussi vieux que l'humanité elle –même, les végétaux furent d'ailleurs la première colonisation terrestre (**Gantet et al., 1998**).

**I.2. Définition**

La phytothérapie est l'utilisation de plantes ou de parties de plantes à des fins thérapeutiques. On utilise soit les plantes telles quelles ou des préparations (formulations) réalisées à partir de la plante entière ou d'une partie d'intérêt (racines, fleurs...) choisies pour leur richesse en métabolites secondaires particuliers. Les principes actifs purs, isolés de la plante, ne sont pas considérés en phytothérapie, il s'agit dans ce cas, de médicament (substance médicamenteuse) en tant que tel. (**Nausicaa et al., 2018**).

**I.3. Les préparations à base des plantes (phytomédicament et complément alimentaire)**

Les plantes et préparations à base de plantes circulent sur le marché européen sous différents statuts légaux.

- **Les phytomédicament** : sont des médicaments à base de plantes, soumis aux mêmes exigences de qualité, d'efficacité et d'innocuité, de production et de suivi que les médicaments classiques.
- **Le complément alimentaire** : fait partie du circuit alimentaire et est produit selon ses normes. Un complément alimentaire ne peut revendiquer une allégation de santé que si celle-ci a été approuvée par l'Autorité européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) (**Nausicaa et al., 2018**).

## II. Plantes médicinales

### II.1. Généralités

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**Sanag, 2006**). L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement une région d'intérêt auprès du public, selon l'organisation mondiale de la santé, environ 65-80 % de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**OMS, 2003**).

### II.2. Définition

Les plantes médicinales sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Mansour, 2014**). Ainsi que ces plantes ont une grande valeur thérapeutique depuis longtemps et beaucoup de recherches sont en cours pour explorer davantage l'utilisation de ces dernières pour améliorer la valeur de la santé humaine (**Ansari et al., 2012**).

## III. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires (MS) se trouvent dans toutes les parties des plantes supérieures, ils sont distribués différemment d'une plante à l'autre selon leurs rôles qui sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie de ces plantes (**Hartmann, 2007**). Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chaque classe renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003**).

### III.1. Les composés phénoliques

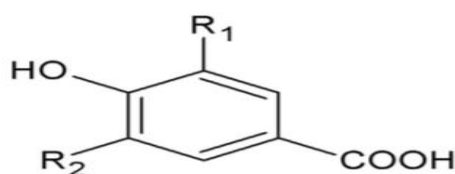
Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol  $C_6H_5OH$  qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal, on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruites et l'écorce. La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Les composés phénoliques représentent de 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10 % et même d'avantage. Tous les phénols, à de très rares exceptions (exemple : la lignine) sont des métabolites énergétiques des échanges cellulaires et interviennent activement dans différents processus : photosynthèse,

respiration, croissance, résistance aux maladies, infectieuse. Dans la nature ces composés sont généralement nt dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins) (Maameri, 2008).

### III.1.1. Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Bruneton, 2008). Ils sont divisés en deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycyanamique.

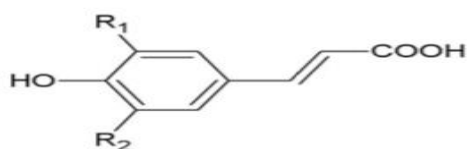
- ❖ **Les acides hydroxy benzoïques (HBA) :** Ils présentent une structure en C6-C1, composé d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone. On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Le principal composé est l'acide gallique.



$R_1 = R_2 = H$  : *p*-hydroxybenzoic acid  
 $R_1 = OH, R_2 = H$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = H$  : Vanillic acid  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Gallic acid  
 $R_1 = R_2 = OCH_3$  : Syringic acid

**Figure 1:** Les Acideshydroxy-benzoïques (Taleb et al., 2016)

- ❖ **Les acides hydroxycyanamique (HCA):** L'acide cinnamique est un composé C6-C3, leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique. Les acides hydroxycyanamique communs sont les acides caféique, *p*-coumarique, férulique et sinapique.



$R_1 = R_2 = H$  : *p*-Coumaric acid  
 $R_1 = OH, R_2 = H$  : Caffeic acid  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = H$  : Ferrulic acid  
 $R_1 = R_2 = OCH_3$  : Sinapic acid

Figure 2: Les acides hydroxycinnamique (Taleb et al., 2016)

### III.1.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation des gènes et dans le métabolisme de croissance. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Yao et al., 2004).

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Assimopoulou, 2005). En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (Yao et al., 2004): anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aurones.

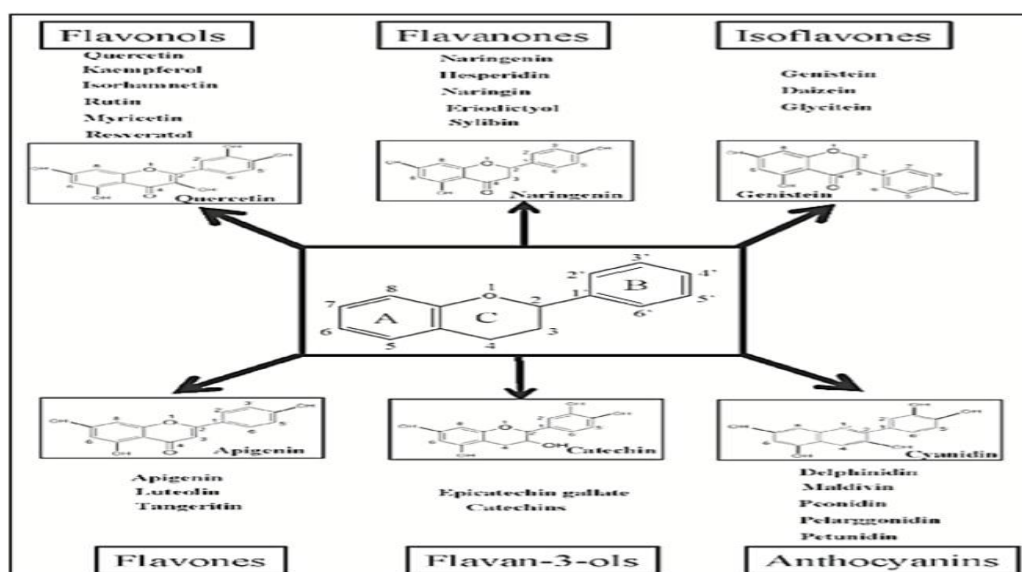


Figure 3: Classes distinctes des flavonoïdes (Kawser et al., 2016)



### III.1.3. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation. Les tanins sont des substances capables de former plusieurs combinaisons stables avec les protéines et d'autres polymères végétaux tels que les polysaccharides du point de vue chimique.

Les tanins sont des molécules phénoliques volumineuses. Les masses moléculaires des tanins actifs se situent entre six cent et trois mille cinq cent. Ils sont responsables de l'astringence qui est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres. On distingue deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Djedaia , 2017).

- ❖ **Les tanins hydrolysables** : ont une structure de polyester et sous l'action d'un acide dilué ou d'une enzyme ils s'hydrolysent en libérant une fraction glucidique ou polyalcoolique et des acides carboxyphénoliques. Selon la nature de ces derniers, on distingue les gallotannins qui produisent surtout de l'acide gallique et les ellagitannins qui donnent en plus, de l'acide ellagique ainsi que d'autres acides phénoliques (Richardin et al., 1988).

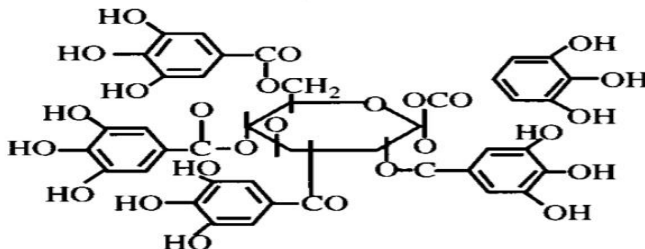


Figure 4: Structure d'un tannin hydrolysable (Cowan, 1999)

- ❖ **Les tanins condensés** : sont des oligomères et proanthocyanidines (Khanbabeae et Van Ree, 2002) constitués d'unités flavonoïdes (flavon-3-ol) liées par des liaisons carbone-carbone (Hassampour, 2011).

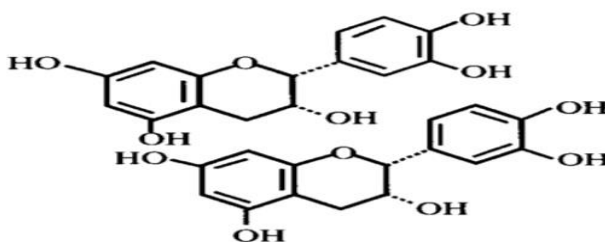


Figure 5: Structure d'un tannin condensé (Cowan, 1999)

### III.2. Les composés azotés (les alcaloïdes)

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga, 2011).

On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais**, sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé et comporte un atome d'azote dans un système hétérocyclique (Bruneton, 1999). Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (Badiaga, 2011).
- **Pseudo-alcaloïdes**, représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (Bruneton, 1999).
- **Proto-alcaloïdes**, sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique (Bruneton, 1999), ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (Badiaga, 2011).

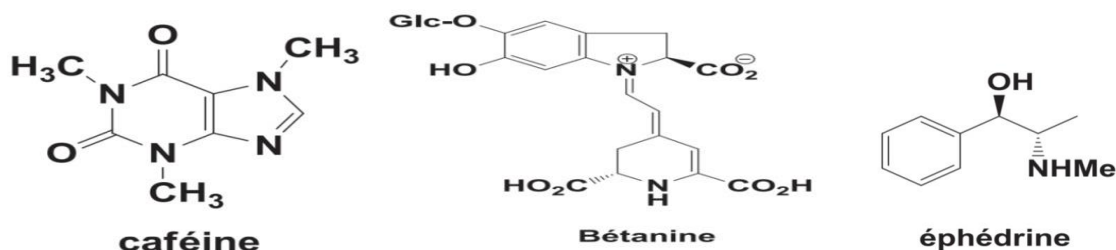


Figure 6: Structure de quelques alcaloïdes (Badiaga, 2011)

### III.3. Les terpènes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones (Seghiri, 2009).

Leur squelette carboné est constitué d'unités isopréniques reliées, c'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles (Kone, 2018). Les terpènes sont classés dans le tableau suivant :

**Tableau 1:**Classification des terpènes (Seghiri, 2009)

<b>Monoterpènes</b>	C <sub>10</sub>
<b>Sesquiterpènes</b>	C <sub>15</sub>
<b>Diterpènes</b>	C <sub>20</sub>
<b>Sesterpènes</b>	C <sub>25</sub>
<b>Triterpènes et Stéroïdes</b>	C <sub>30</sub>
<b>Tetraterpènes</b>	C <sub>40</sub>
<b>Polyterpènes</b>	(C <sub>10</sub> ) <sup>n</sup> avec n>8

## IV. Effet antioxydants

### IV.1. Le stress oxydatif

Le « stress oxydatif métabolique » est défini comme un état tissulaire particulier qui perturbe l'homéostasie de nos cellules, qui se caractérise comme un déséquilibre entre les tissus qui génèrent des radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'ensemble des réactions mises en jeu pour rétablir l'équilibre (Halliwell et al., 2007). Donc c'est le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination (Zerargui, 2015).

### IV.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres (RL) sont des atomes, des molécules ou des ions (dérivent de l'oxygène, l'azote et du soufre) avec un ou plusieurs électrons sur sa couche externe non appariés qui sont très instables et actifs vis-à-vis des réactions chimiques (Carocho et Ferreira, 2013). Ces radicaux libres à des concentrations physiologiques élevées induisent la mort cellulaire et l'apoptose (Salido et Rosado, 2009).

## V. Mode de préparation des extraits végétaux

### V.1. L'extraction solide/liquide

Dans le domaine de l'extraction de métabolites ou de principes actifs, l'extraction solide/liquide est souvent décrite comme une extraction par diffusion, permettant de séparer les composés extractibles solubles d'une matrice solide, formée par les tissus végétaux, à l'aide d'une phase liquide (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003).

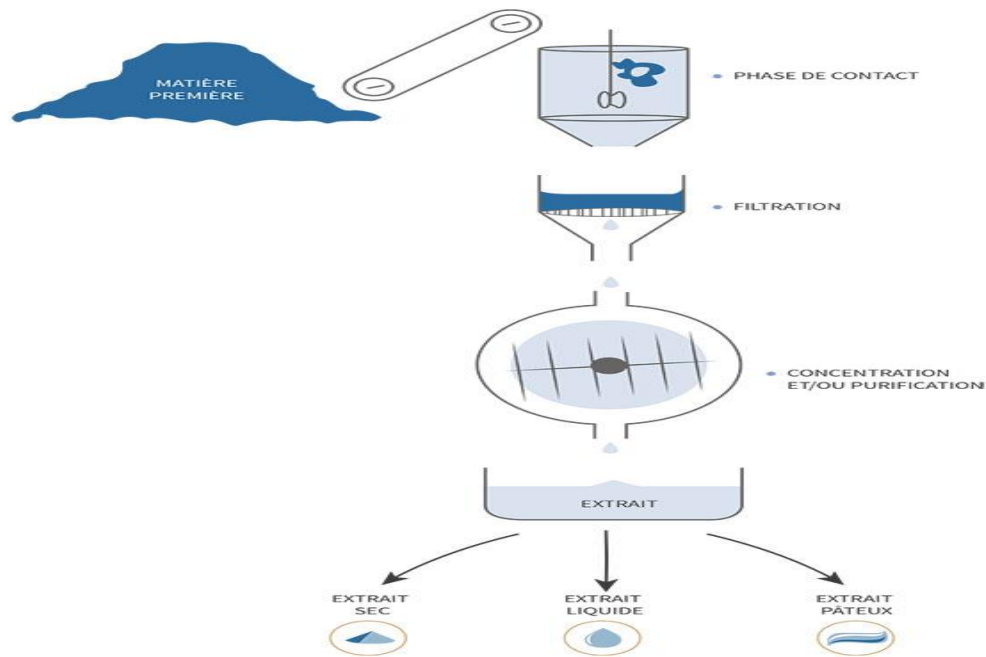
- **La matière première** : La matière première est l'un des paramètres les plus importants mais aussi le plus difficile à maîtriser. En effet, une même variété de plantes est souvent de qualité variable selon les conditions climatiques, les pratiques culturales, l'origine géographique... Il est donc d'autant plus complexe de garantir la qualité constante des extraits.
- **Le solvant** : Le solvant définie comme la tendance naturelle d'un système à rendre homogène les concentrations des espèces chimiques en son sein, la diffusion est un phénomène de transport irréversible qui se traduit par leur migration des zones de forte concentration vers celles de faible concentration par un déplacement de constituants de la matrice végétale vers le solvant. L'extraction par diffusion suppose alors la non-dénaturation de la matrice végétale et la conservation de l'intégrité des membranes cellulaires (**Cacace et Mazza, 2007**).

## V.2. Les extraits végétaux

On utilise le plus souvent la plante séchée sous forme de tisanes ou broyée et directement incorporée dans une gélule. Les formulations ou préparations les plus fréquentes en phytothérapie sont les extraits. Ce sont des préparations concentrées, liquides (extraits fluides et teintures), solides (extraits secs) ou de consistance intermédiaire (extraits mous) (**Figure 7**).

Ces extraits obtenues à partir de la drogue végétale (plante ou partie de celle-ci) sèche, broyée et préparée par plusieurs procédés :

- **La macération** : la phase de contact est maintenue à température ambiante.
- **La décoction ou reflux** : la phase de contact est maintenue à température d'ébullition du solvant.
- **La digestion** : la phase de contact est maintenue à une température intermédiaire aux deux premiers cas.
- **L'infusion** : le solvant bouillant est versé sur le solide



**Figure 7:** Procédé général de l'extraction solide/liquide (Anonyme 1, 2018).

### V.3. Les facteurs qui influencent l'extraction solide /liquide

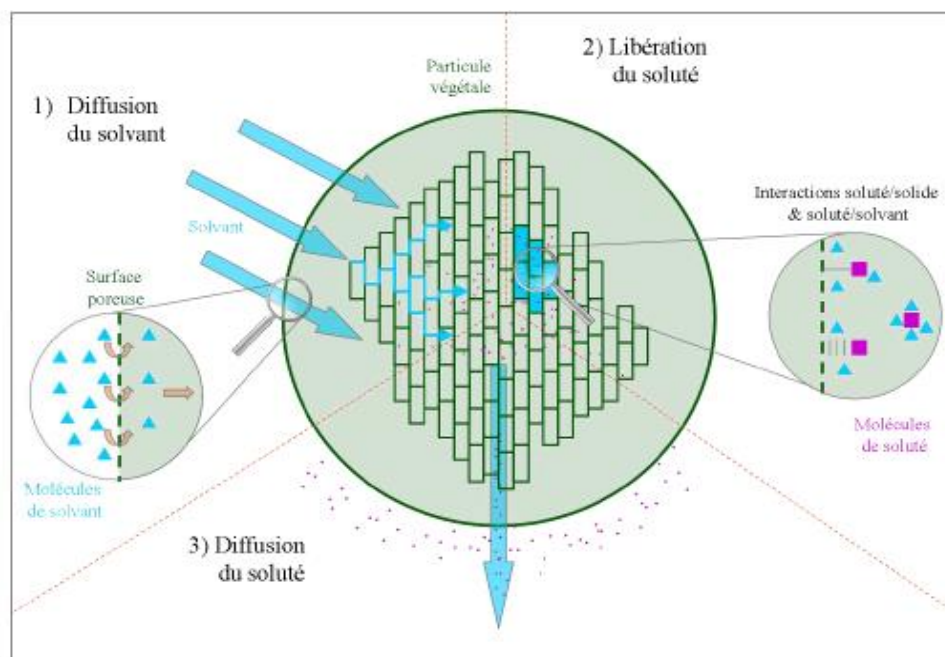
De nombreux facteurs influent sur la qualité d'un extrait végétal, et leurs combinaisons permettent d'obtenir une quasi-infinité d'extraits différents.

La méthode d'extraction, la technologie employée, le choix d'un solvant d'extraction, ainsi que ses propriétés physico-chimiques (polarité, viscosité, etc.), est bien évidemment l'un des principaux paramètres conditionnant l'efficacité d'une extraction solide/liquide.

De nombreux facteurs sont alors susceptibles d'influencer les trois grands processus élémentaires qui régissent l'extraction solide/liquide : diffusion du solvant dans le solide ; échanges à l'interface solide/liquide et diffusion des solutés dans leur solvant à travers le solide (**Tableau 2; Figure 8**).

**Tableau 2:** Processus élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal (Chemat, 2011).

Extraction solide/liquide		Processus élémentaire	Facteurs impliqués
<b>Diffusion du solvant</b>	<b>Phénomène</b>	Transport du solvant dans le solide	Affinité solvant/soluté, viscosité, rapport de taille molécules/pores
	<b>Effet</b>	Choix du solvant, broyage, compression-détente, percolation forcée	Gonflement, remplissage, plastification
<b>Libération du soluté</b>	<b>Phénomène</b>	Rupture des liaisons chimiques, diffusion au travers d'une membrane, dissolution	Nature des liaisons soluté/solide (hydrogène, covalente, etc), affinité soluté/solvant
	<b>Effet</b>	Choix du solvant, augmentation température, modification du pH	Molécules libres dans la matière
	<b>Phénomène</b>	Transport du soluté dans le solide, transfert du soluté en périphérie du solide vers le solvant	Porosité de la matrice, intégrité des membranes, viscosité



**Figure 8:** Schéma des trois étapes élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal (Chemat, 2011).

## CHAPITRE II :

### LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PLANTES MEDICINALES

#### I. Détermination du total en polyphénols et flavonoïdes

##### I.1. *contenu total phénolique (TPC)*

Les composés phénoliques sont les structures les plus abondantes dans les plantes. Les composés antioxydants sont habituellement de forme phénolique. Certaines propriétés antioxydantes des composés phénoliques proviennent de leur capacité à perdre un proton, à chélater les métaux et à dismuter les radicaux libres (Aksoy *et al.*, 2013).

Le contenu en polyphénols totaux des extraits est évalué suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton *et Rossi*, 1965). Ce dernier est un réactif acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, en présence de polyphénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène. L'absorbance du mélange obtenu est mesurée à 760 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation de la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Macheix *et al.*, 2005).

##### I.2. *Contenu total flavonoïque (TFC)*

Les flavonoïdes constituent le groupe majeur des antioxydants phénoliques dérivés des plantes médicinales (Ouyang *et al.*, 2018). Ils sont composés de flavanols, d'anthocyanines, d'isoflavonoïdes, de flavanones et de flavones. Les flavanones et les flavones sont habituellement trouvés dans les mêmes fruits et sont reliés par les enzymes spécifiques, alors que les flavones et les flavanols ne partagent pas ce phénomène et sont rarement trouvés ensemble.

Les anthocyanines sont également absentes dans les plantes riches en flavanones. Les propriétés antioxydantes sont conférées sur des flavonoïdes par les groupes phénoliques d'hydroxyle. Ils activent également les enzymes antioxydantes et empêchent des oxydases. Les flavonoïdes les plus importantes sont catéchine, catéchine-gallate, quercétine et kaempferol (Carocho *et Ferreira*, 2013).

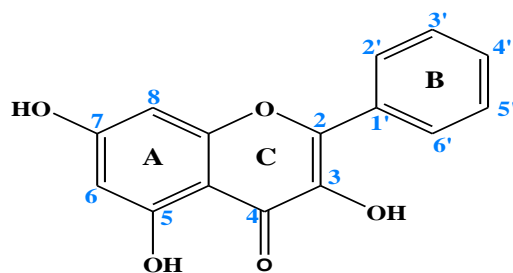


Figure 9: Structure de base des flavonoïdes(Lin et al., 2015)

## II. Activité antioxydante et les antioxydants

### II.1 Généralités

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes ( $O_2$ ) (Barus, 2008).

Dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables, retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Son rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat.

On distingue deux sources d'antioxydants :

- *Source exogène apportée par l'alimentation* sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque.
- *Source endogène composée* : d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases (Halen et al., 2007).

La figure ci-dessous (figure 10) montre l'équilibre entre le système antioxydants endogène, les antioxydants exogènes et les différents radicaux libres produits par l'organisme durant son fonctionnement normal. Des facteurs externes tels que l'exposition aux rayons UV, aux polluants, et la consommation du tabac peuvent aussi stimuler la production des radicaux libres dans l'organisme.



Une surproduction des espèces réactives peut induire l'oxydation des molécules biologiques essentiellement l'AND, des lipides et protéines qui est à l'origine de différentes maladies chroniques.

### Antioxydants endogènes

**Enzymes:** SOD, CAT, GPx, GR

### **Antioxydants non enzymatiques:**

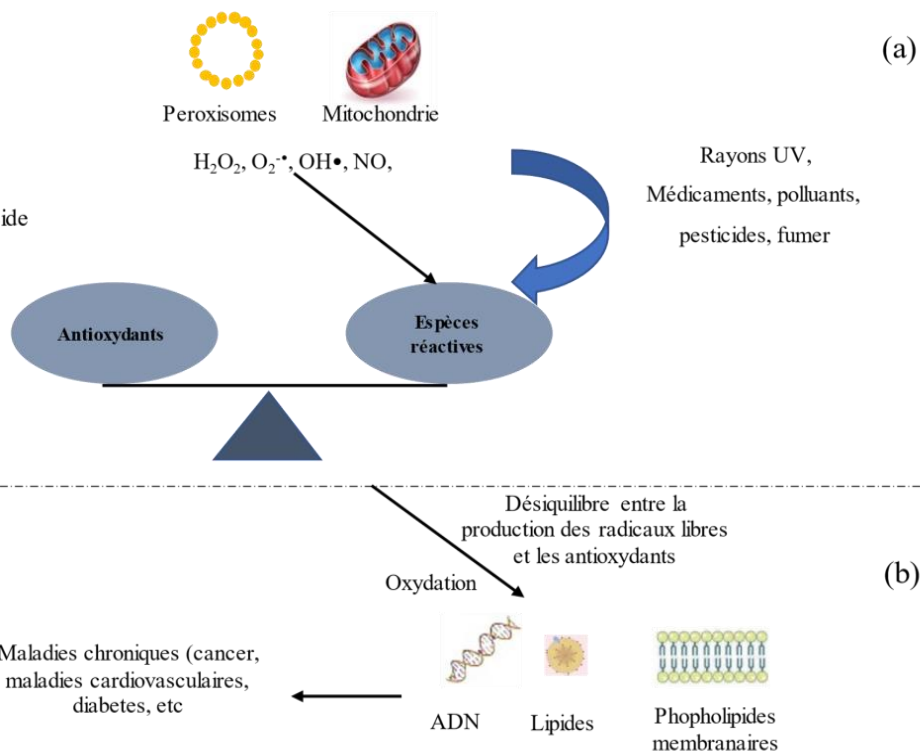
Protéines fixatrice des métaux de transition ( ferritine , transferrine , ceruloplasmine , etc), bilirubine , acide urique , glutathione (GSH)

### Antioxydants exogènes

Vitamines (C, E, et A)

Polyphénols

Caroténoïdes (lycopène , carotène)



**Figure 10:** Notion de l'équilibre oxydants/antioxydants dans les systèmes biologiques (a), induction du stress oxydant et son implication dans le développement des maladies chroniques (b)

(Halen *et al.*, 2007)

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la santé humaine en raison de leurs activités pharmacologiques diverses comme antivirales, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, anti-allergiques, anti-microbiennes, cardioprotectives et vasodilatatoires. En outre, ils peuvent prévenir la modification oxydative par neutralisation et piégeage des radicaux libres, ou réduction des métaux par l'intermédiaire de leurs activités anti oxydantes (Ladoh *et al.*, 2015).

## II.2. Mise en évidence de l'activité anti-radicalaire

Les procédures utilisées pour évaluer l'activité antioxydante ont évolué considérablement de ceux utilisées précédemment quand l'efficacité des antioxydants a été simplement mesurée en surveillant la formation de l'espèce réactive oxygénée. Diverses analyses chimiques extrêmement sensibles et des technologies automatisées de détection sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante

par des mécanismes particuliers, par exemple, la mesure de la capacité des antioxydants à réduire le radical stable, pouvoir réducteur, réduction du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$  (Zhong et Shahidi, 2015).

### II.2.1. Activité anti-radicalaire au DPPH•

Cette méthode a été développée par Blois (1958) dont l'objectif est de déterminer l'activité antioxydante en employant un radical libre stable l' $\alpha, \alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl.

L'analyse est basée sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à réduire le radical DPPH•. L'électron impair de l'atome d'azote dans le DPPH ; initialement violet ; est réduit en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants à l'hydrazine correspondante et se décolore donc en jaune (Contrerasguzman et Strong, 1982). Cette transformation peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm (Molyneux, 2004).

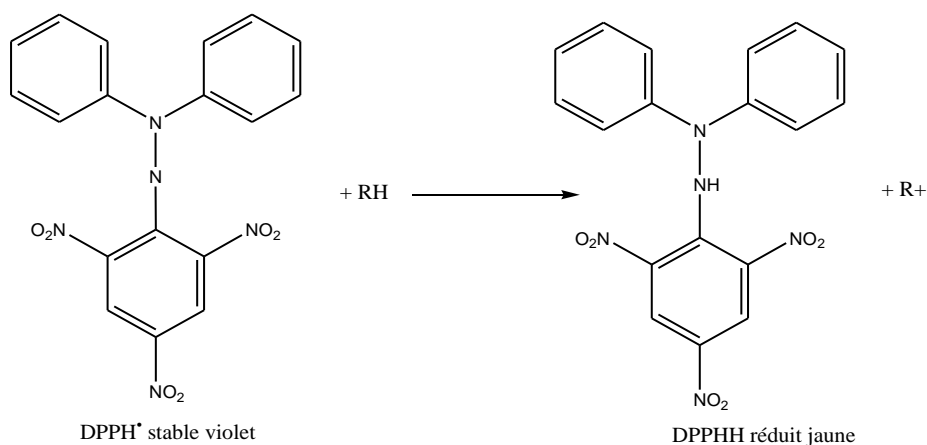


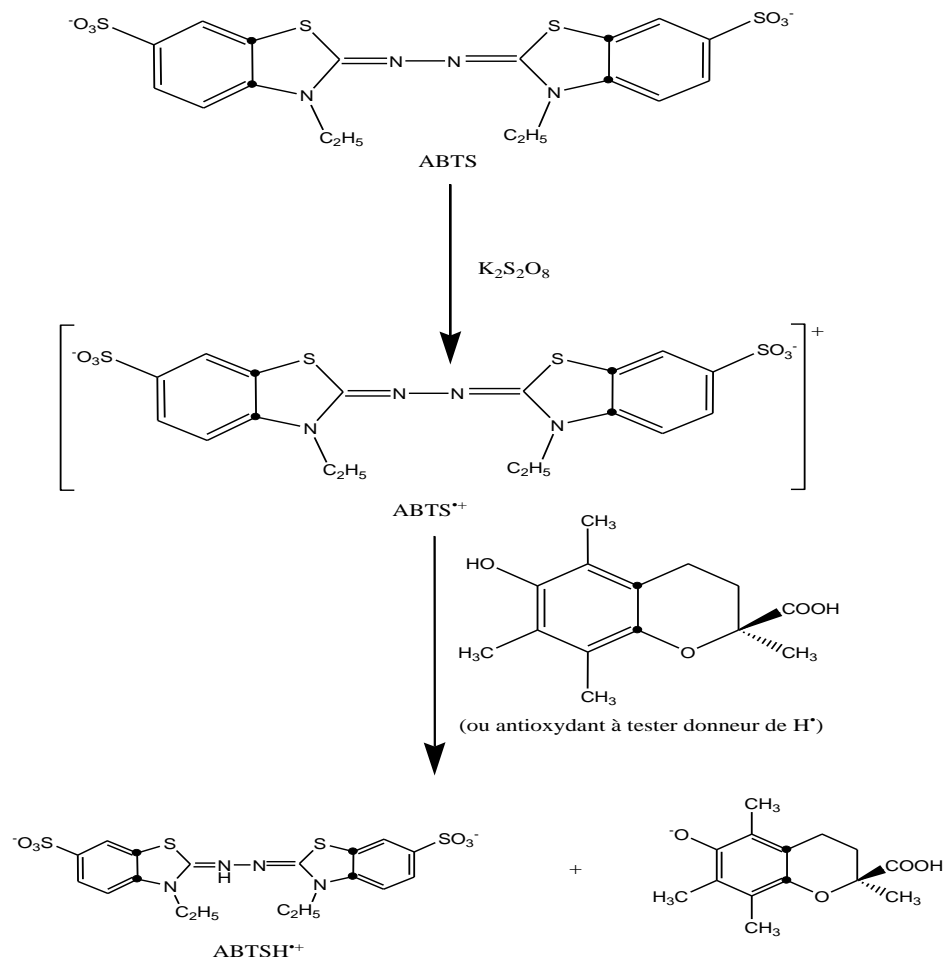
Figure 11: Transformation du radical DPPH• en DPPHH (Gülçin, 2012)

### II.2.2. Activité du piégeage du cation radical $ABTS^{\bullet+}$

L'activité ABTS a été déterminée par la méthode de Re *et al.*, (1999). Cette technique implique la production directe du chromophore  $ABTS^{\bullet+}$  bleu/vert par une réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium. Ceci a des maximums d'absorption aux longueurs d'onde 645,734 et 815 nm. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la consommation du radical  $ABTS^{\bullet+}$  suite à l'addition d'un échantillon antioxydant. Ce dernier réagit avec  $ABTS^{\bullet+}$  (en excès) par transfert d'électrons pour redonner l'ABTS incolore (Figure 12) (Roginsky et Lissi, 2005).

L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la capacité antioxydante d'une solution de Trolox® (1 mM) (analogue

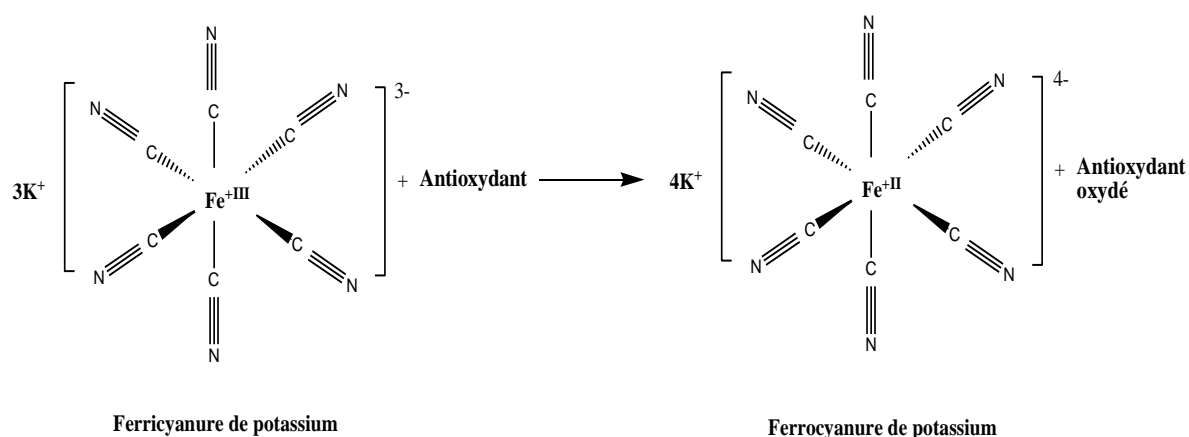
hydrophile de la vitamine E). Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (Schlesier *et al.*, 2002).



**Figure 12:** Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H<sup>•</sup> (Gülçin, 2012)

### II.2.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) présent dans le ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>) et la formation de ferrocyanure de potassium (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) (Pellegrini *et al.*, 2003)(Figure 13).

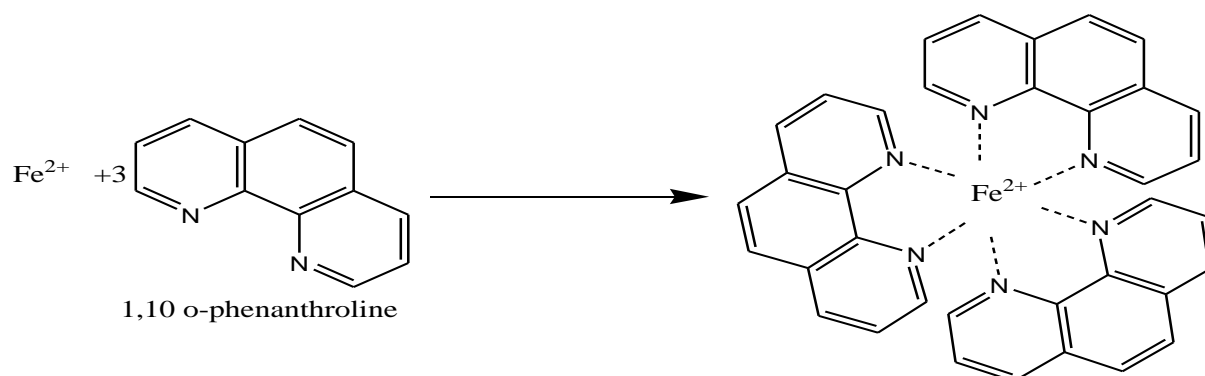


**Figure 13:** Mécanisme réactionnel du test FRAP (Gülçin, 2012)

Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue/verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (Chou et al., 2003). L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance est directement reliée à l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

#### II.2.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>- phénantroline

Le complexe Fe(+2)-phénantroline est largement appliqué dans la méthode spectrophotométrique classique pour la détermination du fer (Szydłowskaczerniak et al., 2008). Cette technique est basée sur la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction (Figure). Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm (Adhikamsetty et al., 2008).



**Figure 14:** Formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline (Apak et al., 2007)

### III. Activité enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle important dans les réactions biochimiques nécessaires pour la croissance, la maturation et la reproduction des êtres vivants. Leur quantification par mesure de l'activité catalytique dans les échantillons biologiques est importante dans divers domaines (Glatz, 2006).

#### III.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

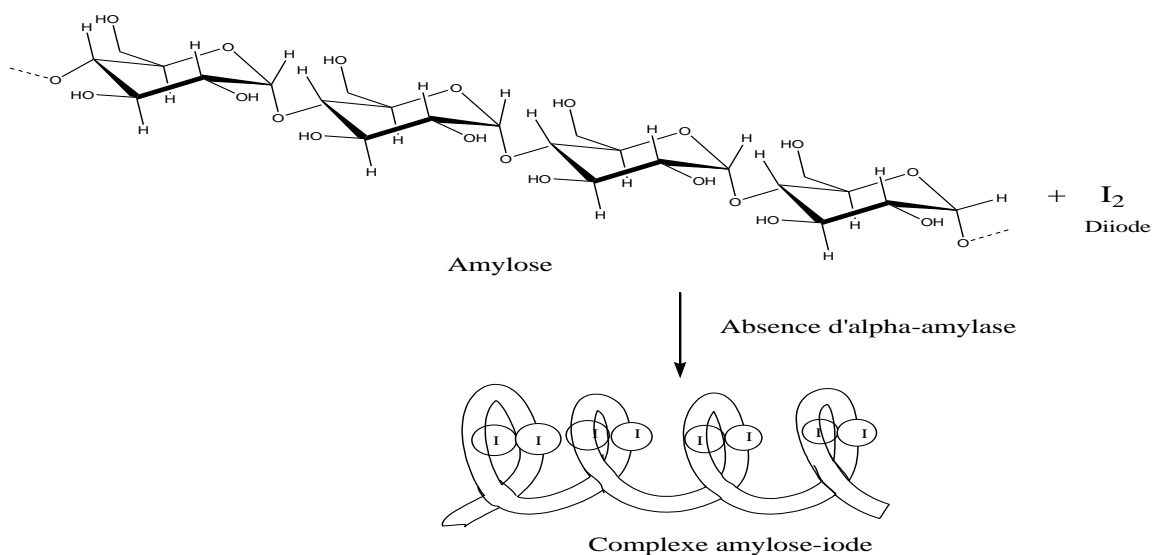
Les inhibiteurs antidiabétiques synthétiques actuellement utilisés causent des effets secondaires gastro-intestinaux tels que la diarrhée, la flatulence, le boursoufflage abdominal. Par conséquent, des inhibiteurs naturels d'alpha amylase peuvent être employés en thérapie pour le traitement de l'hyperglycémie postprandiale avec un minimum d'effets secondaires (Nair et al., 2013).

##### III.1.1. Inhibition de l'alpha amylase

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme digestive, produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques, synthétisée également dans les fruits de plantes durant leur maturation. C'est l'un des endo-amylases les plus significatives qui hydrolyse les liaisons  $\alpha(1-4)$  glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amidon pour donner des molécules de maltose (disaccharides de  $\alpha$ -glucose) (figure 15). Cette enzyme est principale pour l'absorption et la digestion de l'amidon et l'hydrate de carbone intégré dans la nourriture, ceci peut être une cible pour le traitement du diabète type 2.

L'Acarbose est un médicament bien connu, utilisé comme inhibiteur de l'enzyme  $\alpha$ -amylase. Il retarde la digestion d'hydrate de carbone et diminue le niveau postprandial de glucose plasmatique. Cependant, il possède des effets indésirables tels que la diarrhée, les hernies, l'ulcération...

Des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase d'origine naturelle tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques des plantes sont suggérés comme une approche alternative pour la prévention et le traitement de la maladie du diabète type 2 avec sans ou peu de risque d'effets secondaires (Khan et al., 2018).



**Figure15:** Formation du complexe amylose-iodine en absence de l' $\alpha$ -amylase (Boursier, 2005)

### III.2.Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme qui est impliqué dans la transmission du signal au niveau des neurones par son action hydrolytique sur le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) au niveau des synapses après son action sur les récepteurs postsynaptiques. Cette action permet l'arrêt de la transmission du signal, un mécanisme impliqué dans la régulation de la transmission neuronale comme montré dans la figure 16 (Mukherjee et al., 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, le taux du neurotransmetteur ACh connaît une diminution très remarquable due principalement à la mort des neurones productrices de ce neurotransmetteur (neurone cholinergiques) provoquée par plusieurs facteurs comme le stress oxydatif, accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde, etc. cette diminution anormale de l'ACh est à l'origine des symptômes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer comme la perte progressive de la mémoire, les troubles comportementaux, linguistiques, et autres troubles (Uriarte-Pueyo et Calvo, 2011).

Ainsi, l'une des stratégies proposées pour traiter la maladie d'Alzheimer, est d'augmenter la concentration de l'ACh dans la fente des synapses par l'inhibition de sa dégradation par l'AChE. En effet, les inhibiteurs de cette enzyme constituent le seul traitement approuvé et plusieurs molécules comme la galantamine, la tacrine, la rivastigmine, et le donepezil sont utilisés pour améliorer les symptômes des patients avec cette maladie (traitement palliatif) (Racchi et al., 2004).

Néanmoins, un grand effort a été dévoué pour la recherche de nouvelles molécules plus particulièrement d'origine naturelle exerçant un effet inhibiteur sur l'AChE comme alternatifs pour les médicaments actuellement utilisés. Parmi les composés dérivants des plantes, les alcaloïdes constituent les composés les plus actifs dans l'inhibition de l'AChE (Murray *et al.*, 2013).

Les monoterpènes constituant les huiles essentielles comme le géraniol, limonène, et l' $\alpha$ -caryophyllène ont montré un effet inhibiteur contre l'AChE mais faible (Mukherjee *et al.*, 2007). En plus de ces composés, certains flavonoïdes ont été rapporté d'avoir un effet inhibiteur de l'AChE (Uriarte-Pueyo et Calvo, 2011).

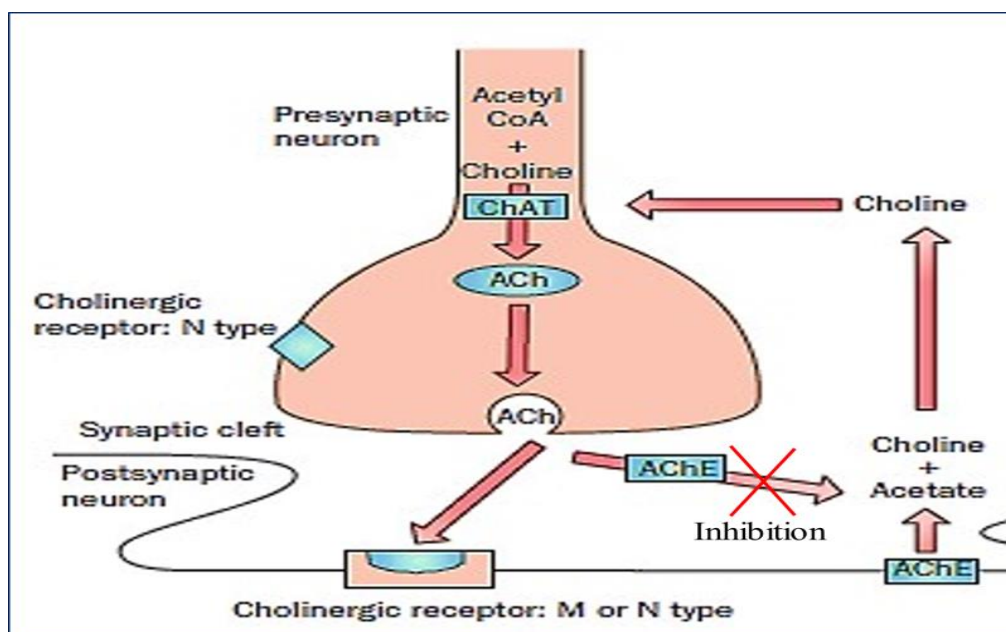


Figure 16: Principe de la transmission cholinergique ((Mukherjee *et al.*, 2007)

## IV. Activité antibactérienne

### IV.1. Généralités

Les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leur propriété antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de micro-organisme (Benrokia et Aouar, 2015).

## IV.2. Les principales substances antimicrobiennes

### IV.2.1. Les bactéries

Les bactéries (*Bacteria*) sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2  $\mu\text{m}$  et, jusqu'au début du XXI<sup>e</sup> siècle, les spécialistes considéraient que les plus petites mesuraient 0,2  $\mu\text{m}$ , mais il existe des « ultramicrobactéries », y compris en eau douce (Hahn et al., 2003).

#### IV.2.1.1. Les infections bactériennes

L'infection bactérienne correspond à l'invasion locale ou générale de l'hôte par des bactéries pathogènes. Elle conduit le plus souvent à une maladie infectieuse. Caractérisée par sa localisation et par des signes cliniques spécifiques lie au pouvoir pathogène de la bactérie (Savignac et al., 2005).

##### ➤ Localisation

- **L'infection locale** : est due à des micro-organismes qui résident dans un espace limité de l'organisme. Elle touche le plus souvent la peau ou les muqueuses.
- **L'infection loco-régionale** : est une infection locale qui s'est étendent. Elle peut attendre les vaisseaux lymphatiques puis les ganglions lymphatiques.
- **L'infection générale** : est caractérisée par une atteinte généralisée de l'organisme. Les microorganismes de l'infection loco-régionale se sont propagés au sang ou bien des microorganismes ont pénétré directement dans le sang par la voie veineuse. On parle de septicémie lorsque les micro-organismes se multiplient dans le sang et de toxémie si des toxines sont présentes dans le sang (Savignac et al., 2005).

#### IV.2.1.2. Description des bactéries étudiées

##### ➤ *Staphylococcus aureus*

Ces bactéries sphériques sont des cocci à Gram positif, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec *Staphylos*), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.



Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier.

L'espèce *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérococolites post-antibiotiques), septicémiques. *Staphylococcus epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales (Leclerc et al., 1995).

#### ➤ *Escherichia coli*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents. *Escherichia coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées) leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *Escherichia coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxigène (*turista*), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (Leclerc et al., 1995).

#### IV.2.2. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les microorganismes (Abdallah et al., 2019).

#### IV.2.2.1. Mode d'action

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets:

- Une activité létale (*bactéricide*): c'est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies ;
- Une inhibition de la croissance (*bactériostatique*) : inhibition momentanée de la multiplication d'une population (**Hammer, 1999**).

#### IV.2.2.2. Résistance aux antibiotiques

Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce (**Ramdani Bouguessaet al., 2009**).

##### ➤ Les types de résistance

- *Naturelle*: présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique.
- *Acquise*: qui est un résultat de la modification du patrimoine génétique. Il peut s'agir d'une mutation qui peut entraîner, par exemple, une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration (**Nauciel et Vildé, 2005**).

### IV.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

#### IV.3.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition n'est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour

des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose (Alawa, 2003 ; Fekih, 2015).

#### **IV.3.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)**

Selon Bendahou *et al.* (2008) et Chaker (2010), le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. C'est la concentration minimale inhibitrice (CMI), habituellement exprimée en mg/ml ou mg/L. Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue.

La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate.

##### **IV.3.2.1. La dilution en bouillon**

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence appropriés, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.

##### **IV.3.2.2. La dilution en gélose**

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

#### **IV.3.3. Méthode bio-autographique**

La méthode bio autographique consiste en l'isolement des constituants actifs à travers une cible après dilution rapide. Les chromatogrammes sont recouverts d'un milieu de culture incorporé de microorganismes. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C, un révélateur approprié permet d'observer l'activité (Fekih, 2015).

## CHAPITRE III : ETUDE BOTANIQUE ET PHYTOCHIMIQUE DE *PISTACIA LENTISCUS* ET DE *PINUS PINASTER*

### I. Etude botanique et phytochimique de *Pistacia lentiscus*

#### I.1. Description botanique

Le pistachier lentisque est un arbrisseau vivace de trois mètres de hauteur, ramifié, à odeur de résine fortement âcre (Beldi *et al.*, 2021). *Pistacia lentiscus* est une espèce de la famille des *Anacardiaceae*, dioïque (plantes mâles et femelles) (Amara *et al.*, 2019) qui produisent des baies globulaires rouge vif (Boudieb *et al.*, 2019). Cette espèce se distingue des deux autres espèces spontanées d'Algérie du même genre : *P. atlantica* Desf et *P. terebinthus* L (Doghbage *et al.*, 2020).



**Figure 17:** Arbuste de pistachier lentisque (Belksir et Ferdi, 2021)

Une étude monographique du pistachier a été réalisée par Zohary (1954) et Khelil et Kellal (1980) montrant que le genre *Pistacia* comprend les espèces suivantes :

- *Pistacia atlantica* Desf. ou pistachier de l'Atlas,
- *Pistacia lentiscus* L. ou lentisque : fruits non comestibles,
- *Pistacia terebinthus* L. ou thérébinthe: fruits aigrelets comestibles,
- *Pistacia vera* ou pistachier cultivé,
- *Pistacia afghanistania*,
- *Pistacia chinensis*,
- *Pistacia khinjuk*,
- *Pistacia mexicana*,

- *Pistacia palestina*,
- *Pistacia wienmannifolia*,
- *Pistacia intergerrima*.

Par ailleurs, en Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces ; en l'occurrence : *Pistacia lentiscus*, *Pistactcia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (Quezel et Santa ,1962).

## **I.2. Taxonomie**

D`après les études réalisées par **Quezel et Santa (1963)** et **Djedaia (2017)**, le position des lentisques dans la systématique du règne végétal est donnée par l`arbre phylogénique représenté dans le tableau ci-dessous:

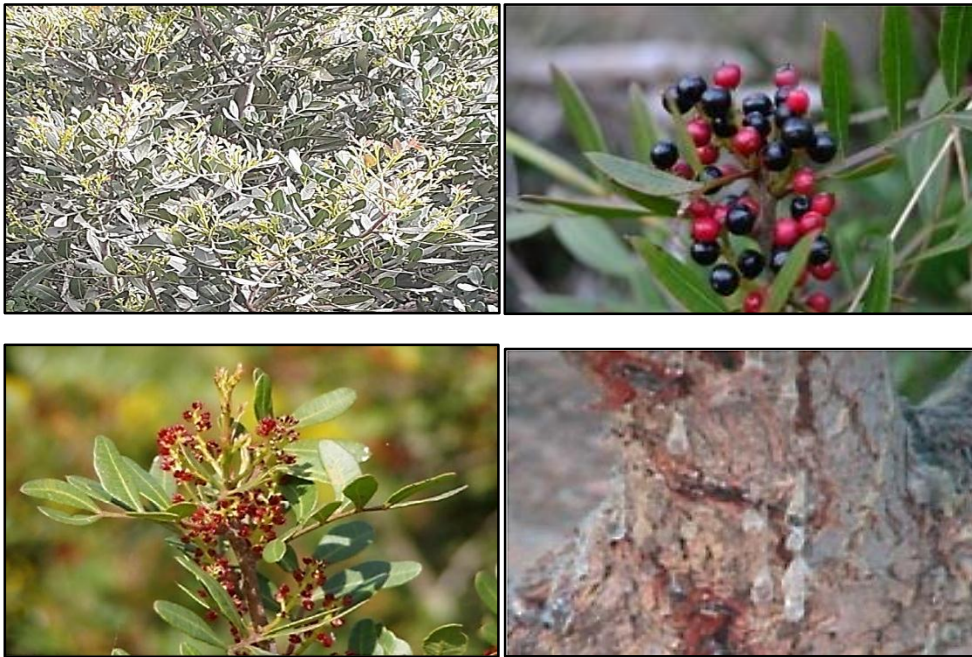
**Tableau 3:** Classification botanique du *Pistacia Lentiscus* (Djedaia, 2017)

<b>Règne</b>	<i>Plante</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous embranchement</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Classe</b>	<i>Dicotylédone</i>
<b>Sous classe</b>	<i>Dialypétales</i>
<b>Série</b>	<i>Diacifores</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindale</i>
<b>Famille</b>	<i>Anacardiaceés</i>
<b>GENRE</b>	<i>Pistacia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Lentiscus</i>

## **I.3. Morphologie de l`espèce**

- **les feuilles :** Les feuilles sont persistantes, paripennées, avec 4 à 10 folioles elliptiques, obtuses, mucronulées, coriaces, vert foncé sur la face supérieure, vert clair en dessous, à limbe décurrent. Le pétiole est étroitement ail (**Lemaistre, 1959**).

- **les fleurs** : L'espèce est dioïque (pied mâle et femelle sont distinct) ; fleurissent en grappes spiciformes denses de couleur rougeâtre, unisexuées et très aromatiques (**Amara et al., 2019**).
- **Les fruits** : Les fruits du pistachier est une baie globuleuse de 2 à 3 monosperme ; d'abord rouge, puis noir à maturité (**Amara et al., 2019**).
- **Mastic** : L'incision du tronc de cet arbuste fait écouler un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (**Bouhrara, 2015**).

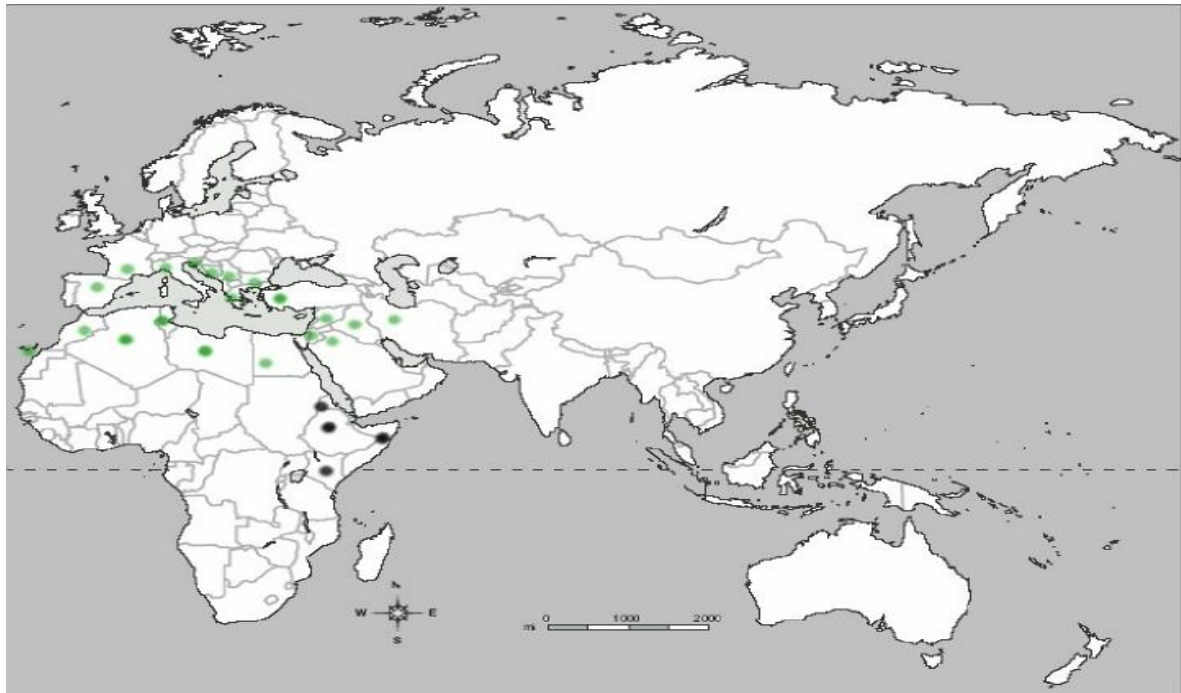


**Figure 18:** Les différentes parties du *Pistacia lentiscus* (feuilles, fruits, fleurs et mastic) (**Bendouissa, 2004**)

#### **I.4. Répartition géographique**

*Pistacia lentiscus* L. est une espèce forestière, originaire du sud européen (**Crété, 1965**). Cet arbrisseau est courant en sites arides de la région méditerranéenne (de l'Asie, l'Europe, l'Afrique jusqu'aux Canaris) (**Boullard, 2001**). Il pousse à l'état sauvage, sur tout type de sole dans l'Algérie sous climat subhumide et semi-aride (**Amara et al., 2019**). Il est couramment dispersé en Algérie sur tout le littoral (**Charef, 2008**).





**Figure 19:** Distribution de *Pistacia lentiscus* dans le bassin méditerranéen (Al Saghir, 2006)

### I.5. Nomenclature

*Pistacia lentiscus* L. (*Anacardiaceae*) connu dans les trois régions d'Algérie sous différents noms. Dans la région littorale de Jijel, à l'Est du pays, la plante se dénomme en dialecte local: « trouu troo ». Dans la région de la Kabylie (centre du pays): « Amadagh » et dans la région extrême-Est comme les localités de Guelma, Souk Ahras, Annaba et El Tarf, « Dharou » (Beldi et al., 2021).

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Nom arabe
<i>Pistacia lentiscus</i>	Lentisque	Lentisk	الضرو

### I.6. Usage thérapeutique

Il s'est avéré que 78% des usages de *P. lentiscus* sont thérapeutiques (Hafsé et al., 2015). Selon la partie utilisée de la plante, elle est connue pour traiter différentes maladies comme les ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, les brûlures, l'eczéma, les calculs rénaux, les douleurs dorsales (Moncef et al., 2021).

### **I.6.1. Propriétés biologique et pharmacologique**

Des recherches réalisées par **Moncef et al., (2021)** montrent une fréquence d'utilisation élevée de l'huile fixe extraite artisanalement à partir des fruits mûrs par rapport aux autres parties de la plante. Celle-ci est surtout préconisée en usage externe pour les troubles cutanés mais est aussi utilisée pour traiter les troubles gastro-intestinaux et les affections pulmonaires.

Par contre les résultats obtenus par **Hafsé et al., (2015)** indiquent que le feuillage représente la partie la plus utilisée de la plante (77%) et que les feuilles sont pourvues d'activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante. Elles sont également utilisées dans le traitement de l'eczéma, des infections buccales, des diarrhées, des lithiases rénales, de la jaunisse, des maux de tête, de l'asthme et des problèmes respiratoires.

Le mastic de *Pistacia* a été utilisé par les guérisseurs traditionnels pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (**Bemmou et al., 2015**).

*P. lentiscus* pourrait être considéré comme source de produit bioactifs pour la formulation de nouveaux médicaments, surtout qu'aucun effet indésirable n'a été signalé.

### **I.7. Etude chimique de *Pistacia lentiscus***

#### **I.7.1. Métabolites secondaires**

La plante est connue pour contenir une huile essentielle et fixe (**Arab, 2014**), une huile grasse (**Charef et al., 2008**), des tanins condensés et hydrolysables (**Abbas et Boudriche, 2007**), des glycosides flavonoïques (**Vaya et Mahmood, 2006**), des anthocyanes (**Longo et al., 2007**) et des triterpènes (**Atmani et al., 2002**).

L'étude phytochimique montre que les fruits de *Pistacia lentiscus* L. ont une très forte teneur en anthocyanes, leucoanthocyanes, tannins totaux, tannins galliques flavonoides, glucosides. Avec une présence modérée des mucilages et une absence totale des saponosides, des quinons libres, des coumarines et des alcaloïdes (**Arab, 2014**).

Les travaux réalisés par **Hamad et al. (2011)** ont montré aussi que les protéines représentent 5% du poids des fruits de *Pistacia lentiscus*. La composition minérale de ces fruits montre que la teneur en potassium est la plus élevée (2,67%), alors que celles du sodium, calcium et phosphore sont de : 0,46, 0,37 et 0,004 % respectivement.



La composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de glycosides de flavonoles comme la quercétine, myricetine, luteoline ainsi que l'isoflavone genisteine. Elle contiennent 6 à 7% du gallotannins de faible poids moléculaire, à savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3, 4,5-O-trigalloyl (**Romani et al., 2002**) et des stérols et triterpènes, des saponosides (**Bammou et al., 2015**).

## **II. Etude botanique et phytochimique de *Pinus pinaster***

### **II.1. Description botanique**

*Pinus pinaster* Aiton de la famille des Pinaceae est un arbre monoïque, à croissance initiale rapide et à port droit (**Figure 19**). C'est un arbre qui peut atteindre 30 m de haut (en général de 20 à 30 m), qui arrive à maturité vers 40 ou 50 ans et qui peut vivre jusqu'à 500 ans (**Rameau et al., 2008**). C'est un arbre d'assez grande taille, résineux avec une cime étalée et peu compacte, son tronc est recouvert d'une écorce, très épaisse et profondément crevassée est brun violacé (**Dominique, 2007**). La classification de Fieshi et Gausson distingue deux sous-espèces :

- *Pinus pinaster*ssp. *pinaster* (Pin mésogéen)
- *Pinus pinaster*ssp. *Atlantica* (Pin atlantique) (**Baradat, 1986**).

Par contre, selon **Farjon (2001)**, l'espèce *Pinus pinaster* est subdivisée en trois sous-espèces :

- *escarena* (syn. *hamiltonii*, syn. *mesogeensis*), présent sur les cotes méditerranéennes du sud ouest de l'Europe.
- *pinaster* (syn. *atlantica*, syn. *maritima*) présent sur les cotes atlantiques du sud ouest de l'Europe.
- *renouii* (syn. *maghrebiana*) présent au nord de l'Afrique.



**Figure 20: Le Pin maritime (Belksir et Ferdi, 2021)**

## II.2. Taxonomie

Selon **William (1789)**, *Pinus* est le genre des conifères le plus largement étendu dans la famille des *Pinaceae* avec plus de 100 espèces (**Farjon, 1984; Price et al., 1998**), comprenant notamment le pin maritime (*Pinus pinaster* ou *Pinus maritima*) dont la taxonomie est présentée dans le tableau ci-dessous (**Kramer et Green, 1990**).

**Tableau 4:** Classification botanique du *pinus pinaster* (**Kramer et Green, 1990**).

<b>Règne</b>	<i>Plante</i>
<b>Sous-règne</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Classe</b>	<i>Pinopsida</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Pinophyta ou conifère</i>
<b>Sous embranchement</b>	<i>Gymnospermes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pinales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pinacées</i>
<b>Genre</b>	<i>Pinus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pinus pinaster</i>

## II.3. Morphologie de l'espèce *Pinus pinaster*

Les rameaux, verticillés et étalés, forment au sommet de l'arbre un gobelet pyramidal s'arrondissant à maturité. Ils portent de gros bourgeons ovoïdes et non résineux (**Anonyme, 2003**).

- **les feuilles ou les aiguilles:** épaisses et rigides, sont groupées par deux (gémées). Leur section transversale a une forme semi-circulaire. Elles mesurent de 10 à 20 cm de long (**Rameau et al., 2008**).
- **L'écorce :** gris pâle chez les sujets jeunes, devient rougeâtre puis rougeâtre-noir au fil de l'âge. Épaisse, elle se crevasse avec les années et les rhytidomes forment de grandes écailles.
- **Le tronc :** flexueux, présente des courbures en différents sens.
- **les fleurs :** La floraison du pin maritime a lieu en avril mai.
- **Les fruits :** Les fruits sont des cônes très gros (10 à 18 cm de long) (figure 20) (**Dominique, 2007**).



a) Cônes femelles mûrs                      b) Écorce en plaques sur le tronc      c) Feuilles et fruits

**Figure 21:** Les différentes parties du pin maritime (*Pinus pinaster*) (Belksir et Ferdi, 2021)

Le pin maritime à une croissance rapide et sa longévité est de 200 ans environ. C'est une espèce monoïque, c'est-à-dire que les fleurs mâles et femelles sont distinctes mais présentes sur le même arbre. Les organes reproducteurs sont des cônes soit mâles, soit femelles. Il est pointu, brillant et allongé se présente en général par groupe de deux ou trois, de grande dimension (5 à 8 cm de large), souvent courbées à la base et presque toujours symétriques. Après maturation, les cônes peuvent rester sur les branches plusieurs années (Amitouche et Rakem, 2017) (figure 21).



**Figure 22:** Les cônes (Belksir et Ferdi 2021)

Essence de lumière, le pin maritime demande un climat assez chaud et supporte assez mal les hivers rigoureux. Une certaine humidité atmosphérique lui est nécessaire. Il se contente des sols les plus pauvres s'ils sont suffisamment profonds et dépourvus de calcaire (Tableau 5).

Tableau 5: Les stations favorables du pin maritime (Dominique, 2007)

Très sec						
Sec						
Mésophile						
Frais						
Assez humide						
Humide						
Inondé						
	Très acide	Acide	Assez acide	Peu acide	Neutre	Calcaire

#### I.4. Répartition géographique

Le pin maritime est une espèce de la méditerranée occidentale à affinité atlantique. Sa répartition est comprise entre le 31<sup>ème</sup> et 46<sup>ème</sup> de latitude Nord et entre le 8<sup>ème</sup> de longitude Ouest et le 13<sup>ème</sup> de longitude Nord (Figure 23).

Dans cette aire, le pin maritime se répartie comme suit:

- **En Europe:** Les peuplements de pin maritime se divisent en deux blocs :
  - Le premier concerne l'atlantique (Portugal, Espagne et la France).
  - Le deuxième celui du domaine méditerranéen (Ouest de l'Espagne, Sud Est de la France, des îles d'Elbe et de Pantelleria et ceux de la bordure du littoral de l'Italie) **Seigue (1985)**.
  
- **En Afrique:** Le pin maritime se limite à l'Afrique du Nord. Sa répartition est disjointe et se présente comme suit :
  - **En Algérie :** il se trouve sur le littoral constantinois, le tell oriental et dans le littoral kabyle. Les plus beaux peuplements se rencontrent à Collo et à Jijel (**Amitouche et Rakem ,2017**)
  - **Au Maroc :** elle s'étend sur les chaînes du Rif, du Moyen Atlas et du Haut Atlas (forêt de Puntacires au Rif) (**Alaoui et al., 2011**).

Les études récentes conduites par l'I.N.R.A. et l'Université de Bordeaux I portant sur la croissance, la forme, l'écophysologie et les gènes marqueurs (terpènes) aboutissent actuellement à distinguer cinq grandes races géographiques (R.G):

- R.G. du Maghreb : Algérie, Tunisie, Maroc.
- R.G. méditerranéenne continentale : Espagne de l'Est et du Sud, Var, Alpes-Maritimes, Italie.
- R.G. corse.
- R.G. ibérique Nord-Ouest (Portugal, Vieille Castille, Gallice).
- R.G. landaise (**Baradat, 1986**).



**Figure 23:** Air de répartition (Bleu) de pin maritime en Europe et en Afrique du nord

(Alia et Martin, 2003)

## II.5. Nomenclature

Selon **Kahlouche-Riachi, (2014)**, le pin maritime présente la nomenclature suivante :

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Nom arabe
<i>Pinus pinaster</i>	pin maritime	maritime pine	الصنوبر البحري

## II.6. Usage thérapeutique

L'utilisation des extraits d'écorces de pin maritime comme source de bienfaits pour la santé humaine remonte à Hippocrate, le « Père de la Médecine », qui mentionnait leurs effets thérapeutiques sur les maladies inflammatoires (**Packer et al., 1999**).



En Amérique, l'extrait d'écorces de pin maritime était utilisé par les Indiens natifs comme remède pour les plaies enflammées ou les ulcères (Yougken, 1924; Chandler et al., 1979).

### **II.6.1. Propriétés biologique et pharmacologique**

Les extraits d'écorce de *P. pinaster* contiennent un mélange d'un grand nombre de substances utilisées pour traiter un large éventail de maladies dégénératives grâce à leurs propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, anti tumorales, antiathérogènes, antivirales et antimicrobiennes.

Ils ont démontré des effets bénéfiques pour le traitement de plusieurs maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, métaboliques, neurologiques (Iravani, et al., 2011 ;Raza et al., 2019).Ainsi des avantages hypocholestérolémiant , ils augmentent la microcirculation par augmentation de la perméabilité capillaire (Rohdewald, 2002 ;Gulati, 2005).

- **L'activité anti-inflammatoire:** des effets anti-inflammatoires chez les patients asthmatiques et réduction des symptômes d'hyperactivité avec déficit de l'attention chez les enfants ont été notés (Lau et al., 2004 ;Dvorakova et al.,2007).Ces extraits agissent également sur les maladies neurodégénératives (Rohdewald, 2002).ils défendent les cellules nerveuses contre les bêta-amyloïdes, ou la toxicité induite par le glutamate, la perte d'histamine libéré des mastocytes et inhibe également l'action cytokine pro-inflammatoire (Peng et al., 2002 ;Blazso et al., 2004).
- **L'activité antioxydante :** Les extraits d'écorces de pin maritime montrent une activité antioxydante particulièrement élevée dans les tests de donneur d'hydrogène, transfert d'électrons en solution, d'inhibition de peroxydation lipidique en émulsion, par comparaison aux extraits de pépins de raisin (Tourino et al., 2005). Ces activités ont été reliées à la présence des procyanidines. Les antioxydants des extraits d'écorces de pin maritime donnent lieu à une synergie qui peut se perdre lors d'un fractionnement ou d'une purification (Jerez et al., 2009).

L'extrait peut également accroître l'activité des antioxydants synthétiques de la vitamine C et du Trolox dans un système modèle de peroxydation lipidique, l'effet étant dépendant de la dose et de la durée du traitement (Sivonova et al., 2006). Le recyclage de la vitamine C par les antioxydants apportés par l'extrait d'écorces de pin maritime explique leur effet de prévention du scorbut. L'extrait d'écorces de pin maritime peut donc être exploité comme agent antioxydant pour piéger des radicaux libres excessifs pour de nombreuses applications agroalimentaires et pour la protection de la peau (Ross et Kasum, 2002). D'ailleurs, plusieurs constituants des écorces de pin maritime tels que l'acide gallique, l'acide protocatéchique et la catéchine sont rapidement absorbés par la peau

humaine et rendent les extraits utilisables pour des applications topiques (Sarikaki et al., 2004). D'autres propriétés découlent de cette faculté à piéger les radicaux libres telles que des activités cardio-protectives, anticancéreuses et anti hypertensives (Packer et al., 1999).

- **Autres activités:** En plus de leurs activités antioxydant élevé, Tous les PBE présentait un activités antibactériennes et antihyperglycémiques. Et ils ont une faible cytotoxicité et une activité contre les cellules cancéreuses car celles-ci ont été négativement affectées (Pedro Ferreira-Santos et al., 2020).

## **II.7. Etude chimique de *Pinus pinaster***

Chimiquement, la famille des *Pinaceae*, dont les pins font partie, est surtout caractérisée par la présence de résines, de tanins, de terpènes, de lignans et de quelques stilbènes (La Fever et al., 1994).

### **II.7.1. Les métabolites secondaires**

L'activité biologique des extraits végétaux peut être attribuée à des métabolites secondaires. En particulier, les extraits de *Pinus pinaster* sont riches en acides phénoliques, flavanols et flavonoïdes (ex : acide cinnamique, acide hydroxy benzoïque, catéchine, quercétine et taxifoline) (Market et al., 2019).

- **Les Polyphénols**

Les composés phénoliques retrouvés dans les pins sont très variés. Les lignans, dérivés des phénylpropanes, sont souvent présents en grande quantité. Ceux principalement rencontrés dans le bois de cœur, les nœuds et l'écorce sont le lariciresinol, Tisolariciresinol, le secoisolariciresinol et le (-)-nortrachelogenin (Suga et al., 1993; Willfôr et al., 2003a; Willfôr et al., 2003b). Le xylopyranoside de (+)-isolarisiresinol est un glycoside de lignan isolé dans un extrait méthanolique des aiguilles de *Pinus densiflora* (Jung et al., 2003).

Les stilbènes constituent aussi des composés phénoliques majoritaires dans le bois interne de plusieurs pins. Certains agissent comme phytoalexin, c'est-à-dire que leur présence a été induite par un stress provenant d'une attaque fongique ou bactérienne. Les plus rencontrés dans le genre *Pinus* sont le *pinosylvin*, le *pinosylvin* monométhyl éther et le *pinosylvin* diméthyleéther. Ces derniers sont des constituants caractéristiques du bois interne du genre *Pinus* (Rowe, 1989).

La teneur en extractibles et en polyphénols des écorces de pin maritime a été déterminée par diverses méthodes comme le renseigne le tableau 6.

**Tableau6:** Teneur en extractibles et en polyphénols des écorces de pin maritime obtenus selon plusieurs méthodes d'extraction

Source	Conditions d'extraction	Teneur en extractibles (mg par 100 mg de matière sèche)	Rendement en polyphénols (mg EAG par 100 mg de matière sèche)	Origine géographique de la matière première
Fradinho et al., 2002	Appareil de Soxhlet Eau, éthanol, dichlorométhane 480 min, après traitement alcalin	eau : 3,2 éthanol : 10,3 dichlorométhane : 3,1	N.D.	Centre du Portugal
Pinelo et al., 2004	Agitation à 120 rpm Eau acidifiée avec HCl, méthanol, éthanol 98% 30-90 min, 25-50°C, L/S 5-10	eau : 1,7 ± 0,1 méthanol : 2,9 ± 0,2 éthanol : 8,2 ± 0,1	eau : 1,9 ± 0,01 méthanol : 11,2 ± 0,44 éthanol : 8,2 ± 0,6	Tàrrega, Lleida, Espagne
Jerez et al., 2006	Agitation à 140 rpm Ethanol 98% 90 min, 50°C, L/S 5	N.D.	8,5	Vedra, Coruña, Espagne
Braga et al., 2008	Appareil de Soxhlet Ethanol 120 min, L/S 50	9,7 ± 0,9	N.D.	Beira Litoral, Portugal
Braga et al., 2008	Extraction en fluide supercritique CO <sub>2</sub> puis CO <sub>2</sub> et éthanol 10% 190 min, 150 bar, 40°C	3,0	N.D.	Beira Litoral, Portugal

#### ● Les flavonoïdes

L'équipage de l'explorateur français Jacques Cartier a découvert, lors de l'hiver 1534, que la décoction d'écorces de pin maritime prévenait avec efficacité le scorbut causé par une carence en vitamine C (Maimoona et al., 2011). Plus tard le professeur Jacques Masquelier détermina que les flavonoïdes, en grande quantité dans l'extrait d'écorces de pin maritime, étaient responsables de l'activité anti-inflammatoire.

#### ● Les tanins

Les principaux tanins retrouvés dans les pins, surtout étudiés à partir du pin maritime (*Pinus maritima*), sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol. Les plus fréquemment retrouvés sont les procyanidines, c'est-à-dire des oligomères de catéchine ou d'épicatéchine (Romani et al., 2006). Les tanins constituent la plus grosse fraction d'extractibles polyphénoliques. Les Polyphénols les plus communs dans l'écorce de pin maritime sont la catéchine, l'épicatéchine, la dihydroquercétine (ou taxifoline), et des dimères, trimères, oligomères et polymères de procyanidine tels que les oligoproanthocyanidines composées de sous unités flavan-3-ol (Wood et al., 2002).



- **Les terpènes**

Une très grande variété de terpènes a été identifiée dans le genre *Pinus*. Les compositions en terpènes volatils des aiguilles de plusieurs espèces de pin ont déjà été analysées. Les composés présents en plus grandes quantités sont des mono ou des sesquiterpènes et leurs concentrations varient d'une espèce à l'autre (Tsitsimpikou et al., 2001; Yu et al., 2004; Hong et al., 2004 ; Ka et al.,2005)..

***PARTIE***  
***EXPERIMENTALE***

## MATERIEL ET METHODES

Notre présente étude a pour but d'évaluer in vitro quelques activités biologiques rattachées à deux espèces végétales à savoir *Pistacia lentiscus* et *Pinus pinaster*. A cet effet, une investigation phytochimique est réalisée sur les feuilles du lentisque et l'écorce du pin. Ceci dans le but d'extraire les métabolites secondaires responsables de l'activité antioxydante, antimicrobienne et de l'activité enzymatique de ces deux espèces végétales et de faire une étude comparative de ces deux espèces.

Pour cela, un suivi de certains paramètres physico-chimiques et biologique a été réalisé au niveau du laboratoire de Pharmacologie toxicologie de l'institut des sciences vétérinaire de Constantine 1, du laboratoire régional de la police scientifique ainsi qu'au niveau des laboratoires de productions animales et de biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

### I. Matériels

#### I.1. Matériels végétales

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par deux plantes :

*Pistacia lentiscus* appartenant à la famille des *Anacardiaceae*, et *Pinus pinaster* de la famille des *Pinacée* représentées comme suite :

- **Les feuilles de *Pistacia lentiscus*(PLE)** : La partie aérienne de la plante (feuilles) est récoltée dans la région de Larouche wilaya de Skikda en Mai 2021(**Figure 24**).



a) Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L.



b) la région du récolte

**Figure 24: (Belksir et Ferdi, 2021)**

- L'écorce de *Pinus pinaster* (PPI): La partie du tronc du pin maritime (écorce) est récoltée en Mai 2021 dans la région de Djebel El Ouahch de la wilaya de Constantine (Algérie). (Figure 25).



a) le tronc du pin maritime.



b) la région du récolte

**Figure 25: (Belksir et Ferdi, 2021)**

Les échantillons sont nettoyés et séchés (figure 26) à température ambiante et à l'abri de la lumière pour mieux conserver les molécules sensibles. Par la suite, la plante a été broyée finement et conservée dans un endroit sec à l'abri de la chaleur et de la lumière. La poudre végétale ainsi obtenue a servi pour l'extraction (Figure 27).

**Figure 26: séchage des feuilles de PLE****Figure 27: Broyage des feuilles de PPI**

## II. Méthodes

**Principe :** Le choix du solvant est le premier facteur qui permet d'agir sur le rendement et la sélectivité d'une extraction solide/liquide. Il doit, bien sûr, être apte à solubiliser les composés à extraire, si possible sans limitation de solubilité, mais aussi présenter une bonne affinité pour le support solide sans solubiliser d'autres constituants présents (sélectivité) et permettre son recyclage et la purification de l'extrait à coût énergétique et impact environnemental moindres, le solvant doit aussi satisfaire des contraintes telles que : la sécurité (risque d'inflammabilité et d'explosivité), l'absence d'émission de composés organiques volatils, l'absence de toxicité, (Ademe, 2012; Kim et al., 2009).

### II.1. Préparation des extraits aqueux bruts

L'eau, molécule de petite taille dont les composantes de polarité et de liaison hydrogène sont très élevées, est le solvant naturel du vivant dans lequel se réalisent la synthèse des métabolites cellulaires et les échanges intra- et intercellulaires (Raven et al., 1999). Ainsi, bien que métabolisés dans l'eau, tous les métabolites secondaires ne sont pas solubles dans ce solvant à température ambiante et pression atmosphérique (ex des Polyphénols) (Collin et al., 2011).

Donc l'élévation de la température ou la déstructuration de la matière végétale (broyage, traitement thermomécanique, etc.) préalables ou simultanées, préconisées pour accélérer l'extraction, se traduisent alors par une modification de la matrice solide (déstructuration des membranes par dénaturation des protéines et des assemblages de complexes lipoprotéiques, rupture des parois, voire défibrage des structures pariétales lignocellulosiques).

C'est le cas de l'extraction des polyphénols, accumulés dans des vacuoles à l'intérieur des cellules vivantes sous forme glycosylée ou d'autres formes conjuguées (Dixon et Paiva, 1995). Ils peuvent, par ailleurs, être présents dans certaines parois, comme, par exemple, les tanins au cœur du bois (Amrani Joutei et al., 1994). Leur extraction nécessitera alors une rupture des structures vacuolaires et pariétales, suivie d'une diffusion de la matrice solide vers le solvant.

#### II.1.1. Procédure de l'extraction (L'extraction à chaud ou décoction)

l'extraction par décoction a été effectuée sur les deux parties des plantes (Les feuilles de *Pistacia lentiscus* et L'écorce de *pinus pinaster* selon le protocole décrit par BAMBÀ et al., (2021).

Une masse de 100 g de poudre végétale fine a été ajoutée à 1L d'eau distillée et le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement, la décoction (le mélange) a été essorée dans un carré de tissu propre, puis filtrée successivement deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier filtre (papier Whatman® 3mm). Le filtrat obtenu a été ensuite séché lentement à l'étuve à



50 °C pendant 72h. La poudre obtenue ou décocté aqueux a été conservée dans un flacon stérile et sec. Les différentes étapes d'extraction sont présentés dans la **figure 28** suivante

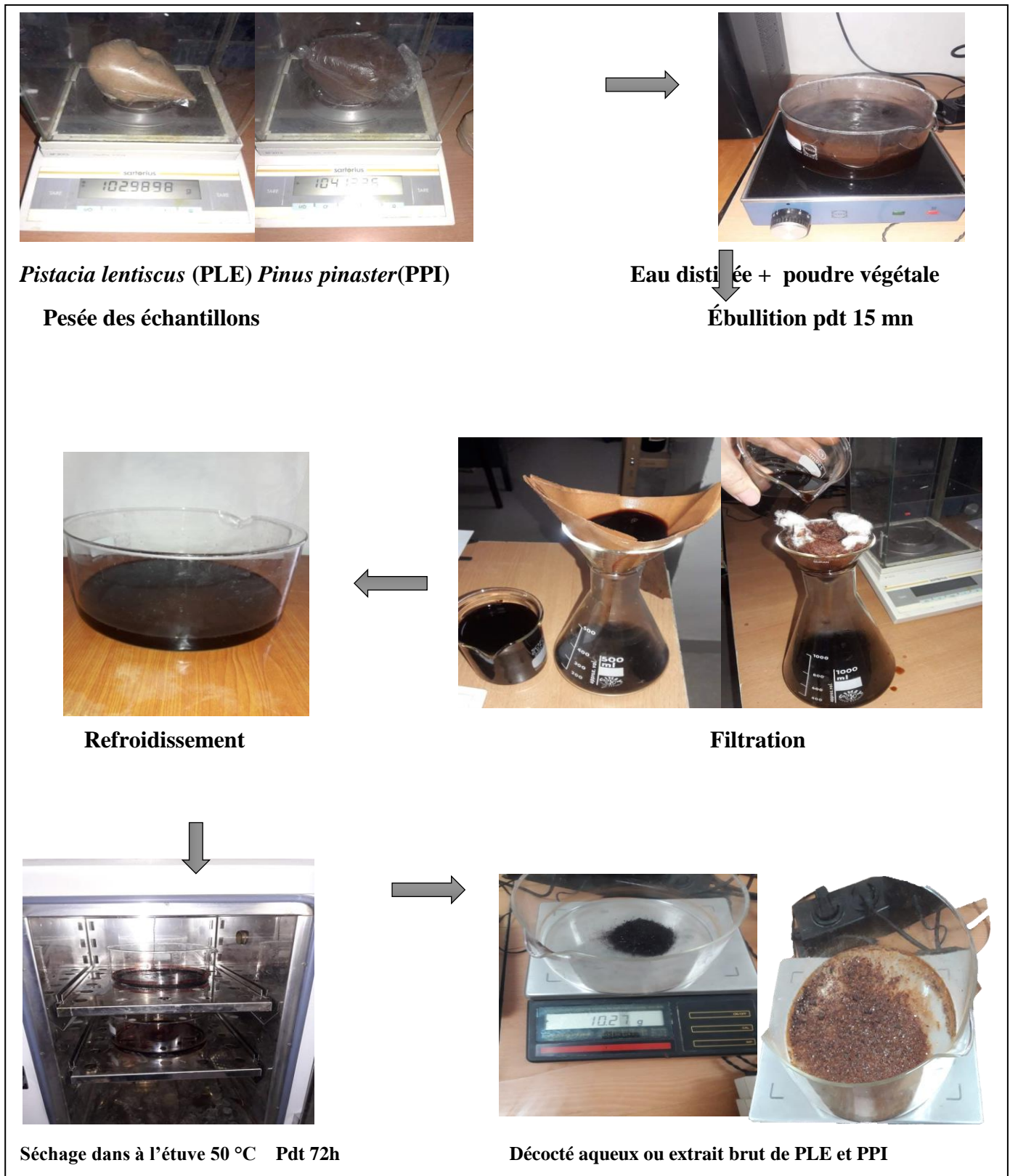
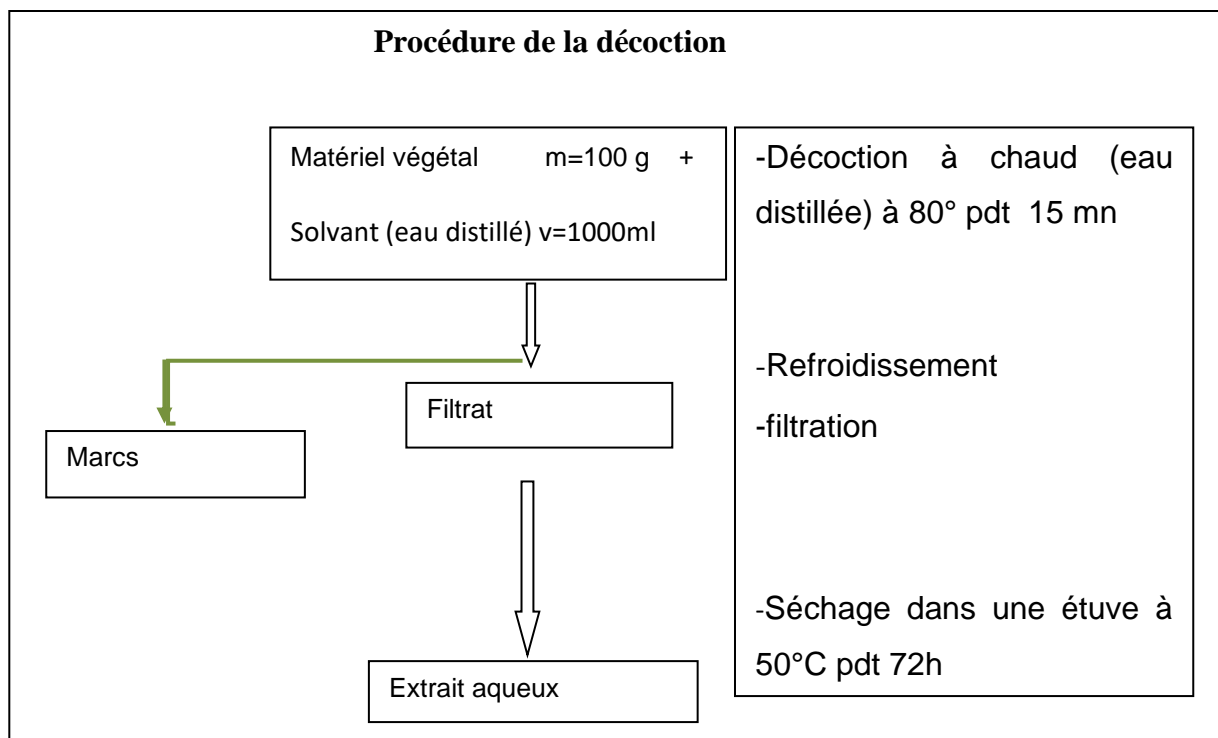


Figure 28: Procédure de la décoction (Belksir et Ferdi, 2021).



### II.1.2. Le rendement

La mesure d'un rendement de l'extrait (R) est une étape très importante pour savoir la quantité et le pourcentage d'extrait obtenus par une extraction. Ce rendement est le rapport entre le poids de l'extrait sec (après l'évaporation) exprimé en g et le poids de l'échantillon initial (poudre végétale en g). Le rendement d'extraction (%) pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (Me / M) \times 100$$

**Equation 1:** Rendement de l'extraction

(%) : Rendement d'extraction exprimé en %.

**Me** : Masse de l'extrait sec résultant en g

**M** : Masse du matériel végétal (poudre) en g utilisée pour l'extraction.

## II.2 Dosage colorimétrique des polyphénols

### II.2.1 Dosage des polyphénols totaux

#### ➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide

phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui sera réduit, en milieu alcalin par les polyphénols, donnant un mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm (Sango, 2006).

#### ➤ Procédure du dosage

Le contenu en polyphénols totaux est détecté en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) (Singleton et Rossi, 1965) par la méthode de dosage sur microplaque de 96 puits décrite par Muller et al., (2010). Un volume de 20  $\mu$ l d'extrait de plante (1 mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100  $\mu$ l de FCR dilué (1:10). Ensuite un volume de 75  $\mu$ l de carbonate de sodium (7,5%) est additionné (Annexe V). Après 2 heures d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance de différentes intensités de la couleur bleue résultante est déterminée à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Les teneurs en polyphénols sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique et sont exprimés en  $\mu$ g équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg).

#### ➤ Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique

On prend une quantité de 0,5 mg de l'acide gallique qui est dissoute dans 5ml de méthanol pour obtenir la solution S1. Le tableau suivant représente les dilutions préparées pour la solution étalon.

**Tableau 07** : Les dilutions de la gamme d'étalon de l'acide gallique

Dilutions	25 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml	75 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	125 $\mu$ g/ml	150 $\mu$ g/ml	175 $\mu$ g/ml	200 $\mu$ g/ml
SM ( $\mu$ l)	25	50	75	100	125	150	175	200
Méthanol ( $\mu$ l)	175	150	125	100	75	50	25	0

20 $\mu$ l de chaque dilution sont transférés dans une microplaque avec 100 $\mu$ l FCR (1:10) et 75 $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  (7,5%). L'incubation dure 2 heures suivie par la lecture sur microplaque à 765nm.



### II.2.3. Dosage des flavonoïdes

#### ➤ Principe

Les teneurs des flavonoïdes ont été mesurés par une méthode utilisant le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika , 2005).

#### ➤ Procédure du dosage

La méthode décrite par Topçuet *al.*, (2007) est utilisée et adaptée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits.

Un volume de 50  $\mu\text{l}$  de l'extrait est mélangé avec 130  $\mu\text{l}$  de méthanol, 10  $\mu\text{l}$  d'acétate de potassium et 10  $\mu\text{l}$  de nitrate d'aluminium (Annexe V). Le mélange est ensuite maintenu à la température ambiante pendant 40 min puis une lecture d'absorbance est réalisée à 415 nm. Les concentrations en flavonoïdes sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage tracée utilisant la quercétine comme standard (Annexe IV). Les résultats sont rapportés en termes de  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$ ).

#### ➤ Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine

On prend 1 mg de la Quercétine et on dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0.2mg /ml  $S_M$

**Tableau 08:** Les dilutions de la gamme d'étalon de la Quercétine

Dilutions	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	75 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	175 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
SM ( $\mu\text{l}$ )	25	50	75	100	125	150	175	200
Méthanol ( $\mu\text{l}$ )	175	150	125	100	75	50	25	0

50  $\mu\text{l}$  de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130  $\mu\text{l}$  (MeOH) + 10 $\mu\text{l}$  ( $S_1$ ) ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) + 10  $\mu\text{l}$  ( $\text{AL}(\text{NO}_3)_2, 9\text{H}_2\text{O}$ ) + attendre 40 mn + lecture à 415nm.

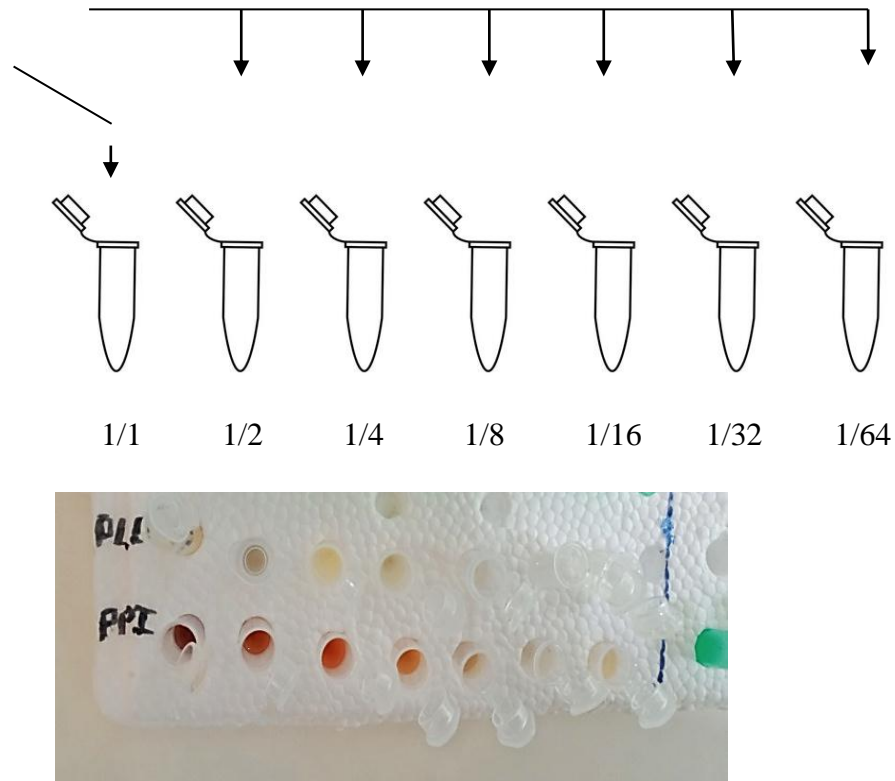
### II.3. Les activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée sur une microplaque 96 puits utilisant différentes concentrations d'échantillon. La concentration initiale est fixée à 4 mg/ml. Pour cela, une

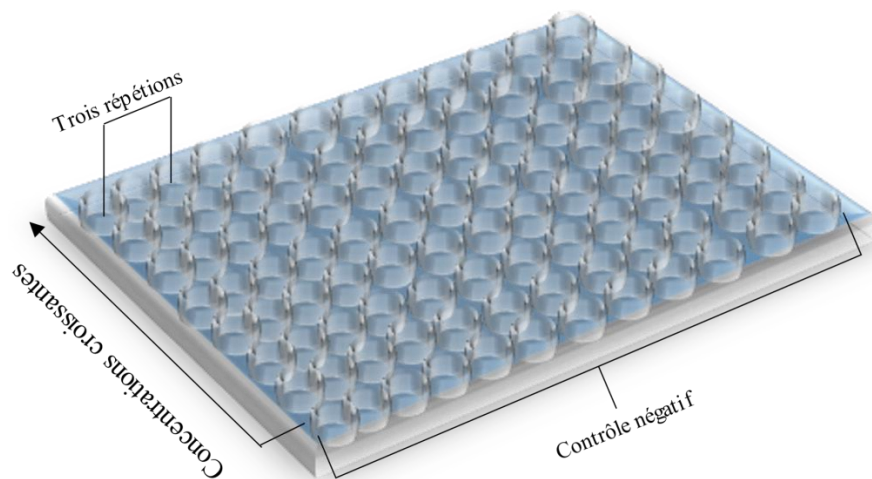
série de 7 dilutions a été réalisée dans des Eppendorfs par transfert d'un volume de 500  $\mu$ l de chaque concentration dans un Eppendorfs contenant 500  $\mu$ l du méthanol comme le montré la (figure 29).

500  $\mu$ l de Méthanol+ 4 mg d'échantillon

+ 1ml de Méthanol



**Figure 29:** Eppendorfs contenant les dilutions des deux extraits



**Figure 30:** Préparation des dilutions et mode opératoire sur une microplaque 96 puits

### II.3.1 Activité antiradicalaire au DPPH

#### ➤ Principe

La méthode de DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène ou d'électrons (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. La solution initiale de DPPH (forme radicalaire) possède une couleur violette avec un maximum d'absorbance à 517 nm. La réduction de cette solution entraîne la transformation de la couleur violette en couleur jaune. L'absorbance de la couleur violette restante après réduction est ainsi mesurée à 517 nm. Plus la perte de la couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (Belmokhtar, 2015).

#### ➤ Procédure du dosage

L'activité antiradicalaire au DPPH est déterminée spectrophotométriquement par la méthode décrite par Blois (1958). Sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160 µl du DPPH• (Annexe II) a été mélangé avec 40 µl de l'extrait préparé à plusieurs concentrations. Le mélange a été maintenu à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min.

La capacité antioxydant de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• et est calculée par l'équation suivante

$$\% \text{ Inhibition} = (A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle} \times 100$$

**Équation 2:** Pourcentage d'inhibition du DPPH.

**A échantillon :** Absorbance de l'échantillon.

**A contrôle :** Absorbance du contrôle négatif.

### II.3.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS•+

#### ➤ Principe

L'ABTS<sup>•+</sup> forme également un radical libre relativement stable. Dans cette méthode, une solution du cation ABTS<sup>•+</sup> de couleur bleue est préparée au préalable par la réaction de l'ABTS (forme réduite) avec le persulfate de sodium (oxydant) pendant 16h. La réduction de l'ABTS<sup>•+</sup> par l'addition d'un antioxydant entraîne la décoloration de la solution bleue dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm.

### ➤ Procédure du dosage

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al., (1999)**. Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 160 µl d'ABTS•+ (**Annexe II**) a été ajouté à 40 µl de l'extrait dilué dans le méthanol à plusieurs concentrations. Le mélange a été maintenu à l'obscurité et à température ambiante, après 10 min d'incubation l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le trolox et le l'acide ascorbique sont utilisés comme standards(**AnnexeII**).

$$\% \text{ Inhibition} = (A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle} \times 100$$

**Équation 3:** Pourcentage d'inhibition d'ABTS.

### II.3.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

#### ➤ Principe

La méthode du pouvoir réducteur est utilisée pour mesurer la capacité réductrice des ions de fer. Dans cette méthode, le fer ferrique complexé au ferrocyanure ( $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ ) est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ ) présentant une couleur bleu-verte avec un maximum d'absorption à 700 nm (**Hsu et al., 2006 ; Bijoyet et al., 2008**).

#### ➤ Procédure du dosage

Le pouvoir réducteur des extraits bruts de *Pinus* et de *Pistacia* est déterminé par la méthode d'**Oyaizu (1986)** avec une légère modification. Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations est additionné à 40 µl d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) (**Annexe V**) et à 50 µl d'une solution de ferricyanide de potassium (1%).

L'ensemble est incubé dans l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 µl d'acide tri-chloroacétique (10%) sont ajoutés pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40 µl d'eau distillée et 10 µl d'une solution de chlorure de fer anhydre (0,1%) sont ajoutés (**Annexe V**).

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Le contrôle positif est représenté par solutions d'antioxydants standards : l'acide ascorbique et trolox dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons (**Annexe IV**).

Les résultats ont été calculés à titre de 0,50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

### II.3.4 L'activité de phénanthroline

#### ➤ Principe

La méthode est basée sur la réduction des ions de fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe 1, 10-phenanthroline- $\text{Fe}^{+3}$  par les antioxydants vers le fer ferreux pour donner le complexe phénanthroline- $\text{Fe}^{+2}$  de couleur rouge dont l'absorbance est mesurée à 510 nm (**Szydłowska-Czerniaka, 2008**).

#### ➤ Procédure du dosage

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de **Szydłowska-Czerniak et al., (2008)**. Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30  $\mu\text{l}$  de phénanthroline (0,5%) et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol (**Annexe II**). Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min et l'absorbance est mesurée à 510 nm. Le trolox et l'acide ascorpique (**Annexe II**) sont utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

## I.2. II.4 Activité enzymatique

### II.4.1 Inhibition de l' $\alpha$ -amylase

#### ➤ Principe :

L' $\alpha$ -amylase dégrade l'amidon en composés moins complexes qui ne peuvent pas réagir avec l'iode. L'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par un inhibiteur entraîne l'accumulation de l'amidon qui réagit par suite avec l'iode pour donner un complexe bleu-noir dont l'absorbance est mesurée à 630 nm.

#### ➤ Procédure du dosage

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase a été déterminée par la méthode de **Zengin et al. (2014)** avec quelques modifications. Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 25  $\mu\text{l}$  d'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 50  $\mu\text{l}$  d'une solution d' $\alpha$ -amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  d'amidon (0,1%) sont additionnés. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 25  $\mu\text{l}$  d'acide hypochlorique (1M) et 100  $\mu\text{l}$  d'iodure de potassium iode sont ajoutés. La lecture de l'absorbance est réalisée à 630 nm. L'acarbose est utilisée comme standard (**Annexe II**). Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase a été calculé par la formule suivante :



### ➤ Procédure du dosage

Dans une microplaque à 96 puits, 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8) et 10 µl des extraits bruts des deux plantes étudiées avec différentes concentrations et 20 µl de l'enzyme acétylcholinestérase ( $5.32.10^{-3}$  U) sont mélangés. Après une incubation de 15 min à 25°C, 10 µl de DTNB (0.5mM) et 10 µl d'acétylthiocholine iodide (0.71 mM) sont ajoutés.

L'absorbance de la couleur jaune ainsi formée est immédiatement mesurée à 412 (t= 0min) et après 15 min. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentages d'inhibition après soustraction des absorbances à t=0 min on utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_C - A_E) / A_C * 100$$

**Équation 5:** Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Où :

Ac : est l'absorbance du contrôle négatif (sans extrait)

AE : est l'absorbance de la réaction en présence de l'extrait.

## II.5. Activité antibactérienne

### II.5.1. Souches bactériennes

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* et d'écorce de *Pinus pinaster*, deux souches bactériennes ont été utilisés provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Skikda .Les deux souches utilisées sont :

- **Bactéries à Gram négatif:** *Escherichia coli* : souche de référence (ATCC 25922) isolée de d'examen cytobactériologique urinaire ECBU.
- **Bactéries à Gram positif :** *Staphylococcus aureus* : souche de référence (ATCC 25923) isolée à partir d'une plaie de diabétique.

### II.5.2. Les milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés dans l'activité antibactérienne sont :

- Gélose nutritive pour préparer des cultures jeunes de 24 ;
- Héктоen comme milieu sélectif pour l'isolement d'*Escherichia coli* ;
- Chapman comme milieu sélectif pur l'isolement et l'enrichissement du *Staphylococcus aureus*
- La gélose Muller Hinton pour les tests antibactériens (antibiogramme).



### II.5.3. Préparation des cultures jeunes :

Quelques colonies bien isolées des cultures pures sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis mises dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9% de (Na Cl). La suspension bactérienne a été bien homogénéisée. A partir de cette suspension, nous avons ensemencé les souches bactériennes sur des boîtes de pétrie coulées avec de la gélose nutritive puis incubé à 37C° pendant 24 h afin d'avoir des cultures jeunes.



**Figure 32: Préparations des cultures jeunes dans les différents milieux de culture**

### II.5.4. Préparation de l'inoculum

Quelques colonies isolées à partir de culture jeune ont été mises en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de (Na Cl), ont été bien homogénéisée, puis la suspension a été ajusté à 0,8 Mc Farland (DO=0,08 à 0,1) à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté soit en additionnant de la culture bactérienne s'il est faible ou d'eau physiologique s'il est trop fort, puis nous avons pris 1 ml de l'inoculum qui a été introduit dans 9 ml d'eau physiologique afin d'obtenir un inoculum de  $10^7$  UFC/ml (Kheyar et al., 2014).



**Figure 33: Préparation des suspensions bactériennes**



#### II.5.4. Méthode de diffusion

Pour étudier l'activité antibactérienne des extraits aqueux bruts des obtenus, on a choisi la méthode de diffusion sur disques, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949 et cité par (**Rhayour, 2002**).

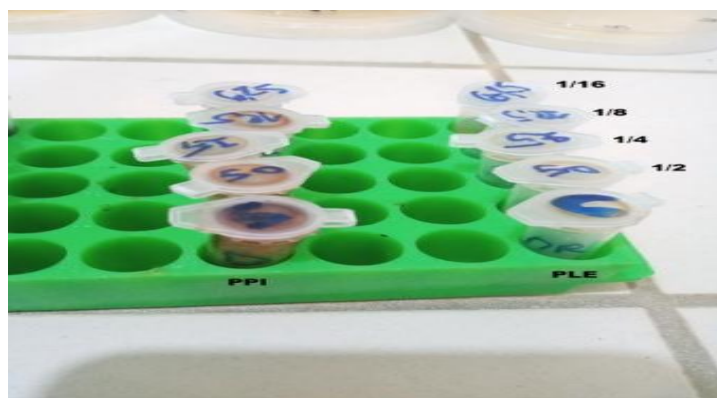
Dans cette méthode, on a utilisé des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre, imprégnés par un volume connu de l'extrait brut à évaluer et déposés à la surface d'un milieu gélosé (Agar de Muller Hinton « AMH »), préalablementensemencé par écouvillonnage en surface par la suspension bactérienne. Après incubation pendant 24 h à 37° C, la lecture des résultats a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm (**Ponce et al., 2003**).

#### II.5.5. Préparation des dilutions

Une gamme de concentration a été préparée à partir de l'extrait aqueux brut de concentration de 0,1g/ml selon la méthode de dilution de deux en deux (1/2, 1/4, 1/8, 1/16), dans les cinq tubes à essai que nous avons nommé de 1/2 jusqu'à 1/32, nous avons déposé 500µl d'eau, ensuite nous avons ajouté au premier tube (1/2) ,500µl de l'extrait aqueux brut, puis nous avons bien homogénéisé pour obtenir une solution de dilution 1/2, ensuite à partir de cette dernière nous avons pris 500µl que nous avons introduit dans le deuxième tube (1/4) pour obtenir une solution de dilution 1/4. Et les mêmes étapes ont été répétées jusqu'à l'obtention de la dernière solution à dilution 1/16(**figure 34**).

La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition selon (**Ponce et al., 2003**).

- (-) souche résistante ( $D < 8 \text{ mm}$ )
- (+) souche sensible ( $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$ )
- (++) souche très sensible ( $15\text{mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$ )
- (+++) souche excrément sensible ( $D > 20 \text{ mm}$ )



**Figure 34:** Préparation des dilutions pour les deux extraits de *Pistacia lentiscus* et de *Pinus pinaster*

- **Analyses statistiques**

Les résultats de dosages biochimiques et des tests biologiques *in vitro* effectués sur les extraits bruts des feuilles et de l'écorce des deux plantes respectives *Pistacia lentiscus* et de *Pinus pinaster* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD d'analyses en trois répétitions. Les valeurs de  $CI_{50}$  (Concentration d'inhibition à 50%) et de  $A_{0.5}$  (Concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des trois courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour la  $CI_{50}$  et [Absorbance = f (concentrations)] pour la  $A_{0.50}$ .

Dans la présente partie, nous présenterons et traiterons les résultats obtenus de l'étude phytochimique et de l'activité biologique *in vitro* des extraits bruts des feuilles de *Pistacia lentiscus*(PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster*(PPI). Ceci dans le but d'extraire les métabolites secondaires et l'analyse quantitative par dosages colorimétriques ainsi que la comparaison de l'activité anti-oxydante, antimicrobienne et enzymatique de ces deux espèces végétales jouissant de propriétés pharmacologiques intéressantes.

### I. Rendement d'extraction

La première quantification à faire est celle du rendement de l'extrait brut des feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Pinus pinaster* obtenu par la technique de décoction.

Les résultats obtenus par les calculs de rendements des deux extraits aqueux sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 09:** Le rendement d'extraction

	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Pinus pinaster</i>
<b>Me (Masse de l'extrait sec (g))</b>	10.61	9.88
<b>M (Masse du matériel végétal (poudre) sec (g))</b>	100	100
<b>R (Rendement d'extraction (%))</b>	10.61 %	9.88 %

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits aqueux présentent un rendement respectif de **9.88% et 10.61 %** pour l'écorce de *Pinus pinaster* et les feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Il est important de souligner que la variation des résultats d'un extrait à l'autre est influencé par la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid) (**Celhay ,2013**).

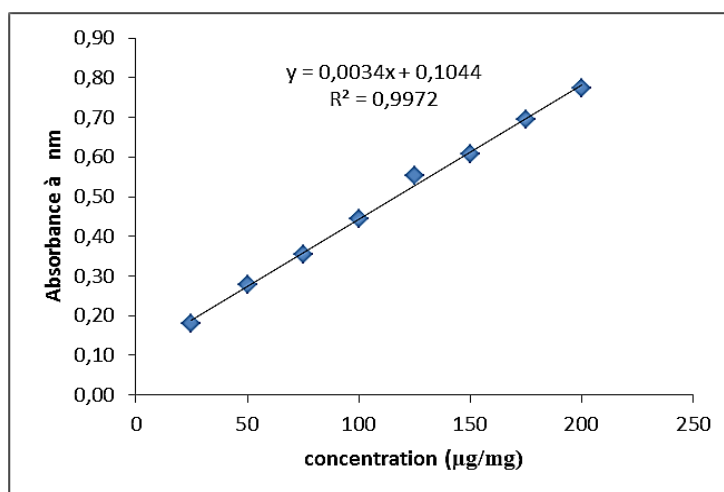
Rappelons que le produit ionique de l'eau augmente sensiblement avec la température et que son pouvoir hydrolytique augmente également (**Marshall et Franck, 1981; Verma, 2003;Rangsiriwong et al., 2009**).

Tout cela apparaît par la diversité des résultats obtenus des différentes chercheurs citant entre eux

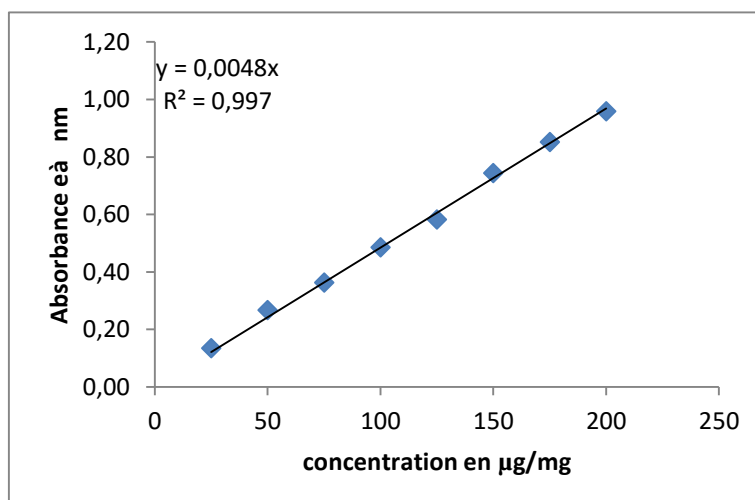
Les valeurs de rendement de PPI réalisé par **Celhay, (2013)** qui sont presque identique à celles obtenues par notre extrait:(**10,6 %, vs 9.88%**) respectivement. Tandis que ceux taux de rendement plus élevé (**27,80 ± 0,14% vs 10.61 %**) obtenu des feuilles de PLE réalisé par **Cheniti et Bennacef(2019)**.

## II. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

Le dosage quantitatif en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* L. et de *Pinus pinaster*, ont été réalisées par deux méthodes respectives : la méthode de Folin-Ciocalteu (FCR) et la méthode de trichlorure d'aluminium. En revanche, la détermination quantitative des flavonoïdes est réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium et la quercétine a été utilisée comme standard. Les **figures (35-36)** représentent les courbes d'étalonnage respectives de l'acide gallique et de la quercétine utilisées comme molécules standard pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

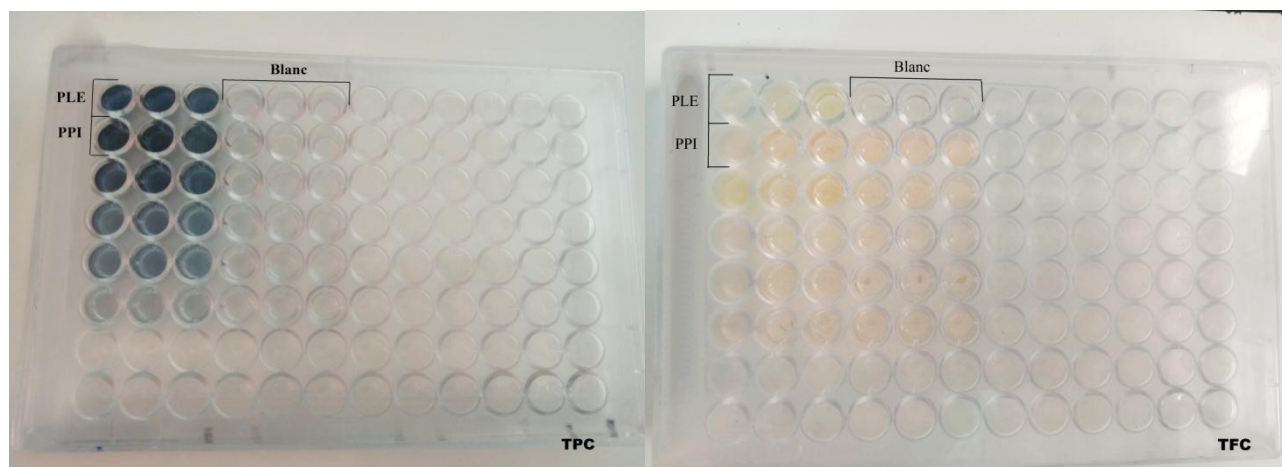


**Figure 35 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux



**Figure 36:** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage colorimétrique ainsi que les plaques des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont présentés dans le **tableau (10)** et les **figures (37-38)** :



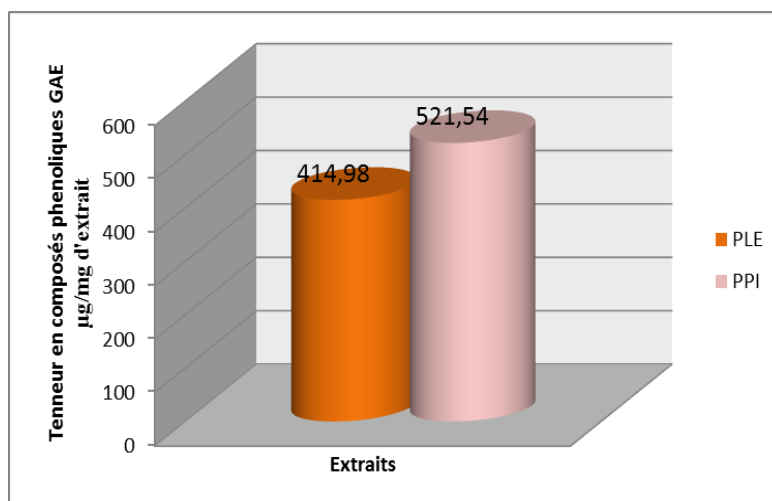
**Figure 37** : Plaques de dosage des polyphénolés (TPC) et des flavonoïdes (TFC) des deux extraits de *pistacia lentiscus* et de *Pinus pinaster*

**Tableau 10**: Le contenu total en polyphénolés et la teneur des flavonoïdes des extraits bruts des feuilles de *Pistacia lentiscus* et de l'écorce de *Pinus pinaster*

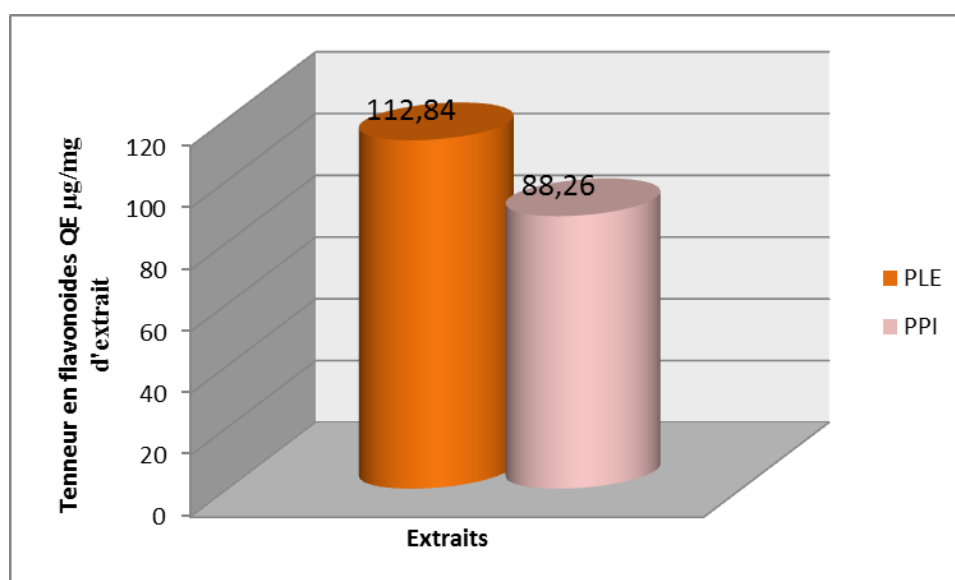
Extraits aqueux	Teneur en composés phénolique ( $\mu\text{g GAE/mg d'extract}$ )	Teneur en flavonoïdes ( $\mu\text{g QE/mg d'extract}$ )
<i>Pistacia lentiscus</i> (PLE)	414,98 $\pm$ 24,79	112,84 $\pm$ 0,88
<i>Pinus pinaster</i> (PPI)	521,54 $\pm$ 53,49	88,26 $\pm$ 16,35

Tout le contenu phénolique de chaque extrait a été déterminé par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu (FCR) en utilisant l'acide gallique comme phénol standard. Une courbe d'étalonnage réalisée avec différentes concentrations d'acide gallique est présentée **figure (34)**.

Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont présentés dans la **figure (37)**.



**Figure 38** : Teneur en composés phénoliques totaux des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI).



**Figure 39** : Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

Les résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L et de l'écorce de *Pinus pinaster* sont représentés dans les **figures (38 et 39)**.

A l'observation du **tableau (10)**, nous remarquons une richesse en composés phénolique pour les deux plantes respectives avec une teneur de  $414,98 \pm 24,79$  µg GAE/mg pour l'extrait PLE et une teneur plus élevée pour l'extrait de PPI ( $521,54 \pm 53,49$  µg GAE/mg).

Par ailleurs, l'extrait aqueux de PPI présente une teneur en flavonoïdes plus faible par rapport à l'extrait de PLE ( $88,26 \pm 16,35$  vs.  $112,84 \pm 0,88$  µg QE/mg).

Des études photochimique récentes (**Benameur et al., 2010; Djida et al., 2013; Babouche et al., 2020**) enregistrent des teneurs plus faibles en composés phénoliques des extraits des feuilles de *Pistacha lentisques* L. et de l'écorce de *Pinus pinaster* comparativement à nos extraits aqueux respectifs ( $414,98 \pm 24,79$  ;  $521,54 \pm 53,49$  ag GAE/mg vs.  $361,59 \pm 11,07$  ;  $345,95 \pm 1,17$  ;  $301,5 \pm 0,015$   $\mu\text{g}$  GAE/mg). Par ailleurs, **Houairi (2019)** et **Pedro Ferreira-Santos et al., (2020)** rapportent des teneurs en contenu phénolique total des extraits respectifs de *Pinus pinaster* et de *Pinus halepensis* plus faibles ( $462,5 \pm 11$  ;  $410,66$   $\mu\text{g}$  GAE /mg).

Le taux en flavonoïdes de l'extrait aqueux du lentisque inscrit par **Atmani et al., (2009)** et par **Cherbal et al., (2012)** est respectivement inférieurs à celui enregistré dans la présente étude (PLE) ( $12,93 \pm 1,69$  ;  $38,7 \pm 0,02$   $\mu\text{g}$  QE/mg vs.  $112,84 \pm 0,88$   $\mu\text{g}$  QE/mg).

Selon **Houairi (2019)**, les extraits méthanoïques et aqueux du même genre (*Pinus halepensis*) ont une teneur respective en flavonoïdes plus faible ( $19,75$  ;  $5,75$   $\mu\text{g}$  EQ/mg) que celle représenté par notre extrait *Pinus pinaster* ( $88,26 \pm 16,35$   $\mu\text{g}$  QE/mg).

Selon **Pedro Ferreira-Santos et al., (2020)**, la teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux de *Pinus pinaster* variait de 77 à 161  $\mu\text{g}$  QE/mg, ceci serait dû au solvant utilisé dans le processus d'extraction. *Ces mêmes auteurs notent un taux en TF plus faible de la même espèce végétale cité comparativement à notre plante* ( $77,5 \pm 4$  vs  $88,26 \pm 16,35$   $\mu\text{g}$  QE/mg). Ces résultats précédemment décrits sont en accord avec notre travail, où il a été observé que les extraits d'écorce de *P. pinaster* sont très riches en composés phénoliques vis-à-vis les flavonoïdes.

Cette fluctuation des résultats trouve probablement son explication dans la différence d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir les conditions de croissance, le processus de maturation et les conditions de stockage (**Bergonzi et al., 2001 ; Wang et Zheng, 2001**), ou bien les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol. De plus, la méthode d'extraction ainsi que le choix du solvant peut également influencer la teneur en composés phénoliques (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

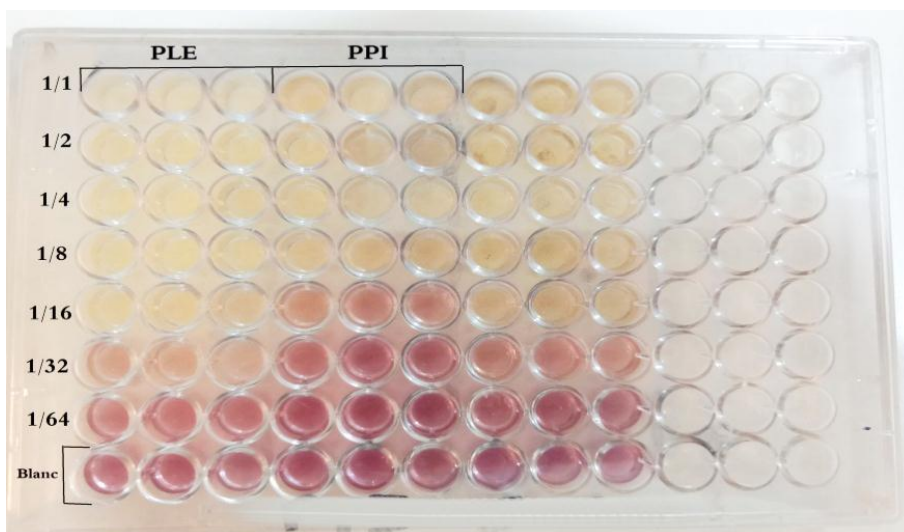
### III. Activité antioxydant

L'activité antioxydante des extraits de plantes dépend de la composition et de la structure des bio-composés, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes et leur capacité à neutraliser les Réactifs Oxygen Species (ROS) et d'autres radicaux libres, c'est-à-dire des activités de chélateurs et de piègeurs de radicaux libres (**Carocho et al., 2013**).

Dans ce sens, différentes méthodes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, permettant l'analyse des différents mécanismes d'action des extraits. Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP, DPPH et ABTS sont les plus méthode largement utilisée pour déterminer la capacité de piégeage des radicaux libres (Lee et al., 2020 ; Fan et al., 2020). C'est sur cette base que nous avons utilisé ces méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Pistacia lentiscus* et de *Pinus pinaster*.

### III.1. Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité anti-radicalaire est exprimée en concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>), qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire le 50 % du DPPH. Plus la CI<sub>50</sub> est faible, plus l'antioxydant est efficace. Les résultats de l'activité anti-radicalaire au DPPH des aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont représentés dans le **tableau(11)** et les **figures (40 et 41)**. Ces extraits végétaux sont comparés aux étalons standards (Trolox et Acide ascorbique).



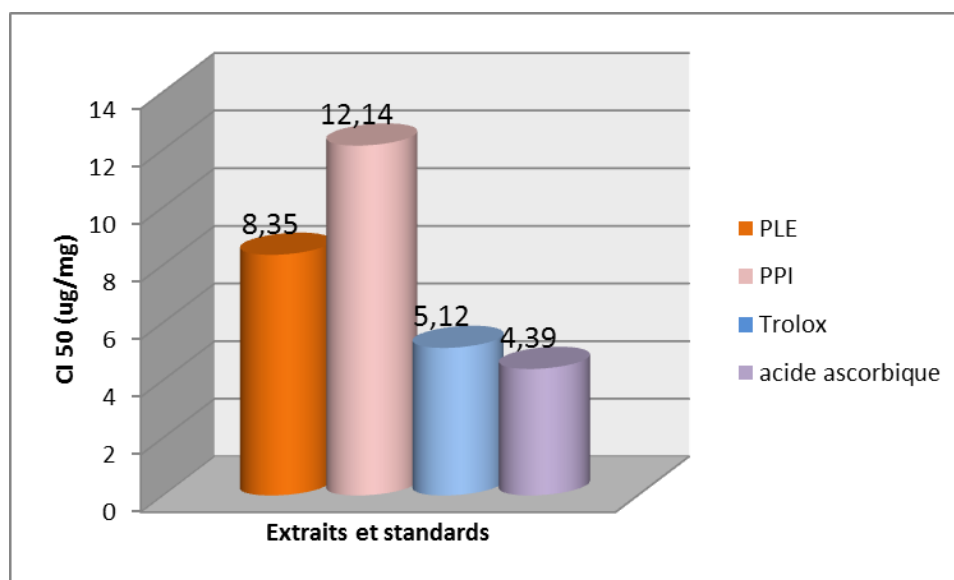
**Figure 40** : La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI).



**Tableau 11** : Inhibition du radical DPPH par les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) Extraits et standards	Inhibition %							$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
PLE	14,84 $\pm$ 1,54	30,89 $\pm$ 4,68	87,20 $\pm$ 0,69	87,42 $\pm$ 0,29	SAT	SAT	SAT	8,35 $\pm$ 0,34
PPI	13,02 $\pm$ 2,74	26,31 $\pm$ 1,20	51,52 $\pm$ 1,15	79,98 $\pm$ 2,11	83,45 $\pm$ 0,29	SAT	SAT	12,14 $\pm$ 0,25
Trolox	6,42 $\pm$ 0,91	13,33 $\pm$ 2,14	30,19 $\pm$ 0,67	61,48 $\pm$ 2,98	87,16 $\pm$ 0,28	88,46 $\pm$ 0,11	87,72 $\pm$ 0,47	5,12 $\pm$ 0,21
Acide ascorbique	0,31 $\pm$ 1,02	12,90 $\pm$ 0,28	29,69 $\pm$ 0,39	76,67 $\pm$ 0,37	84,94 $\pm$ 0,84	87,78 $\pm$ 0,49	86,36 $\pm$ 0,21	4,39 $\pm$ 0,01

SAT : saturation

**Figure 41** : Valeurs  $\text{CI}_{50}$  du test DPPH

Le **tableau 11** et les **figures (40-41)** montrent la variation d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits testés. Selon la **figure (41)** le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés antiradicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des différents extraits dont on souhaite déterminer l'activité.

A l'observation du **tableau (11)**, l'inhibition du radical DPPH ( $\text{CI}_{50}$ ) par les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont de l'ordre de 8,35 $\pm$ 0,34 et 12,14 $\pm$ 0,25  $\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait PLE et PPI respectivement.

Selon les valeurs de  $CI_{50}$ , on remarque que l'extrait aqueux de PLE manifeste une activité antiradicalaire au DPPH ( $CI_{50}=8,35\pm 0,34 \mu\text{g/ml}$ ) supérieure à celle de l'extrait aqueux de PPI ( $CI_{50}=12,14\pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ ). L'extrait aqueux de PLE est et très proche de standard trolox ( $5,12\pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ ) et est deux fois plus faible que l'acide ascorbique ( $4,39\pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues par **Pedro Ferreira-Santos et al., (2020)** montrent une activité anti-radicalaire considérable dans l'extrait d'écorce de *Pinus pinaster* avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de  $99,96 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ . Par ailleurs, les travaux de **Nigro (2016)** ont révélé une activité anti-radicalaire faible par rapport à la présente étude (extrait aqueux de PPI) avec des  $IC_{50}$  de  $61,46 \mu\text{g/ml}$  pour l'extrait aqueux de feuilles de *Pinus halepensis*.

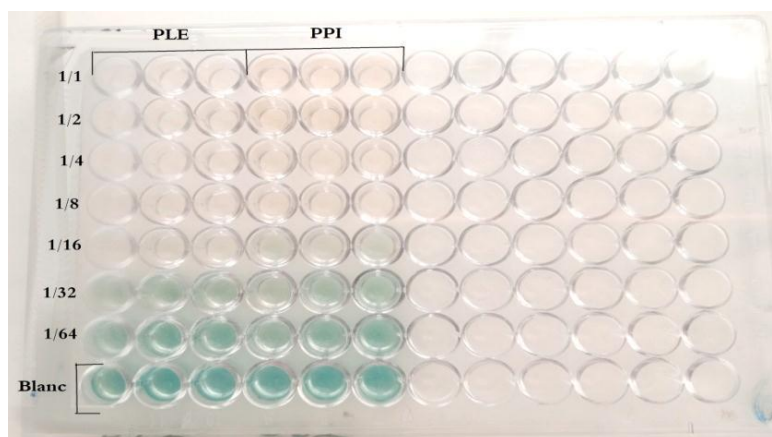
L'étude réalisée par **Bampouli et al., 2014** sur l'extrait aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L a enregistré une activité anti-radicalaire avec une valeur de  $39,99 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$  inférieure que celle représenté par l'extrait PLE ( $39,99 \pm 0,52$  vs.  $8,35\pm 0,34 \mu\text{g/ml}$ ).

### III.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS

Dans ce test, l'antioxydant réagit avec  $ABTS^{\bullet+}$  de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour redonner l' $ABTSH^{++}$  incolore. Cette transformation a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards (trolox et acide ascorbique).

L'activité du piégeage du cation radical ABTS ou l'activité scavenger des extraits de *pistacia lentiscus* et de *pinus pinaster* contre le radical ABTS est exprimée en  $CI_{50}$ , qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire le 50% de l'ABTS comme montré dans **tableau(12)** et les **figure (42)**. Sachant que le pourcentage d'inhibition est dose-dépendante ; plus on augmente la concentration de l'extrait végétal, le pourcentage d'inhibition augmente. Par contre, plus la valeur de  $CI_{50}$  est faible, plus l'antioxydant est efficace.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire à l'ABTS des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont comparés aux standards (trolox et acide ascorbique). Les résultats sont présentés ci-dessous :

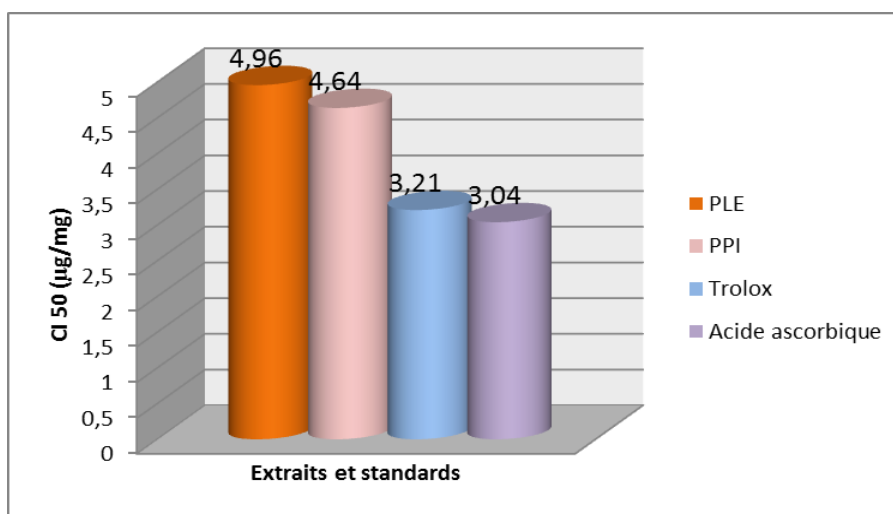


**Figure 42 :** Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (ABTS) des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

**Tableau 12:** Inhibition du cation radical ABTS<sup>•+</sup> par les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition %							CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
Extraits et standards								
PLE	31,97 $\pm$ 1,80	62,67 $\pm$ 1,12	87,54 $\pm$ 1,70	90,13 $\pm$ 0,68	90,91 $\pm$ 0,68	Sat	Sat	4,96 $\pm$ 0,01
PPI	48,20 $\pm$ 8,43	58,07 $\pm$ 1,46	74,23 $\pm$ 3,34	90,33 $\pm$ 1,11	Sat	Sat	Sat	4,64 $\pm$ 0,15
Trolox	14,74 $\pm$ 0,37	26,15 $\pm$ 0,65	51,70 $\pm$ 1,51	89,72 $\pm$ 0,67	92,89 $\pm$ 0,19	92,89 $\pm$ 0,19	91,84 $\pm$ 1,19	3,21 $\pm$ 0,06
Acide ascorbique	13,43 $\pm$ 0,82	28,76 $\pm$ 0,67	52,94 $\pm$ 0,94	93,21 $\pm$ 0,11	93,08 $\pm$ 0,19	92,40 $\pm$ 0,88	92,96 $\pm$ 0,11	3,04 $\pm$ 0,05

Sat : saturation



**Figure 43:** Valeurs des CI<sub>50</sub> du test ABTS pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

D'après les résultats, les deux extraits PLE ( $4,96 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ) et PPI ( $4,64 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ ) possèdent une excellente activité de piégeage des radicaux libres par rapport au standards trolox ( $3,21 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ ) et acide ascorbique ( $3,04 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ ). Ces résultats nous confirment que les deux extraits ont une activité anti radicalaire très élevée.

Dans cette activité, les extraits ont manifesté un pouvoir de piégeage des radicaux libres mieux que dans l'activité antiradicalaire au DPPH ceci peut être justifié par la capacité du radical cation ABTS d'être plus polyvalent que le DPPH parce qu'il est soluble dans l'eau et les solvants organiques, ce qui permet une évaluation d'activité antiradicalaire pour les composés hydrophiles et lipophiles (Gülçin, 2010).

A partir de la **figure (43)** nous notant une disparition de la couleur bleu/vert, ce qui confirme les résultats présentés dans le tableau précédent (**Tableau 12**).

Une étude récente sur l'activité antioxydante des huiles essentielle de *pistacia lentiscus L* a montrer une valeur de  $113,72 \pm 7,91 \mu\text{g/ml}$  dans les feuilles et une valeur de  $73,80 \pm 3,96$  dans les fruits (Bouyahya et al., 2019).

Les travaux de **Pedro Ferreira-Santos et al., 2020** ont révélé une activité anti-radicalaire ABTS faible par rapport à la présente étude avec des  $IC_{50}$  de  $106,61 \pm 8,0 \mu\text{g/ml}$  pour l'extrait aqueux de d'écorce de *Pinus pinaster*.

Dans notre étude, les extraits de *Pistacia lentiscus L.* (PLE) et de *Pinus pinaster* (PPI) ont manifesté un pouvoir de piégeage du cation radical ABTS mieux que dans l'activité antiradicalaire au DPPH. Ceci pourrait être justifié par la capacité du radical cation ABTS à être plus polyvalent que le DPPH puisque ce radical libre (ABTS) est soluble dans l'eau et les solvants organiques. Ce qui permet d'exprimer une d'activité antiradicalaire pour les composés hydrophiles et lipophiles (Gülçin, 2010).

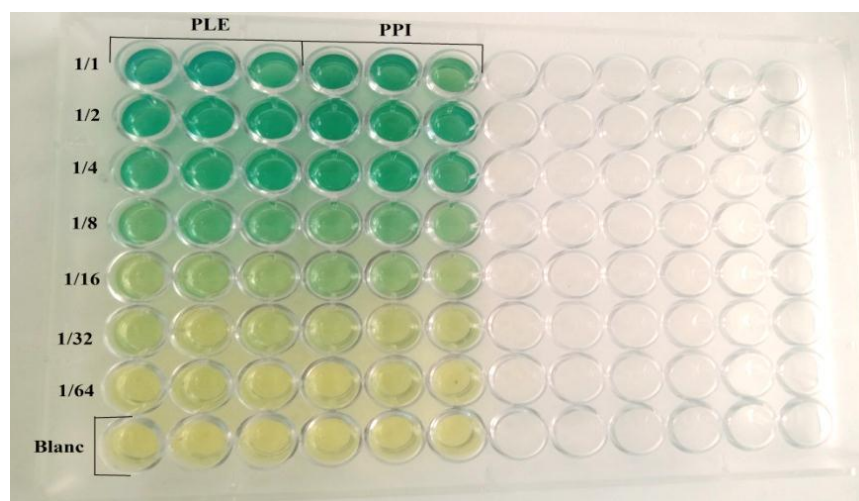
**Bouyahya et al., (2019)**, en étudiant l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L.*, ont montré que les feuilles de cette plante présentent un pouvoir de piégeage du cation radical ABTS ( $113,72 \pm 7,91 \mu\text{g/ml}$ ) ainsi que pour ces fruits ( $73,80 \pm 3,96 \mu\text{g/ml}$ ) comparativement à notre extrait ( $4,96 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ).

D'autre part, les travaux de **Pedro Ferreira-Santos et al., (2020)** ont révélé une activité antiradicalaire ABTS faible de l'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus pinaster* par rapport à nos extraits de *Pinus pinaster* (PPI) avec des  $IC_{50}$  de  $106,61 \pm 8,0 \mu\text{g/ml}$  vs.  $4,64 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ .

### III.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

La réduction des ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) déterminé par le test pouvoir réducteur basé sur la réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  du ferricyanure en  $\text{Fe}^{2+}$  pour donner le ferrocyanure avec l'apparition d'une couleur bleue-verte et qui est bien illustré dans **les figures 44-45**).

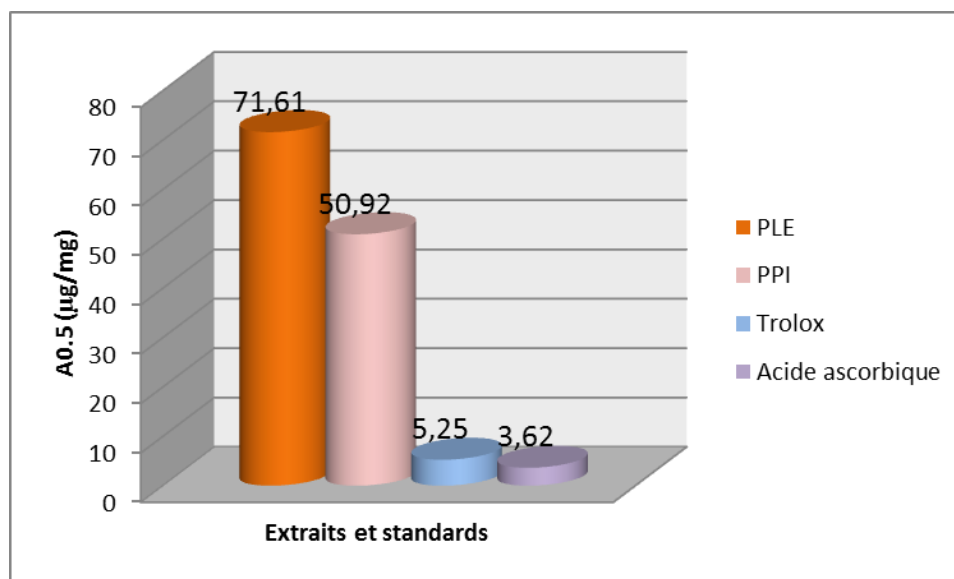
L'activité du pouvoir réducteur FRAP est évaluée en mesurant les valeurs d' $A_{0.5}$  ainsi que par comparaison des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) avec les standards trolox et acide ascorbique. Les résultats de la réduction du fer par la méthode FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont présentés dans le **tableau (13)** et **les figures (44-45)**.



**Figure 44:** La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI).

**Tableau 13:** Réduction du fer par la méthode FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) extraits et standards	Inhibition %							$A_{0.5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
PLE	0,06±0,01	0,07±0,01	0,10±0,01	0,24±0,01	0,42±0,04	0,58±0,09	0,84±0,16	71,61±8,03
PPI	0,05±0,01	0,07±0,00	0,13±0,01	0,23±0,03	0,48±0,03	0,70±0,02	0,77±0,05	50,92±0,22
Trolox	0,07±0,00	0,08±0,00	0,09±0,01	0,13±0,00	0,19±0,02	0,28±0,05	0,60±0,04	5,25±0,20
Acide ascorbique	0,07±0,00	0,09±0,01	0,12±0,01	0,17±0,01	0,25±0,02	0,47±0,03	0,79±0,09	3,62±0,29



**Figure 45** : Valeurs des  $A_{0,5}$  du pouvoir réducteur FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

La réduction du fer par la méthode FRAP pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) a également prouvé son effet. Où nous remarquons à l'observation de la figure ci-dessus, un pouvoir réducteur intéressant des extraits d'écorce de *Pinus pinaster* et plus modéré pour les feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Le meilleur teste évaluant l'activité réductrice du fer a été obtenue pour l'extrait de *Pinus pinaster* (PPI) avec une  $A_{0,50}$  de  $50,92 \pm 0,22$  µg/ml. Ce résultat est dix fois inférieure à celle du trolox ( $A_{0,50} = 5,25 \pm 0,20$  µg/ml) et quatorze fois plus faible que celui de l'acide ascorbique ( $A_{0,50} = 3,62 \pm 0,29$  µg/ml).

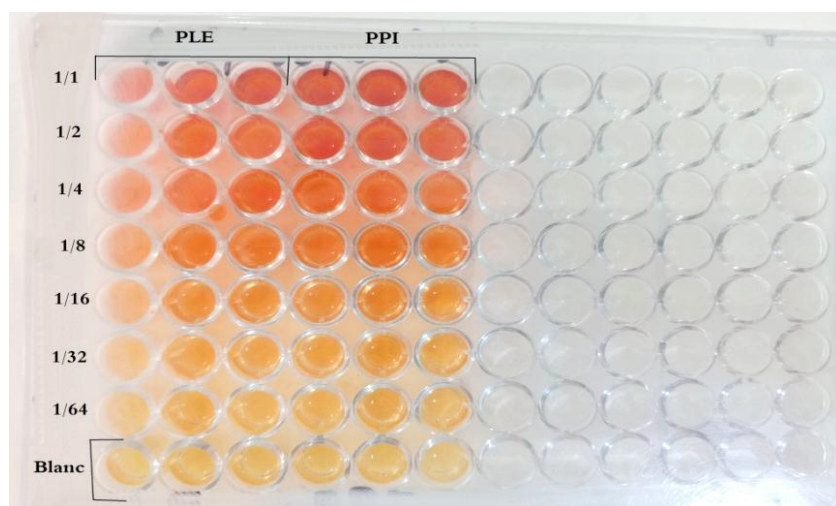
En revanche, le pouvoir réducteur FRAP pour les extraits aqueux PLE ( $A_{0,50}$  de  $71,61 \pm 8,30$  µg/ml) est presque treize fois inférieure que celui du trolox ( $A_{0,50} = 5,25 \pm 0,20$  µg/ml) et vingt fois plus faible que celui de l'acide ascorbique ( $A_{0,50} = 3,62 \pm 0,29$  µg/ml).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Bouyahya et al., (2019)** qui enregistrent une valeur presque similaire à nos résultats pour l'extrait de PLE ( $A_{0,50}$  de  $65,54 \pm 4,12$  vs.  $71,61 \pm 8,03$  µg/ml).

Par ailleurs, l'évaluation de l'effet antioxydant (FRAP) réalisée par **Pedro Ferreira-Santos et al., (2020)** sur l'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus pinaster* révèle une valeur deux fois plus importante que celle enregistré par notre extrait PPI ( $101,9 \pm 0,3$  vs.  $50,92 \pm 0,22$  mmol d'équivalent Trolox/g d'extrait).

### III.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline :

La réduction des ions Fe<sup>3+</sup> est également évaluée par le test au phénanthroline. Dans ce test les ions Fe<sup>3+</sup> associés au phénanthroline vont être réduits en présence d'un antioxydant en fer ferreux donnant un complexe Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline de couleur rouge orange. Cette coloration est représentée par la figure(46). Cette réduction est déterminée par la mesure des valeurs de A<sub>0,5</sub> des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) et de celles des standards trolox et acide ascorbique. La réduction du fer par la méthode phénanthroline pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) sont représentés dans le tableau 14 et la figure(46).

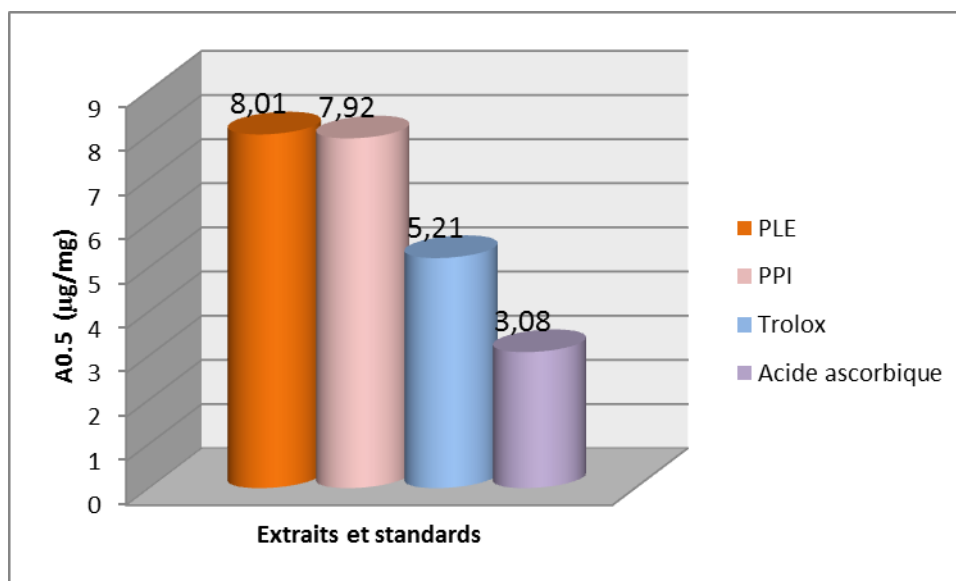


**Figure 46:** La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline par les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

**Tableau 14:** Réduction du fer par la méthode phénanthroline

Concentration (µg/ml) extraits et standards	Inhibition %							A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
<b>PLE</b>	0,35±0,02	0,44±0,01	0,65±0,03	1,07±0,04	2,13±0,12	2,24±0,15	4,51±4,51	8,01±0,45
<b>PPI</b>	0,37±0,04	0,44±0,03	0,67±0,02	1,09±0,04	1,88±0,12	3,36±0,10	4,52±0,15	7,92±0,67
<b>Trolox</b>	0,25±0,01	0,24±0,01	0,26±0,01	0,26±0,00	0,32±0,01	0,38±0,01	0,56±0,02	5,21±0,27
<b>Acide ascorbique</b>	0,26±0,01	0,29±0,00	0,29±0,02	0,31±0,01	0,37±0,01	0,50±0,00	0,80±0,00	3,08±0,02





**Figure 47:** Valeurs des  $A_{0,5}$  du test phénanthroline réalisé pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

A l'observation du **tableau (12) et des figures (47-48)**, nous remarquons que l'extrait PPI a présenté une valeur de  $A_{0,50}=7,92\pm 0,67$  µg/ml qui est presque similaire à la valeur de l'extrait PLE ( $A_{0,50}=8,01\pm 0,45$  µg/ml). Toutefois, les deux standards trolox et acide ascorbique présentent les plus fortes activités réductrices respectives ( $A_{0,50}=5,21\pm 0,27$  et  $3,08\pm 0,02$  µg/ml).

Dans notre étude, nous notons que les résultats des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) déterminant un pouvoir réducteur du phénanthroline ce qui confirme les résultats des trois premiers tests antioxydants (DPPH, ABTS et FRAP). Les deux extraits étudiés (PLE et PPI) possèdent une très bonne capacité de réduire le fer et de former un complexe  $Fe^{+2}$ - phénanthroline.

En récapitulatif, nous pouvons signaler une relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits bruts de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de *Pinus pinaster*. Ainsi en combinant les résultats de cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une relation étroite entre la teneur en composés phénoliques de nos deux extraits bruts et leurs activités antioxydantes. On constate aussi la tendance d'extraire plus de composés avec l'eau qu'avec les autres solvants. Cela peut s'expliquer par le simple fait que l'eau est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules (**Bonnaillie et al., 2012**).et cela confirme le rendement important obtenu pour nos deux extraits aqueux.



L'activité antioxydante élevée de nos extraits est attribuée probablement à sa richesse de nos extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) en polyphénols (414,98±24,79 vs. 521,54±53,49 µg GAE/mg d'extrait) et en flavonoïdes (112,84±0,88 vs. 88,26±16,35 µg QE/mg d'extrait) respectivement.

En effet, selon **Amié et al., (2003)**, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. L'effet scavenger des flavonoïdes FLOH est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R•) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle selon la réaction suivante : FLOH + R• donnera FLO• + RH.

Cette réaction donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyyle (FLO•) qui va subir un changement de structure par résonance, redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•. En outre, les radicaux flavoxyyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

## IV. Activité enzymatique

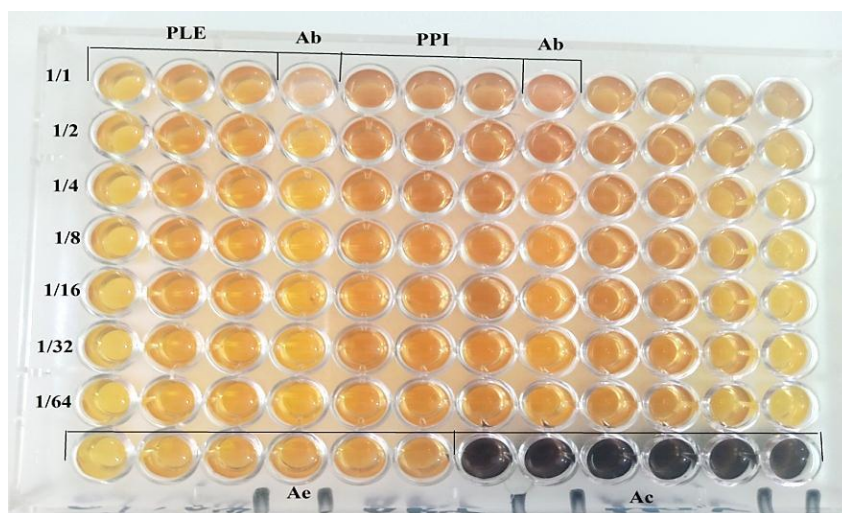
L'évaluation de l'activité enzymatique des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) a été réalisée par l'inhibition de deux enzymes.

### I.V.1.Évaluation de l'activité antidiabétique

L'activité enzymatique des deux plantes a été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme alpha-amylase.

#### I.V.1.1.Inhibition de l'alpha amylase

Les résultats de l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase des extraits de *Pistacia lentiscus* L. et de *Pinus pinaster* est représenté dans la figure ci-dessus (**figure 48**)

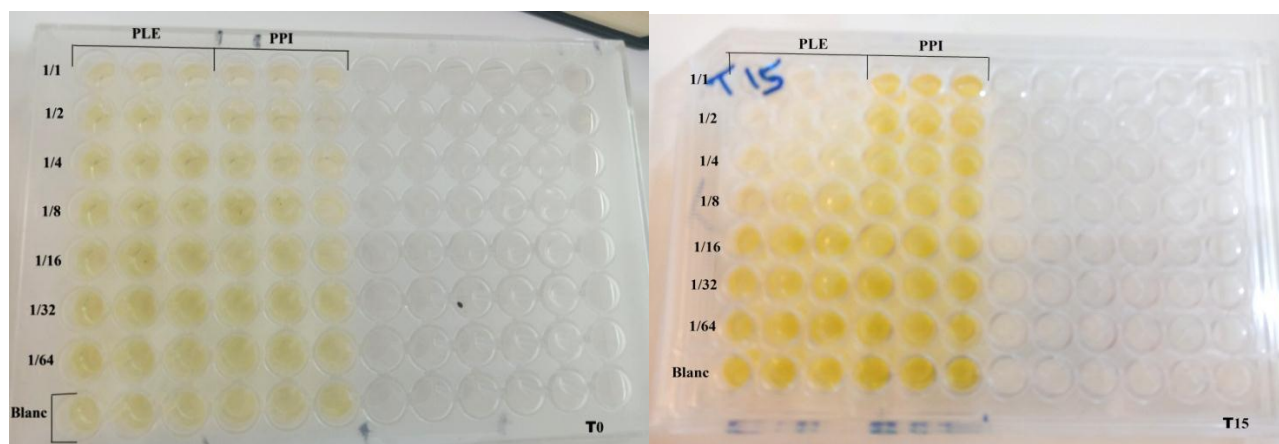


**Figure 48 :** La plaque de dosage de l'activité anti diabétique (inhibition d'alpha-amylase) des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

D'après la **figure (48)** on constate que l'absence d'inhibition d'alpha-amylase par les deux PLE et PPI est observée par la persistance de la couleur jaune en présence des différentes concentrations des extraits et donc absence de l'activité anti diabétique.

#### I.V.2.Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'évaluation de l'activité anticholinestérase des deux extraits bruts des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) été réalisée par l'inhibition de l'enzyme Acétylcholinestérase, Cette inhibition est suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice ( $CI_{50}$ ) des différents extraits en comparaison avec le standard la galantamine. Les résultats de cette activité sont reportés dans **le tableau (15)** et les **figures (49-50)**.

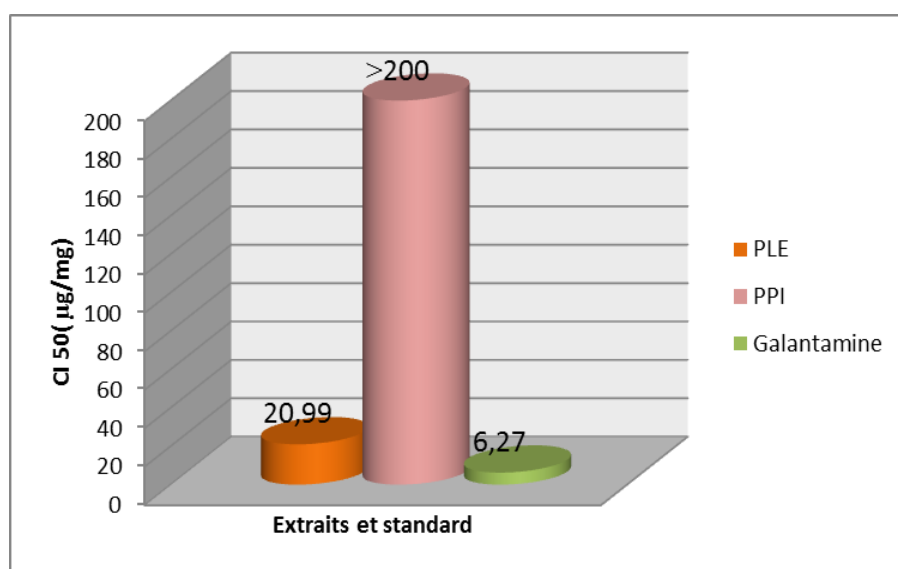


**Figure 49:** La plaque de dosage de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par les extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI).

**Tableau 15:** Inhibition de l'enzyme Acétylcholinestérase pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

Concentration( µg/ml) Extraits et standards	Inhibition %							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
PLE	22,31 ±4,07	31,50±1,81	34,84± 3,62	56,98±1,45	76,68±1,87	87,30±4,31	88,97±2,89	20,99±20,99
PPI	Na	Na	Na	Na	Na	7,41± 3,42	15,52±4,51	>200
Galantamine	35,93 ±2,28	43,77 ±0.00	68,50 ±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80±0,20	94,77±0,34	6.27±1.15

Na : no absorbance

**Figure 50 :** Valeurs des CI<sub>50</sub> test anticholinestérase pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI)

A partir du **tableau (13)** Représentant le pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase pour les extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (PLE) et de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI), on remarque que l'extrait PLE a montré une activité modérée contre la AChE (CI<sub>50</sub>=20,99±1,13µg/ml), qui est trois fois plus faible que celle du standard la galantamine (CI<sub>50</sub>=6,27±1,15 µg/ml).

Une étude phytochimique des plantes médicinales Algériennes réalisées par **Benamar et al, (2010)** qui a concerné l'activité anti-acétylcholinestérase. Ces auteurs ont rapporté un pourcentage d'inhibition (CI<sub>50</sub>) proche à celui enregistré de notre étude sur extrait aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (13,64±0,69vs.20,99±1,13µg /ml).

Dans notre étude, les résultats obtenus pour le extrait PPI, sont relativement plus forte (le pourcentage d'inhibition supérieure à 200). Ceci pourrait être dû en raison de la forte concentration de la solution mère de l'extrait utilisé dans ce test (4 mg d'extrait). Ainsi la forte coloration de

l'extrait que nous aurons du mieux réduire ces concentrations à 1; 0,5 ou même à 0,25 mg pour obtenir éventuellement des valeurs dans les normes, comme l'indique la couleur l'échantillon dans les plaques qui vire au marron foncé témoigne la présence d'une certaine activité anticholinestérase.

Une activité intéressante contre l'AChE a également été observée dans l'huile essentielle de *Pinus nigra subsp. nigra* avec une valeur inhibitrice à 50% de 94,4 g/ml. De plus, une activité intéressante contre l'AChE a été observée également avec *Pinus. nigra var. calabrica* et *P. nigra subsp.nigra*, avec des valeurs IC<sub>50</sub> respectives de 101,5 et 94,4 µg/mL (Marco B et al., 2010).

Selon Ustun et al., (2012) travaillant sur l'extrait d'écorce de *Pinus pinaster*, le Pycnogenol a également provoqué une inhibition remarquable contre l'AChE ( $63,33 \pm 0,22$  µg/mL) pour une concentration de la solution mère de 200 µg/ml. Cette activité est due à leur composition chimique contenant principalement des acides phénoliques, des flavonoles et des tannins. A cet effet, Amessis et al., (2014) affirment que les flavonoïdes et autres composées phénoliques possèdent une activité anti-acétylcholinestérase.

## V. Evaluation de l'activité antimicrobienne

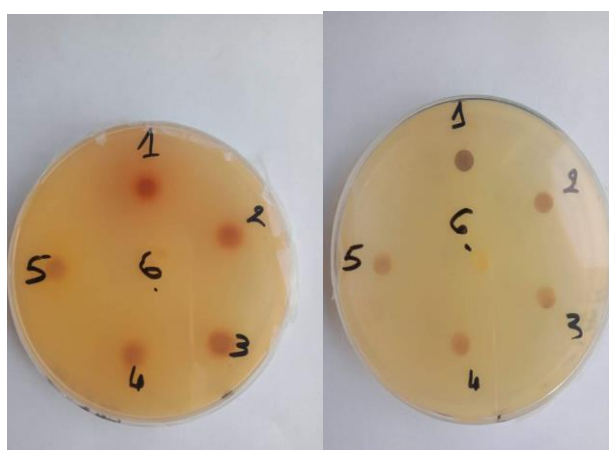
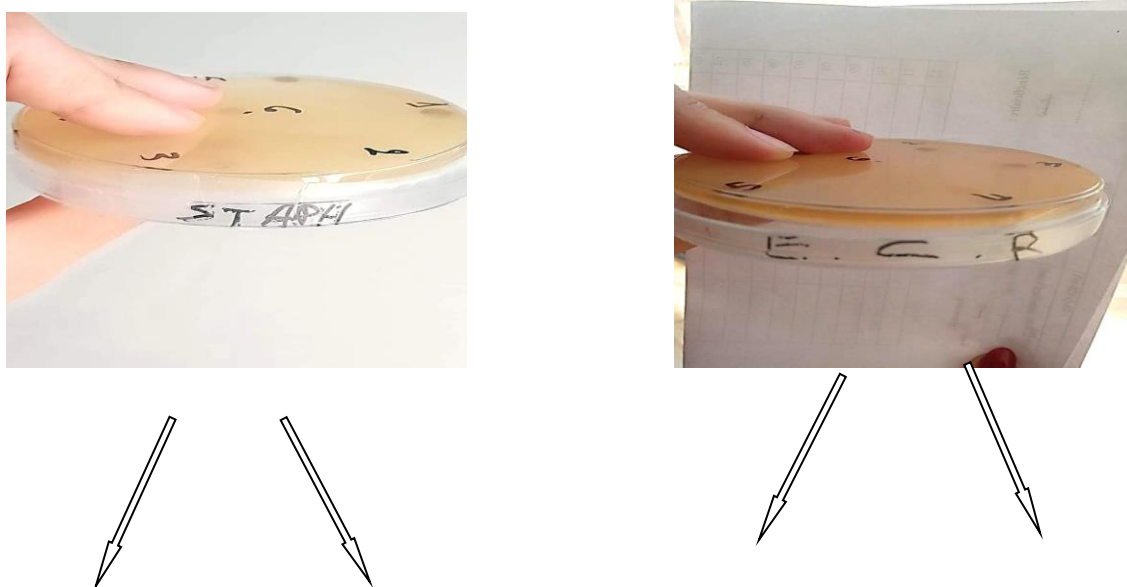
Il est connu que les différents extraits de l'écorce du pin maritime «*Pinus pinaster*» et l'huile de *Pistacia lentiscus* présentent une activité antimicrobienne importante. Ceci a été démontré, par recherches, y compris les travaux de (Torras, 2005) sur l'activité antimicrobienne du Pycnogenol®, ainsi les études visant à examiner le potentiel pharmacologique des extraits de *Pistacia lentiscus* dans le traitement des affections gastro-intestinales en particulier ceux provoqués par la bactérie *Helicobacter pylori* (Al-Habbal et al., 1984).

### V.1.Méthode de diffusion par disque

Pour caractériser l'activité antimicrobienne de nos extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extraits végétaux.

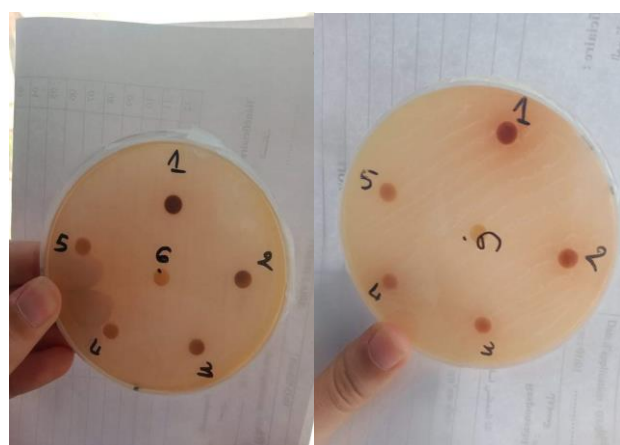
La technique a été utilisée sur l'ensemble de deux souches bactériennes, ce test préliminaire nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de nos extraits.

Les résultats présentés dans les **figures (51-52)** révèlent une absence d'activité antimicrobienne de l'écorce de *Pinus pinaster* et les feuilles de *Pistacia lentiscus* sur les deux souches testés; *Escherichia coli* (Gram +) et *Staphylococcus aureus* (Gram -).



a) PPI

b) PLE



a) PPI

b) PLE

**Figure 51 :** Effet de PPI et PLE sur *S.aureus*

**Figure 52 :** Effet de PPI et PLE sur *E. coli*

Ces deux souches microbiennes se sont révélées résistantes aux deux extraits testés avec une zone d'inhibition inférieure à 8mm. Par contre l'étude de **Kahlouche-Riachi** effectué en **2014**, sur l'effet antibactérien de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce du pin maritime sur les mêmes souches a observé un effet antibactérien considérable : *Escherichia coli* (DI=  $12.33 \pm 2.52$  mm), *Staphylococcus aureus* (DI=  $14.33 \pm 3.51$ ). Cependant, aucun effet n'a été observé dans notre étude.

D'autre part, plusieurs études ont montré l'efficacité potentielle des extraits de *Pistacia lentiscus* contre de nombreux agents pathogènes. **Benhammou et al., (2008)** ont trouvé que l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* est actif contre des bactéries pathogènes à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et n'est pas efficace contre *Escherichia coli* à Gram négatif.

Cela s'explique soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes ou la faible capacité des composés antibactériens, présents dans les différents extraits, à diffuser de manière uniforme à travers l'agar soit par les différents paramètres influencent l'extraction (**Rauha et al., 2000**).

# ***CONCLUSION***

## CONCLUSION

A la lumière de nos résultats, nous pouvons conclure que les extraits bruts aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. et de l'écorce de *Pinus pinaster* représentent une très bonne source d'antioxydants.

Ceci est confirmé par les résultats obtenus par l'évaluation des différentes activités antioxydantes ; à savoir le piégeage du radical libre DPPH ; le piégeage du cation radical ABTS ; le pouvoir réducteur (FRAP) et l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline. Cette activité antioxydante est probablement liée à la richesse des deux espèces en métabolites secondaires notamment en polyphénols et en flavonoïdes.

En outre, l'évaluation de l'activité enzymatique des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. et de l'écorce de *Pinus pinaster* a montré une forte activité anticholinestérase pour les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. avec une absence d'activité antidiabétique et antibactérienne pour les deux espèces.

A l'avenir nous nous projetons de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles qui pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être une alternative aux médicaments synthétiques.
- Evaluer les activités biologique in vivo de ces deux plantes afin d'isoler les substances responsables aux activités biologiques étudiées,
- a validation de nos résultats in vitro par des tests in vivo, et la réalisation de d'autres activités biologiques telles que les activités : anti-inflammatoire antimicrobiennes, antivirales, analgésiques, anti-carcinogènes.



***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Abbas, M., Boudriche, D. (2007). Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pistacia lentiscus* L. Et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques, Centre de recherche et de développement, Saidal, Alger.
- Abdallah, A., Frikha, D., & Sassi, S. M. E. S. (2019). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines in vitro evaluation of the antibacterial and antifungal activities of marine algae. *Journal de l'information médicale de sfax*, 38-44.
- Abdallah, R. Z., Wegner, C. E., & Liesack, W. (2019). Community transcriptomics reveals drainage effects on paddy soil microbiome across all three domains of life. *Soil Biology and Biochemistry*, 132, 131-142.
- Ademe (2012) www.ademe.fr. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.
- Adhikamsetty, R.K., Gollapalli, N.R., and Jonnalagadda, S.B. (2008). Complexation kinetics of Fe<sup>2+</sup> with 1,10-phenanthroline forming ferriin in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*, 40(8), 515-523.
- Aksoy, L., Kolay, E., Ağılönü, Y., Aslan, Z., and Kargioğlu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 20(3),235-239.
- Alaoui, A., Said, D. L., et Najib, P. G. (2011). Production, croissance et modèles de conduite sylvicoles des principales essences (le pin maritime et le pin d'Alep) de reboisement au Maroc. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 68-84.
- Alaoui, A., Charrouf, Z., Soufiaoui, M., Carbone, V., Malorni, A., Pizza, C., & Piacente, S. (2002). Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4600-4603.
- Alawa, C.B.I., Adamu, A.M., Gefu, J.O., Ajanusi O.J., Abdu P.A., Chiezey N.P., Alawa J.N., Bawman D.D.( 2003). In vitro screening of two Nigerian medicinal plants, *Ve rnonia amygdalina* and *Annonase ne gale nsis*, for anthelmintic activity. *Else vie rscie nce*, 73- 81.
- Alia, R., Martin, S. (2003). **EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Maritime pine (*Pinus pinaster*)**, *Bioversity International*.
- Ali-Shtayeh, M.S., Yaniv, Z., Mahajna, J. (2000). "Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants". *Journal of Ethnopharmacology*,
- Aloui A, (2002). Contribution à l'étude de l'écologie et de la production des principales essences de reboisements au Maroc, mémoire de 3ème cycle-ENFI-Salé, cycle, I.A.V. Hassan II, Rabat.
- Al-Saghir, M. Al. (2006). Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy In Biological Sciences.113p.
- Amara, N., BENRIMA, A., ANBA, C., BELKHIR, H. (2019).Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *Revue agrobiologia* 9(2) ,1669-1676.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., & Araújo, M. E. M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 53, 6-15.

- Amié .D.,Davidovié-Amié.D.,Beslo.D.et Trinajstíé.N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 76(1) ,55-61.
- Amitouche, T., & Rakem, B. (2017). Effet insecticides de deux huiles essentielles à l'égard d'un insecte ravageur *Tribolium confusum* (Coleoptra: Tenebrionidae). Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri.
- Amrani Joutei, K., Glories, Y., & Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, 33(3), 133-138.
- Anonyme 1. (2018) le cœur de métier de Berkem BERKEM "Marais Ouest" 24680 Gardonne – France <https://www.berkem.com/fr>
- Anonyme 2. (2003). Le Pin Maritime *Pinus pinaster* Ait pinacée. Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal 15, Rue, Théron-Périe - 81106.<https://dl.ummtto.dz/bitstream/handle/ummtto/4515/Sadli%20Karima.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ansari, S.N., Siddiqui, A.N. (2012) *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4, (4), pp. 16-20.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., and Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Arab, K., Bouchnak, O., & Yahiaoui, K. (2014). Etude phytochimique et évolution de l'article antimicrobienne et antioxydant de l'huile essentielle et des composés phénolique du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *Journal of Fundamental and applied Science*, 6(1), 79-93.
- Assimopoulou, A.N., Zlatanov, S.N., and Papageorgiou, V.P. (2005). "Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates", *Food Chemistry*, V. 92, 721–727.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.

## B

- Baba, S.A., and Malik, S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*. 9, 449-454.
- Baba-aissa, F. (1999). "Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb substances végétales d'Afrique", Edition moderne Rouiba, Algérie, 368p.
- Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali . Thèse de doctora, Université de Bamako, p10.
- Bamba, B., Benie, C. K. D., Ouattara, A., Doukourou, D. N., Kamou, R. K., & Ouattara, K. (2021). Teneurs en phénols totaux, activités antioxydantes des macérés et décoctés des feuilles de *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 54-67.
- Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E. H., Ibijbijen, J., & Nassiri L. (2015). Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of applied biosciences*, 86, 7966-7975.
- Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Krokida, M., & Magoulas, K. (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. Chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(3), 81-91.

- Baradat, P. (1986) .Pin maritime. *Pinus pinaster* (Ait.). *Revue forestière française, Agro Paris Tech*, 38,121-124.
- Barbouchi, M., Elamrani, K., & El Idrissi, M. (2020). A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of different solvent extracts from various parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 302-306.
- Barus, C. (2008). Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique-Application aux produits dermocosmétiques. Doctoral dissertation, Université de Toulouse, p8.
- Beldi, M., Merzougui, H., & Lazli, A. (2021). Etude ethnobotanique du Pistachier lentisque *Pistacia lentiscus* L. Dans la wilaya d'El Tarf (Nord-est algérien)-. *Ethnobotany Research & Applications*, 21(09).1-17.
- Belmokhtar, N., Brahim, R., Nedjar, R., & Trari, M. (2015). Preparation and physical properties of the layered niobate Cu<sub>0</sub>. 5Nb<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: application to photocatalytic hydrogen evolution. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 433-440.
- Ben Douissa, F., (2004). Etude Chimique et Biologique de *Pistacia lentiscus*.abebooks.fr,330-331.
- Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., & Marouf, A. (2010). Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Biological Sciences*, 10(1), 1-9.
- Benariba, N., Chekroun, E., Adida, H., Bechiri, A., Azzi, R., & Djaziri, R. (2015). Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8), 632-637.
- Bendahou, M., Muselli A., Grignon- Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert , JM., Bernardini, AF., Costa, J. (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.
- Benrokia et Aouar. (2015).Etude de l'activité Antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus* Mémoire de Master en analyses Biologiques et Biochimiques. Isolés à partir d'une plante médicinale. Mémoire de Master en Toxicologie et Santé, Université des Frères Mentouri Constantine 2.
- Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Gallori, S., Guerrini, D., & Vincieri, F. F. (2001). Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug development and industrial pharmacy*, 27(6), 491-497.
- Berkem.(2018). Extraction végétale : Le Coeur De Métier De Berkem ,<https://www.berkem.com/fr>.
- Blazso, G., Gabor, M., Schönla, F., & Rohdewald, P. (2004). Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(7), 579-581
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Boudieb, K., Ait Slimane, S., Amellal, H. (2019). Traditional uses, phytochemical study and morphological characterization of *Pistacia lentiscus* L. Fruits from three areas of northern Algeria. *Journal of Applied Biosciences* ,135, 13788 – 13797.
- Bougherara, I. (2005). Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse de Doctorat, université d'Annaba, p7.

- Boullard, B. (2001). Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. Ed: FSTEM, 636 p.
- Boursier, B. (2005). Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. Techniques de l'Ingénieur. 33-38.
- Bouyahya, A., Asseman, I. C. C., Mouzount, H., Bourais, I., Et-Touys, A., Fellah, H., ... & Bakri, Y. (2019). Could volatile compounds from leaves and fruits of Pistacia lentiscus constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs?. *Industrial crops and products*, 128, 62-69.
- Bruneton J. (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. p 198-260.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

C

- Cacace, JE., Mazza, G. (2007). Pressurized low polarity water extraction of biologically active compounds from plant products. In: Shi J (ed) Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Etats-Unis, p 135-155.
- Caroch, M., and Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Celhay M. Clément (2013) : Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques Doctorat (INP Toulouse) .p:318.
- Chaker, E.K. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, université de Toulouse, p70-71.
- Chandler RF, Freeman L, Hooper SN (1979). Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 1 (1):49-68.
- Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., & Stocker, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 921-924.
- Chemat, F. (2011). *Eco-extraction du végétal* (pp. 336-p). Dunod.
- Cherbal, A., Kebieche, M., Madani, K. & El-Adawi, H. (2012). Extraction and valorisation of phenolic compounds of leaves of Algerian *Pistacia lentiscus*, *Asian Journal of Plant Sciences*, V. 11, 131- 136.
- Chou, S.-T., Chao, W.-W., and Chung, Y.-C. (2003). Antioxidative Activity and Safety of 50% Ethanol Red Bean Extract (*Phaseolus radiatus* L. var. Aurea). *Journal of Food Science*, 68(1), 21-25.
- Collin, F., Karkare, S., et Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3), 479-497.
- Contreras-Guzmán, E. S., & Strong III, F. C. (1982). Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65, 1215- 1226
- Cowan, MM. (1999). Plant Products as antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12(4) ,564-582
- Crété ., 1965. Précis de botanique, systématique des Angiospermes. Tome II, édition Masson et Cie, 224 p.
- Cronquist, A., & Takhtadzhian, A. L. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York Columbia University Press. 1262p

D

- Daaboul I. (2004). La chimie des produits naturels (partie théorique). Publications Université d'Alep, page 327.
- Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76, 899-905.
- Dixon, RA., Paiva, NL. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7 (7), 1085-1097.
- Djedaia, S. (2017). Etude physico-chimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*pistacia lentiscus* l.). Université badji mokhtar-annaba, 143.
- Djidel, S., Khennouf, S., Ameni, Dj., Baghiani, A., Arrar, L and Charef, N.(2013). Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. Leaves extracts. *Pharmacognosy Communications*, 3(2), 28.
- Doghbage A., Belhadj S., Derridj A., Mevy J., Guaquelin T., Merdas S., Tonitto A., Foulla H.(2020). Comparative eco-botanical analysis of *Pistacia lentiscus* L. In Algeria through morphological and ultra-structural marks related to leaves and stomata. *Revue agrobiologia*, 10(1), 1826-1836.
- Dominique, M. (2007). Le pin maritime. La forêt notre savoir faire. Ed. institut pour le développement forestier. Paris, 4p.
- Dvorakova, M., Hulin, P., Karabin, M., & Dostalek, P. (2007). Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech Journal of Food Sciences-UZPI* (Czech Republic).

E

- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. and Bekhradnia, A.R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*.7 (18): 3188-3192.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*.7, 88-95.
- Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2003). Methods in polyphenol analysis. *Polyphenol Extraction from Foods*. RSC, Cambridge, UK, 2-16.

F

- Fan, M., Andrade, G. F., & Brolo, A. G. (2020). A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry. *Analytica chimica acta*, 1097, 1-29.
- Farjon, A. (1984). *Pines: Drawings And Descriptions Of The Genus Pinus*. 2ème edn. E.J. Brill, Leiden, Pays-Bas, p 235.
- Farjon, A. (2001). *World checklist and bibliography of conifers*. 2nd ed. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. 309.
- Fekih, N. (2015). Propriétés Chimiques Et Biologiques Des Huiles Etlencenssentiellles De Trois Espèces Du Genre *Pinus* Poussant En Algérie. Thèse De Doctorat, université de Tlemcen, p38.
- Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Botelho, C., Santos, J., Ramos, C., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. (2020). Unravelling the biological potential of *Pinus pinaster* bark extracts. *Antioxidants*, 9(4), 334.
- Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. (2019). Moderate electric fields as a potential tool for sustainable recovery of phenolic compounds from *Pinus pinaster* bark. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(9), 8816-8826.



G

- Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Theodosios, T. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120–1130.
- Gaussen, H., Leroy H. F. (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs. 2eme Ed., 426.
- Gentile C., Tesoriere L., Butera D., Fazzari M., Monastero M., Allegra M., & Livrea M.A. (2007). Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 643-648
- Ghyath Mosbah S. (1999). Principe de biochimie. Université de Damas. Page 478.
- Glatz, Z. (2006). Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 841, 23-37.
- Gulati, O.P. (2005). The nutraceutical Pycnogenol: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biomed. Rev.* 16, 49–57.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M., & Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2227-2238.

H

- Hacini, N, Djelloul, R., Mokrani, K. (2017). Study of the antibacterial activity of the extract from the essential oil of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* on three bacterial strains. *Int. J. Appl. Environ. Sci*, 12(1), 47-56.
- Hafsé, M., Benbrahim, K. F., & Farah, A. (2015). Ethnobotanical survey on the use of *Pistacia lentiscus* in northern MOROCCO (Taounate). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13, 864-872.
- Hahn M. W., Lunsdorf H., Schauer M., Hofle M. G., Boenigk J., and Stadtler P., Isolation of novel ultra-micro-bacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69:1442-1451.
- Hahn, L. W., Ritchie, M. D., & Moore, J. H. (2003). Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene–gene and gene–environment interactions. *Bioinformatics*, 19(3), 376-382.
- Halen, P. K., Chagti, K. K., Giridhar, R., & Yadav, M. R. (2007). Combining anticholinergic and anti-inflammatory activities into a single moiety: a novel approach to reduce gastrointestinal toxicity of ibuprofen and ketoprofen. *Chemical biology & drug design*, 70(5), 450-455.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hamad, H., Ibrahim, H., Mariam, H., & Mojahidul. (2011). Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour.*, 1 (1). 15-23.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hartmann, T. (2007). From wasteproducs to ecochemicals, fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831–2846.
- Hassanpour, S., maherisis, N., & Eshratkhah, B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Foerst, Soil and Erosion*, 1(1), 47-53.

- Hong, E. J.; Na, K. J.; Choi, I. G.; Choi, K. C; Jeung, E. B.( 2004). Anticacterial and Antifungal Affects of Essentials Oils from Coniferous Trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*: 27 (6), p. 863-866.
- HOUAIRI Souhila (2019), Evaluation de l'Activité anti-radicalaire de *Pinus halepensis* Mill.Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques .mémoire Master .Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy- B.B.A
- Hsu, B., Coupar, I. M., & Ng, K. (2006).Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food chemistry*, 98(2), 317-328.

**I**

- Iravani, S., Zolfaghari, B. (2011). Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res. Pharm. Sci*, 6, 1–11.
- Jerez M, Sineiro J, Nunez MJ (2009) Fractionation of pine bark extracts: selecting procyanidins. *European Food Research and Technology* 229 (4):651-659

**J**

- Jung, M. J.; Chung, H. Y.; Choi, J. H.; Choi, J. S. (2003). Antioxidant Principles from the Needles of Red Pine, *Pinus densiflora*. *Phytotherapy Research*: 17, p. 1064-1068.

**K**

- Ka, M. H.; Choi, E. H.; Chun, H. S.; Lee, K.-G. ( 2005). Antioxydante Activity of Volatiles Extracts Isolated from *Angelica tenuissimae* Roots, Peppermint Leaves, Pine Needles, and Sweet Flag Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 53, p. 4124-4129.
- Kahlouche-Riachi, F. (2014) evaluation chimique et activite antibacterienne de quelques plantes médicinales d'Algerie.these de doctorat, Université Constantine1
- Kawser, M. H., Abdal-Dayem, A., Han, J.,Yin, Y., Kyeongseok, K., Kumar-Saha, S., Gwang-Mo, Y., Choi, H. Y., Ssang-Goo, C.(2016).Molecular Mechanisms of the Antiobesity and Anti-diabetic Properties of Flavonoids.*International journal of molecular Sciences*,17(4),569.
- Khan, M., Alam, A., Khan, K.M., Salar, U., Chigurupati, S., Wadood, A., Ali, F., Mohammad, J.I., Riaz, M., and Perveen, S. (2018). Flurbiprofen derivatives as novel  $\alpha$ -amylase inhibitors: Biology-oriented drug synthesis (BIODS), in vitro, and in silico evaluation. *Bioorganic Chemistry*. 81, 157-167.
- Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.
- Khelil A., & A. Kellal. (1980). Possibilité de culture et délimitation des zones à vocation pistachier en Algérie. *Fruits*, Vol. 35 :177-185.
- Kim WJ, Kim J, Veriansyah B, Kim JD, Lee YW, Oh SG, Tjandrawinata RR. (2009). Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *J Supercrit Fluids* ,48 (3):211-216.
- Kramer KU, Green PS. (1990). *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 1 Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
- Koné, K. P. F. O.(2018). Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne. Thèse de doctorat.Institut National Polytechnique Felix Houphoët Boigny-Yamoussoukro, 239p.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle, 32p.



L

- La Fever, R. E.; Vogel, B. S.; Croteau, R. (1994). Diterpenoid Resin Acid biosynthesis in Conifers: Enzymatic Cyclization of Geranylgeranyl Pyrophosphate to Abietadiene, the Precursor of Abietic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 313 (1), p. 139-149.
- Ladoh, Y., Dibong, S., Nyegue, M., Djembissi, T., Lenta, N., Mpondo, M., Yinyang, J., and Wansi, J. (2015). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84, 7636.
- Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Doctoral dissertation, Strasbourg 1.
- Lau BHS, Riesen SK, Truong KP, Lau EW, Rohdewald P, Barreta RA.(2004) Pycnogenol® as an adjunct in the management of childhood asthma. *J Asthma*; 41: 825-832.
- Leclerc, H., Gaillard, J-L., Simonet, M. (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
- Lee, K. J., Baek, D. Y., Lee, G. A., Cho, G. T., So, Y. S., Lee, J. R., & Hyun, D. Y. (2020). Phytochemicals and Antioxidant Activity of Korean Black Soybean (*Glycine max L.*) Landraces. *Antioxidants*, 9, 213.
- LEMAISTRE J. (1959). Le Pistachier (Etude Bibliographique). *Fruits* 14, 57 – 77
- Lin, S., Zhang, G., Liao, Y., Pan, J., and Gong, D. (2015). Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase Inhibitors: Structure–Affinity and Structure–Activity Relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7784-7794.
- Longo, L., Scardino, A., & Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus L.*, *Phillyrea latifolia L.* And *Rubia peregrina L.* *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8(3). 360-364.

M

- Maamri, S. (2008). Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud Algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens .Doctoral dissertation, Université de Boumerdès-M'hamed Bougara, p15.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*.
- Maimoona, A.; Naeem, I.; Saddiqe, Z.; Jameel, K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 133, 261–277.
- Malu, A., Bahra, M. (1982). La biochimie, publications de l'Université de Damas. Syrie.
- Mansour, D.H. (2014). Evaluation chimique et activité anti dermatophyte de quelques plantes médicinales d'Algérie. *Science vétérinaire, université de Constantine* 1.
- Marco, Bonesi, Federica Menichini, Rosa Tundis, Monica R. Loizzo, Filomena Conforti, Nicodemo G. Passalacqua, Giancarlo A. Statti & Francesco Menichini (2010) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25:5, 622-628.
- Mark, R., Lyu, X., Lee, J. J., Parra-Saldívar, R., & Chen, W. N.(2019). Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *J. Funct. Foods*, 57, 233–254.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*. 26, 211-219.

- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
- Murray, A. P., Rodriguez, S. (2004). Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift Naturforsch C*, 59(7-8): 477-480.
- Murray, K. K., Boyd, R. K., Eberlin, M. N., Langley, G. J., Li, L., & Naito, Y. (2013). Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations. *Pure and Applied Chemistry*, 85(7), 1515-1609.

N

- Nair, S.S., Kavrekar, V., and Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*. 3, 128-132.
- Nauciel, C., & VILDE, J. (2005). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Bactériologie médicale*, 59-64.
- Nausicaa, T., Caroline, S., Matthias Vilain. (2018). *La flore médicinale thérapeutique ou toxique*. Éditions Racine.
- Nigro, H. (2016). Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet antioxydant des extraits de *Pinus halpensis*. Doctoral dissertation.

O

- Ouyang, X., Li, X., Lu, W., Zhao, X., and Chen, D. (2018). A Null B-Ring Improves the Antioxidant Levels of Flavonol: A Comparative Study between Galangin and 3,5,7-Trihydroxychromone. *Molecules*. 23, 3083.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44, 307-315.

P

- Packer L, Rimbach G, Virgili F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from the pine (*Pinus maritima*) bark, *Pycnogenol*. *Free Rad Biol Med*; 27: 704-724.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *Journal of Nutrition*. 133, 2812-2819.
- Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BHS.(2002.Research report:Pycnogenol® protects neurons from amyloid  $\beta$  peptideinduced apoptosis. *Mol Brain Res*; 104: 55-65.
- Ponce A.G., Fritz R., del Valle C., et Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*. 36, pp.679-684.
- Price RA, Liston A, Strauss SH (1998) Phylogeny and systematic of *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, pp 49-68.

Q

- Quezel P.S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581.965 Q8).

**R**

- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., & Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological research*, 50(4), 441-451.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., & Govoni, S.
- Ramdani-Bouguessa, N Benouda, A., Ben Redjeb, S., Hammami, A., Sibille, S., & Tazir, M.,. (2009). Antimicrobial resistance of respiratory pathogens in North African countries. *Journal of Chemotherapy*, 21(6), 627-632.
- Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). *Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne* (Vol. 3). Forêt privée française.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1999) *Biologie végétale*. 6ème edn. De Boeck, Bruxelles, Belgique, p 944
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K. H., & Yang, J. (2019) Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 71, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.024>.[
- 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. Rad. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Richardin, P., Capderou, C., Flieder, F., Bonnassies, S., & Raison, D. (1988). Analyse de Quelques Tannins Végétaux Utilisés pour la Fabrication des Cuirs. *Les documents graphiques et photographiques: analyse et conservation: travaux du Centre de Recherches sur la Conservation des Documents Graphiques*, 1986-1987, 151-82.
- Roginsky, V., and Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.
- Rohdewald, P. (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 40, 158–168.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 79-86.
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.

**S**

- SADLI, K.(2017). Etude de l'activité insecticide de l'huile essentielle du pin maritime (*Pinus pinaster* L.) sur la bruche du haricot commun *Acanthoscelides obtectus* Say 1830 (Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae). Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Protection des Plantes Cultivées, p61.
- Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2009). Apoptosis: Involvement of oxidative stress and intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Spain: Dept of physiology*. University of Extremadura, 229-35.
- Sanago, R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle, Univ.Bamako Mali, vol 53.
- Sarikaki V, Rallis M, Tanojo H, Panteri I, Dotsikas Y, Loukas YL, Papaioannou G, Demetzos C, Weber S, Moini H, Maibach HI, Packer L (2004) In vitro percutaneous absorption of pine bark extract (Pycnogenol) in human skin. *Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology* 23 (3):149-158.

- Savignac, B., Lavaivre, C., Meslier, F., Oustalniol, J. (2005). Microbiologie. Nathan, Paris, 159.
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, 14, 111-125.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., and Bitsch, R. (2002). Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*, 36, 177-187.
- Seghiri, R. (2009). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*. Thèse de doctorat, université de Constantine, p12.
- Seigue, A. (1985). "La foret circumméditerranéenne et ses problèmes. Technique agricole et production méditerranéenne", Maison neuve GP et Larose, 137-141.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sivonova M, Zitnanova I, Horakova L, Strosova M, Muchova J, Balgavy P, Dobrota D, Durackova Z (2006). The combined effect of pycnogenol with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *General Physiology and Biophysics* 25 (4):379- 396
- Suga, T.; Ohta, S.; Munesada, K.; Ide, N.; Kurokawa, M.; Shimizu, M.; Ohta, E.; (1993). Endogenous Pine Wood Nematicidal substances in Pines, *Pinus Massoniana*, *P. strobes* and *P. Palustris*. *Phytochemistry*: 33 (6), p. 1395-1401
- Szydłowski, A., Dianoczeki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76, 899-905.

#### T

- Taleba, H., Sarah, E., Maddocks, R., Morris, K., Ara, D., Kanekanian. (2016). Chemical characterisation and the anti-inflammatory, anti-angiogenic and antibacterial properties of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 457-468.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.
- Tourino S, Selga A, Jimenez A, Julia L, Lozano C, Lizarraga DL, Cascante M, Torres JL (2005) Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem* 53 (12):4728-4735.
- Tsitsimpikou, C; Petrakis, P. V.; Ortiz, A.; Harvala, C; Roussis, V. (2001). Volatile Needle Terpenoids of Six *Pinus* Species. *J. Essent. Oil Res.*: 13, p. 174-178.

#### U

- Uriarte-Pueyo, I., and I Calvo, M. (2011). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 18(34), 5289-5302.
- Ustun, O., Senol, F., Kurcuoglu, M., Orhan, I., Kartal, M., Baser K. (2012). Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Ind. Crop. Prod.*, 38, 115-123.

#### V

- Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) And pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3-4), 169-175.
- Villar, A., Sanz, M.J., & Payo, M. (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Crude Drug Research*, 25, 1-3.

W

- Wang, S.Y. and Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in Strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4977–4982.
- Willfor S. M.; Ahotupa, M. O.; Hemming, J. E.; Reunanen, M. H. T.; Eklund, P. C.; Sjöholm, R. E.; Eckerman, C. S. E.; Pohjamo, S. P.; Holmbom, B. R.; (2003 a). Antioxidant activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, p. 7600-7606.
- Willfor, S.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Holmbom, B.; (2003b). Phenolic and Lipophilic Extractives in Scots Pine Knots and Stemwood *Holzforschung*: 57, p. 359-372.

Y

- Yao L.H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 , 113-122.
- Yougken HW (1924 ) The drugs of north American Indian II. *AM J Pharmacol* 97:257-271
- Yu, E. J.; Kim, T. H.; Kim, K. H.; Lee, H. J.; (2004). Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pinel needles). *Flavour and Fragrance Journal*: 19, p. 532-537.

Z

- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., and Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53, 244-251.
- Zerargui, F.(2015) . Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. Et caractérisation des substances bioactives. Thèse pour l'obtention du diplôme Doctorat en Sciences, université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Zhong, Y., and Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *In Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing. pp.287-333.
- Zohary, M.(1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series)*, 5(4), 187-228.

# ***ANNEXES***

**Annexe I (activité antioxydante)****1. Matériel du laboratoire**

Ampoule à décanter, tubes eppendorf, micropipettes de volumes différents, microplaques, ballons, béchers, erlenmeyers, éprouvettes, flacons, spatules, portoirs, verres de montre.

**2. Instruments**

Balance de précision (KERN).

-Lecteur de microplaque (PerkinElmer).

-Agitateur magnétique MSH - 20D WISD

Etuve (Memmert).

- pH mètre (METTLER TOLEDO).

-Bain Ultrason, Elma S70H, Elmasonic, Elma Schmidbauer GmbH, Germany

**Annexe II : Réactifs**

Réactifs	Compositions	Quantités
<b>DPPH<sup>*</sup></b>	DPPH	6 mg
	Méthanol	100 ml
<b>Galvinoxyl</b>	Galvinoxyl	4 mg
	Méthanol	100 ml
<b>ABTS<sup>+</sup> (7 mM)</b>	ABTS	19,2 mg
	H <sub>2</sub> O	5 ml
	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (2.45 mM)	3,3 mg
	H <sub>2</sub> O	5 ml
<b>Phénantroline (0.5%)</b>	1,10-Phénantroline monohydraté	0,05g
	Méthanol	q.s.p 10 ml
<b>Ferrozine</b>	Ferrozine	0,5 ml
	H <sub>2</sub> O	9,5 ml

## Annexe III : Solutions enzymatiques et substrats

Solutions	Compositions	Quantités
Enzyme $\alpha$ -amylase (1U)	Enzyme $\alpha$ -amylase	1 mg
	Tampon phosphate (pH 6,9)	9ml
Amidon (0.1%)	Amidon	0,1 g
	H <sub>2</sub> O	q.s.p 100 ml
AChE	AChE	1 mg
	Tampon phosphate (pH 8)	22,6 ml

## Annexe IV : Standards

Standards	Compositions	Quantités
Acide gallique	Acide gallique	0,5 mg
	Méthanol	5 ml
Quercétine	Quercétine	1 mg
	Méthanol	5 ml
Acide ascorbique	Acide Ascorbique	4 mg
	Méthanol	1 ml
EDTA	EDTA	4 mg
	Méthanol	1 ml
TROLOX	TROLOX	4 mg
	Méthanol	1 ml
Galantamine	Galantamine	4 mg
	Méthanol	1 ml



## Annexe V : Solutions chimiques

Solutions chimiques	Compositions	Quantités
<b>Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois</b>	FCR concentré (2M) H <sub>2</sub> O	1 ml q.s.p 10 ml
<b>Carbonate de sodium anhydre (7,5%)</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	7,5 g q.s.p 100 ml
<b>Acétate de potassium (1M)</b>	CH <sub>3</sub> COOK H <sub>2</sub> O	9,80 g 100 ml
<b>Nitrate d'aluminium</b>	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	10g 100ml
<b>Acétate d'ammonium</b>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,927 g 25 ml
<b>Chlorure de cuivre II dihydraté</b>	CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	0,042625 g 25 ml
<b>Tampon phosphate pH 6,6</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	62,5 ml 37,5 ml
<b>Ferricyanide de potassium (1%)</b>	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	1 g q.s.p 100ml
<b>Acide trichloracétique (10%)</b>	TCA H <sub>2</sub> O	1 g q.s.p 10 ml
<b>Chlorure de fer III anhydre (0.1%)</b>	FeCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0,1 g q.s.p 100 ml
<b>Chlorure de fer III anhydre (0.2%)</b>	FeCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0,02g q.s.p 10 ml
<b>Chlorure de fer III tetrahydraté (0,2 mM)</b>	FeCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	4 mg 100 ml
<b>Tampon phosphate (pH 6.9) (0.2 M)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	51 ml 49 ml
<b>Acide hydrochlorique (1M)</b>	HCl H <sub>2</sub> O	4.17 ml 45.83 ml
<b>Iodure de potassium iode (IKI)</b>	KI H <sub>2</sub> O	3 g 100 ml 127 mg

Iodine (5mM)		
<b>Tampon phosphate (pH 8) (100 mM)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,3
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	94,5
<b>DTNB</b>	DTNB	16 mg
	Tampon phosphate (pH 7)	4 ml
	NaHCO <sub>3</sub>	7,5 mg
	Tampon phosphate (pH 8)	4 ml
<b>Tampon phosphate (pH 7)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	39 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	61 ml
<b>Solution de formaldéhyde</b>	Formaldéhyde	100 µl
	Eau physiologique (0,9%)	q.s.p 3,5 ml

## Annexes VI (activité antibactérienne)

### 1-Matériel utilisée au laboratoire

- Spectrophotomètre.
- Tubes stériles.
- Les équivalions.
- Balance de précision.
  - Boites de Pétries.
  - Etuve
  - Micropipettes.
  - Autoclave
  - Agitateur

### 2- Produits chimiques

- MéthanolCH<sub>3</sub>OH à 40%.

