



Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
جامعة فرحات عباس , سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



UNIVERSITE Paris-Descartes

École Doctorale Médicament-  
Toxicologie Chimie-Imageries ED  
563

## DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE

### THÈSE

N°...../SNV/2021

Présentée en Cotutelle entre

l'Université Ferhat Abbas Sétif 1 - Algérie

et l'Université de Paris-Descartes - France

Pour l'obtention du diplôme de

### DOCTORAT EN SCIENCE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Ecologie végétale

Par : Nabiha Benalia

### THÈME

*Etude phytochimique de deux espèces d'intérêt biologique :*

*Genista numidica Spach. et Pistacia lentiscus L.*

Soutenue le .../.../2021

#### DEVANT LE JURY

|                       |                       |                             |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Président             | BOULAACHAB Nacira     | Pr. Université Sétif 1      |
| Directrices de thèses | DAHAMNA Saliha        | Pr. Université Sétif1       |
|                       | DEGUIN Brigitte       | Pr. Université Paris        |
| Examineurs            | SARI Madani           | Pr. Université M'Sila       |
|                       | CHAMPY Philippe       | Pr. Université Paris-Saclay |
|                       | BOUTEFNOUCHET Sabrina | MCA. Université Paris       |
| Invités               | VERITE Philippe       | Pr. Université Rouen        |
|                       | LAALAOUI Korichi      | Pr. Université Constantine  |

*Laboratoire de phytothérapie Appliquée aux maladies Chroniques (LPAMC)*

2020/2021

## Résumé

*Genista numidica* Spach. (Teq-taq) et *Pistacia lentiscus* L. (Darou) sont deux espèces abondantes du littoral algérien. Ce travail rapporte l'étude de la composition phytochimique et des activités biologiques des deux espèces, dans deux parties distinctes. Une approche dérégulative par LC-MS<sup>2</sup> en comparaison avec des standards et d'autre part, par la GC-MS a été appliquée pour l'espèce *Genista numidica* Spach. L'identification d'alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques (spartéine, cytosine et anagyrene) ainsi que des flavones et isoflavones (génistéine) est décrite. La visualisation de la complexité phytochimique de spécimen de différentes origines géographiques a été envisagée via la création de réseaux moléculaires. L'évaluation de l'activité antibactérienne sur un panel de souches bactériennes Gram+ et Gram- a montré une activité marquée des extraits méthanoliques de *G. numidica* sur des souches de *Streptococcus sp.* La composition chimique et microbiologique du sol des zones de collecte concernées a également été étudiée. L'analyse par MALDI-TOF d'échantillons de sol de deux régions d'études a permis d'identifier des microorganismes associés aux spécimens collectés de *G. numidica* Spach. Concernant l'espèce *Pistacia lentiscus* L., l'étude comparative d'échantillons artisanaux et commerciaux d'huile obtenue par pression des fruits a été envisagée. L'analyse par GC-MS de la fraction saponifiable a permis d'identifier la présence d'acide oléique (18:1), d'acide palmitique (16:0), d'acide linoléique (18:2) et d'acide palmitoleique (16:1), dans un ratio 3/2/1/0,1. De plus, les analyses par GC-MS et par LC-DAD-MS ont révélé pour la première fois la présence d'acides alkylsalicyliques dans la fraction apolaire des fruits, l'huile et la fraction insaponifiable de l'huile de Lentisque. L'évaluation de la cytotoxicité sur fibroblastes dermiques humains normaux a montré une absence de toxicité de l'huile, alors que la fraction insaponifiable diminue la viabilité cellulaire à concentration supérieures à 50µg/mL. L'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë *in vivo* chez la souris de l'huile de fruit de lentisque est également rapportée.

**Mots clés :** *Genista numidica* Spach, *Pistacia lentiscus* L, cytotoxicité, activité antibactérienne, phytochimie, toxicité aiguë et subaiguë souris.

## Abstract

*Genista numidica* Spach. (Teq-taq) and *Pistacia lentiscus* L. (Darou) are two abundant species on the Algerian coast. This work reports the study of the phytochemical composition and biological activities of the two species, in two separate parts. A dereplicative approach by LC-MS<sup>2</sup> in comparison with standards. GC-MS has been applied for the species *Genista numidica* Spach. Identification of piperidine and quinolizidinic alkaloids (sparteine, cytisin and anagyrin) and flavones and isoflavones (genisteine) is described. The visualization of the phytochemical complexity of specimen from different geographical origins has been considered through the creation of molecular networks. The evaluation of antibacterial activity on a panel of bacterial strains Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup> showed marked activity of methanolic extracts of *G. numidica* on strains of *Streptococcus* sp. The chemical and microbiological composition of the soil in the relevant collection areas was also investigated. MALDI-TOF analysis of soil samples from the two study areas identified microorganisms associated with the collected *G. numidica* specimens.

For the species *Pistacia lentiscus* L., the comparative study of artisanal and commercial samples of oil obtained by fruit pressure was considered. GC-MS analysis of the saponifiable fraction identified the presence of oleic acid (18:1), palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2) and palmitoleic acid (16:1), in a 3/2/1/0.1 ratio. In addition, analysis by GC-MS and LC-DAD-MS revealed for the first time the presence of alkylsalicylic acids in the apolar fraction of fruits, oil and the insaponifiable fraction of lentisque oil. The evaluation of cytotoxicity on normal human dermal fibroblasts showed an absence of oil toxicity, while the elusive fraction decreases cell viability at concentrations greater than 50µg/mL. The assessment of acute and sub-acute toxicity *in vivo* in mice of lentisk fruit oil is also reported.

**Key words:** *Genista numidica* Spach, *Pistacia lentiscus* L, cytotoxicité, antibacterial activity, Phytochemistry, acute and sub-acute-toxicity- mice.

## الملخص

(*Genista numidica* (Teq-taq) و *Pistacia lentiscus* (Darou). صنفان من النباتات المتوفرة على الساحل الجزائري، والمعروفان محليا باسم طقطاق والضررو، ويكرس هذا العمل دراسة التركيب النباتوكيميائية والنشاط البيولوجي لكلا الصنفين النباتيين. فبالنسبة للصنف النباتي *Genista numidica*، فقد تمت دراسة التركيب النباتوكيميائية للصنف باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا طور السائل المقترن بثنائي مطياف الكتلة  $LC-MS^2$  وذلك بالاعتماد على شواهد بعض المركبات بالإضافة الى استعمال جهاز الكروماتوغرافيا طور الغازي المقترن بمطياف الكتلة GC-MS الذي تم استخدامه لمعرفة التركيب الكيميائية. أثبتت الدراسة وجود القلويدات البيبيريدينية والكينوليزيدينية من صنف سبارتين سيتيزين أناجيرين، إضافة إلى الفلافونات والايروفلافونات. هذا وقد تم اظهار مدى تعقيد التركيب الكيميائي لمختلف أجزاء النبتة وعلاقتها بالمنطقة الجغرافية المتواجدة فيها من خلال انشاء الشبكات الجزيئية. أظهر تقدير النشاط المضاد للبكتيريا وذلك من خلال مجموعة من السلالات البكتيرية  $Gram^+$  و  $Gram^-$  وجود نشاطية معتبر للمستخلصات الميثانولية بالنسبة للصنف النباتي *G.numidica* على السلالات العقدية *Stroptococcus*. هذا وقد تمت دراسة التركيب الكيميائي والميكروبيولوجي لتربة نبتة *G. numidica*. كما تمت دراسة عينات من تربة مناطق الدراسة من خلال جهاز المطياف *Maldi-Tof* والذي أظهرت نتائج عن تواجد مخلوقات مجهرية مرتبطة بأجزاء نبتة *G.numidica*. بالنسبة للصنف النباتي *Pistacia lentiscus* (نبات الضررو) فقد تمت دراسة الزيت المستخلص من ثمار الضررو وذلك من خلال المقارنة بين نوعين من العينات: عينات من زيت الضررو ذات طبيعة تجارية وعينات من زيت الضررو ذات طبيعة يدوية. تمت دراسة الجزء المتصين من الزيت عن طريق جهاز GC-MS والذي سمح لنا بالحصول على النتائج التالية: حمض الأوليك، حمض البالمتيك، حمض البالمتوليك وحمض لينوليك وذلك بنسبة 0.1/1/2/3. بالإضافة الى ذلك، تحاليل GC-MS و LC-DAD-MS كشف للمرة الأولى عن وجود الأحماض الكيلسالييسيلية في الجزء اللاقطبي من ثمار الضررو وزيت الضررو إضافة إلى الجزء الغير قابل للتصين لزيت الضررو. أظهر تقدير السمية الخلوية على الخلايا الليفية الجلدية عند الانسان عن عدم سمية الزيت، في حين أن الجزء غير المتصين للزيت يقلل من قدرة الخلية على البقاء بتركيزات أكبر من 50 ميكروغرام/مليلتر. كما تمت دراسة تقييم السمية الحادة لزيت الضررو على مجموعة من الفئران.

**الكلمات المفتاحية:** *Pistacia lentiscus*، *G.numidica*، السمية الخلوية، النشاط المضاد للبكتيريا، الكيمياء النباتية، السمية الحادة وشبه الحادة للفار.

## *Remerciements*

Avant tout, je souhaite rendre grâce à Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la santé, le courage et la patience de mener à bien ce travail.

Puis, au terme de cette aventure scientifique aussi passionnante et avant d'exposer le fruit de six années d'efforts, il m'est particulièrement agréable en ces quelques lignes de remercier et d'exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Mme MICHEL SYLVIE Professeur des universités à l'université de Paris-Descartes, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Pharmacognosie et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

J'exprime ma gratitude à Mme DEGUIN BRIGITTE, Professeur des universités à l'université de Paris-Descartes en France et directrice de thèse pour son encadrement, ces conseils pertinents et son aide précieuse tout au long de ce travail, malgré son emploi du temps de professeur très chargé.

Je voudrais également remercier grandement Mme DAHAMNA SALIHA, Professeur des universités de l'université de Sétif 1, co-directrice de thèse et directrice de laboratoire de phytothérapie appliquée aux maladies chroniques, pour son accueil au sein de son laboratoire et pour son soutien et ces conseils au cours de la réalisation de cette thèse.

Je voudrais remercier ensuite les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie vivement Mr. CHAMPY PIERRE, Professeur des universités à l'université Paris-Saclay en France et Mr. SARI MADANI, Professeur des universités à l'université de M'SILA en Algérie, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et ce malgré leurs engagements et les contraintes de temps et de délais. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude. Je souhaite remercier également les examinateurs de thèse :

- Mme BOULAACHEB NACIRA, Professeur des universités à l'université Ferhat Abbas Sétif 1
- Mr VERITE PHILIPPE, Professeur des universités à l'université de Rouen- France.
- Mr LALAOUI KORICHI, Professeur de l'université à l'université de Constantine en Algérie.

Je tiens à remercier plus particulièrement Mme BOUTEFNOUCHET SABRINA, Maître de conférence à l'université de Paris-Descartes et co-encadrante de cette thèse, de m'avoir initiée à la phytochimie et de m'avoir intégré dans son équipe de recherche. Je la remercie sincèrement pour

son aide et son soutien tout au long de cette thèse, pour toutes les discussions scientifiques et les conseils qui m'ont accompagné toutes les quatre années de thèse malgré, ses multiples occupations. Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans sa contribution.

Une pensée me vient bien évidemment à mon enseignant et ex directeur de thèse Mr MOHAMMED KAABECHE, Professeur à l'université de Ferhat Abbas Sétif1 qui a su inspirer l'idée de travailler sur *Genista numidica* et d'organiser la cotutelle entre les deux universités avec l'aide administrative de Mr HARRAG ABDELMALEK.

J'adresse mes remerciements les plus profonds à Dr SERGIO ORTIZ pour son aide pendant les manipulations de phytochimie, des activités biologiques au laboratoire de Pharmacognosie, ses conseils et ses encouragements. Qu'il trouve ici le témoignage de mon estime et l'expression de ma profonde gratitude.

Un remerciement spécial s'adresse aux différents laboratoires et leurs personnels :

- Au Professeur CHEMAT SMAIN, responsable de laboratoire de santé au Centre de Recherche Scientifique et technique d'Analyse Physico Chimique CRAPC Tipaza en Algérie.

- A Mme ATI FATIMA et Mr BOUMECHHOUR ABDENOUR pour leurs aides techniques lors de mon stage au centre de Recherche CRAPC.

-A Mme SAM HASSIBA, directrice du laboratoire du sol du bureau national pour le développement rural BNEDER à Alger (Algérie), pour la réalisation des analyses du sol.

- A Dr B. FIEBICH et Dr T. ROSE pour leur aide et accueil au laboratoire Vivacell (Denzlingen, Allemagne).

- A Dr MARYLIN LESCO pour son encadrement au laboratoire de microbiologie à la faculté de Pharmacie (Paris -Descartes).

- A HAMOUDI MERIEM et AMROUN DJOUHER doctorantes au laboratoire de phytothérapie appliquée aux maladies chroniques et Dr NOUIOUA Wafa pour leurs aides pendant l'évaluation toxicologique (in vivo).

Un remerciement s'adresse également à mes collègues du laboratoire de Paris Descartes ainsi que les collègues du Projet Exandas, avec eux j'ai passé des moments de partage inoubliables : Julia Morais Fernandes, kristina Bakkali, Maria Concetta Tenuta, Rym Mecheri, Zahia Ghouila, Wiem Aloumi, Mohamed Elyagoubi et Hichem Mechqouq.

Ce travail a nécessité des déplacements pour la collecte des échantillons des huiles de lentisque et des sorties sur terrain pour les différents échantillonnages du sol et de *Genista numidica*, c'est avec un grand plaisir que je remercie les deux propriétaires de deux coopératives de l'huile de lentisque, Mr DJELOUAH et Mr BOUANANI, les familles rurales des régions d'Elkala et de Jijel. Sans oublier les forestiers de la conservation des forêts et le parc national de TAZA à Jijel pour l'aide précieuse pendant l'aventure qui a duré une année de prospection de l'espèce endémique de l'Algérie *Genista numidica*.

Ce manuscrit conclut quatre années de travail de thèse en cotutelle réalisée entre le laboratoire de Pharmacognosie-UMR 8038CiTCOM à Paris en France et le laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques de l'université Ferhat Abbas Sétif1 en Algérie. Ce travail a été financé en grande partie par le programme PHC TASSILI (18 mois), le programme européen EXANDAS et un stage supplémentaire (3 mois).

## *Dédicace*

*A ma grand-mère : Mani Hadja Rehifa, que dieu la protège*  
*A ma mère qui m'a épaulé et n'a cessé de prier pour moi durant mon*  
*parcours scientifique*

*A mon père qui m'a accompagné depuis l'échantillonnage jusqu'à la*  
*clôture de cette thèse, les mots ne peuvent suffire ce que je sens, Que ce*  
*travail traduit ma gratitude*

*A la famille Grinat à Paris, qui m'ont ouvert leurs cœurs avant leurs*  
*portes pendant la pandémie du Coronavirus*

*A mes frères et mes sœurs : Loubna, Houda et Meriem*  
*A mes nièces et neveux qui m'ont toujours soutenu malgré leurs jeunes*  
*âges*

*A mon oncle Mohamed et mon cousin Malek*

*A Hamoudi lamoui*

*A ma copine Wassila et son mari Mohamed*

*A toute ma famille et toute personne ma soutenu de près et de loin.*

*Je dédie le fruit de ce travail*

*Nabiha.*



## Publications

- 1- Tahrioui, A., Ortiz, S., Azuama, O. C., Bouffartigues, E., **Benalia, N.**, Tortuel, D., Maillot, O., Chemat, S., Kritsanida, M., Feuilloley, M., Orange, N., Michel, S., Lesouhaitier, O., Cornelis, P., Grougnet, R., Boutefnouchet, S., Chevalier, S.; Membrane-Interactive Compounds From *Pistacia lentiscus* L. Thwart *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Frontiers in microbiology*, **2020**, *11*, 1068.
- 2- **N. Benalia**, A.Boumechhour, S.Ortiz, C. A.Echague, T. Rose, B.L. Fiebich, S. Chemat, S.Michel, B.Deguin<sup>1</sup>, S.Dahamna, S. Boutefnouchet ; Identification of alkylsalicylic acids in Lentisk oil (*Pistacia lentiscus* L.) and viability assay on Human Normal Dermal Fibroblasts . OCL-Oilseeds and fats, Crops and Lipids, **2021**, *In press*.

## Communications

- 1- Flash-Poster présenté aux 5<sup>ème</sup> journées internationales de l'AFERP, Angers 17-19 juillet 2017. **Benalia N.**, Deguin B., Michel S., Otogo N'ngang E., Fox Ramos A., Kaabeche M. Boutefnouchet S. « Phytochemical study of *Genista numidica* Spach, from two spots of Numidia area: Dereplication of LC-MS<sup>2</sup> extracts and molecular networking ».
- 2- Poster présenté au meeting de la PSE (Phytochemical Society of Europe) Liverpool 02-05 juillet 2018. **Nabiha Benalia**, Sergio Ortiz, Mohamed Kaabeche, Sylvie Miche, Saliha Dahamna and Sabrina Boutefnouchet. « Visualization of radical scavenging compounds from Numidian *Genista* species through molecular networking ».

# SOMMAIRE GENERAL

- ✓ LISTE DES ABREVIATIONS
- ✓ INTRODUCTION GENERALE
- ✓ SECTION I / ETUDE DE GENISTA NUMIDICA SPACH.

## Partie 1 : Recueil bibliographique

Chapitre I : Description de *Genista numidica* Spach

Chapitre II : Contexte écologique du *Genista numidica*

## Partie 2 : Matériels et méthodes

Chapitre I : Matériel et végétal

Chapitre II : Investigation phytochimique du *Genista numidica*

Chapitre III : Dosage et analyses biologiques

Chapitre IV : Analyse du sol des zones d'études

## Partie 3 : Résultats et discussions

Chapitre I : Investigation phytochimique du *Genista numidica*

Chapitre II : Dosage et analyses biologiques

Chapitre III : Analyse du sol des zones d'études

- ✓ SECTION II / ETUDE DE PISTACIA LENTISCUS L.

## Partie 1 : Recueil bibliographique

Chapitre I : Etude caractéristique de *Pistacia lentiscus* L.

Chapitre II : Etude de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.

## Partie 2 : Matériels et méthodes

Chapitre I : Travail prospectif

Chapitre II : Analyse physicochimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque

Chapitre III : Analyses biologiques des huiles de lentisque

## Partie 3 : Résultats et discussions

Chapitre I : Analyses physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

Chapitre II : Activités biologiques

## Liste des abréviations

**mg** : milligramme

**µg** : microgramme

**UV** : Ultraviolet

**NIST**: National Institut of Standards and Technology

**µL** : Microlitre

**m/z** : Masse / charge électrique

**pH** : potentiel d'Hydrogène

**ppm** : Partie par million

### Solvants et réactifs

**ABTS**: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**DPPH** : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

**AcOEt** : acétate d'éthyle

**AlCl<sub>3</sub>** : chlorure d'aluminium

**DMSO** : Diméthyle sulfoxyde

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Acide borique

**HCl** : acide chlorhydrique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : acide sulfurique

**IsoPro** : isopropanol

**MeCN** : acétonitrile

**MeOH** : méthanol

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de sodium anhydre

**KOH** : Hydroxyde de potassium

### Technique chromatographique

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**LC/MS/MS** : Chromatographie Liquide couplée à deux spectrométries de masse

**GC-FID** : Chromatographie Gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

**GC-MS** : Chromatographie Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse

**C18** : Silice greffée

**SiO<sub>2</sub>** : silice normale

**Tr** : temps de rétention

### Détermination structurale

**ESI** : ElectroSprayIonization (ionisation par électrospray)

**SM** : Spectrométrie de Masse

**SAA** : Spectrométrie Absorption Atomique

**UV** : Ultra-Violet

**d** : doublet

**dd** : doublet de doublets

**ddd** : doublet de doublets de doublet

**dl** : doublet large dm doublet de multiplet

**dq** : doublet de quadruplet

**dt** : doublet de triplet

**eq** : équatorial

**COSY**: Correlated Spectroscopy

**HMBC**: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

**HSQC**: Heteronuclear Single Quantum Connectivity

**J (Hz)** : Constante de couplage exprimée en Hertz

**m** : multiplet

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN 13C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone

**RMN1H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

**ROESY**: Rotating Over hauser Effect SpectroscopY

**s**: singulet

**sl**: singulet large

**t**: triplet

**td**: triplet de doublet

**TOCSY** : TOal Correlation SpectroscopY

**δC** : Déplacement chimique du carbone en ppm

**δH** : Déplacement chimique du proton en ppm

**HR** : haute résolution

**λmax** : longueur d'onde maximale

**[α]<sub>D</sub>** : Pouvoir rotatoire

**Hz** : Hertz

### **Activité biologique**

**ATCC** : American type culture collection

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale 50

**TNFα**: Tumor Necrosis Factor-alpha

**ALAT**: Alanine aminotransférase

**ASAT** : Aspartate aminotransférase

**TGP** : Transférase Glutamopyruvate

**OCDE** : Organisation de coopération et de développement économiques

**CHU** : Centre Hospitalo Universitaire.

**M-H** : Mueller-Hinton

**p.c** : poids corporel

**PBS** : Phosphate Buffer Saline, (tampon phosphate salin)

# Introduction générale

### Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir de ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure ses besoins nutritionnels, vestimentaires et médicamenteux. La plante est certainement le premier médicament utilisé par l'homme (Catier et Roux, 2007). En effet, les plantes médicinales constituent une source infinie de substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées, basée sur une diversité importante de métabolites d'origine végétale. Cette diversité est basée sur la capacité des différentes familles botaniques à développer des voies métaboliques spécifiques. Cette spécificité est également définie par la notion de chimiotaxonomie, qui associe des taxons botaniques à des voies métaboliques.

La flore algérienne est caractérisée par une diversité floristique importante, basée sur des zones biogéographiques variées : méditerranéenne, saharienne et paléotropicale. Elle est estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, (Ozenda, 1977). Parmi elles, *Pistacia lentiscus* L. et *Genista numidica* Spach., sont deux espèces communes du littoral algérien.

Cette thèse porte sur l'étude de ces deux espèces, et plus particulièrement dans la région du Nord-Est Algérien, en Numidie. La Numide algérienne au sens des divisions biogéographiques proposées par Quezel et Santa (1962- 1963) s'étend de la longitude de Skikda face à la mer jusqu'à la frontière tunisienne. Elle est délimitée au Nord par la méditerranée et au Sud par les régions de Souk Ahras, Guelma et Constantine. Elle est subdivisée en Numidie orientale et Numidie occidentale séparée par l'Oued Seybouse.

Le choix de ces deux espèces est basé sur leur intérêt en tant que sources de composés bioactifs. En effet, *Pistacia lentiscus* L. possède un usage médicinal commun à tout le bassin méditerranéen. Dans cette région, les différentes parties de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle. Nous avons identifié un usage spécifique de l'huile dans le nord-est algérien. C'est pourquoi ces travaux de thèse ont porté spécifiquement sur l'étude de l'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* L. Les travaux de cette partie de thèse s'inscrivent dans le cadre du programme de recherche européen EXANDAS qui porte sur la valorisation de différentes ressources aromatiques présentes au niveau du bassin méditerranéen.

Pour l'espèce *Genista numidica* Spach, ce choix est basé essentiellement à son rattachement à un genre botanique d'intérêt pour ses métabolites actifs, le genre *Genista*. Ce genre est en effet capable de produire des alcaloïdes et des isoflavones porteurs d'activités biologiques. Le manque d'étude phytochimique sur cette espèce et son caractère endémique à cette région algérienne, nous



a poussé à réaliser des études phytochimiques afin d'identifier les composés produits par cette espèce.

Cette thèse sera donc divisée en deux sections portant sur chacune de ces espèces. L'objectif commun aux deux plantes a été d'identifier les composés bioactifs en vue d'une valorisation de ces espèces dans le domaine de la santé.

# **PREMIERE SECTION**

**ETUDE DE *GENISTA NUMIDICA* SPACH.**

# Sommaire Section I

## PARTIE I : Recueil bibliographique

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Chapitre I : Description de <i>Genista numidica</i> Spach.....                         | 5  |
| 1 L'ordre de Fabales .....                                                             | 5  |
| 1.1 Les Fabaceae .....                                                                 | 5  |
| 1.1.1 Description botanique .....                                                      | 5  |
| 1.1.2 Taxonomie des Fabaceae.....                                                      | 6  |
| 2 Le genre <i>Genista</i> .....                                                        | 7  |
| 2.1 Description botanique et répartition géographique .....                            | 7  |
| 2.1.1 Description botanique .....                                                      | 7  |
| 2.1.2 Répartition géographique .....                                                   | 7  |
| 2.2 Composition phytochimique du genre <i>Genista</i> .....                            | 7  |
| 2.2.1 Isoflavones .....                                                                | 8  |
| 2.2.2 Flavonoïdes.....                                                                 | 9  |
| 2.2.3 Alcaloïdes.....                                                                  | 11 |
| 2.3 Investigation biologique du genre <i>Genista</i> .....                             | 12 |
| 2.3.1 Activité antibactérienne et antifongique.....                                    | 12 |
| 2.3.2 Activité antidiabétique et antioxydante .....                                    | 12 |
| 2.3.3 Cytotoxicité .....                                                               | 12 |
| 3 L'espèce <i>Genista numidica</i> Spach.....                                          | 12 |
| 3.1 Généralités.....                                                                   | 12 |
| 3.2 Répartition géographique de <i>Genista numidica</i> en Algérie.....                | 14 |
| 3.3 Classification taxonomique de <i>Genista numidica</i> Spach .....                  | 15 |
| 3.3.2 Classification phylogéniques selon APG III (2009) (Tison et De Foucault, 2014) . | 15 |
| 3.4 Etude morphologique de <i>Genista numidica</i> Spach. ....                         | 15 |
| 3.4.1 Appareil végétatif .....                                                         | 15 |
| 3.4.2 Appareil reproducteur .....                                                      | 16 |
| 3.5 Etude phytochimique de <i>Genista numidica</i> Spach.....                          | 17 |
| Chapitre II : Contexte écologique du <i>Genista numidica</i> Spach. ....               | 19 |
| 1 Cadre physique et limites géographiques de Jijel et Annaba .....                     | 19 |
| 1.1 La région de Jijel .....                                                           | 19 |
| 1.2 La région d'Annaba .....                                                           | 19 |
| 2 Cadre géologique et géomorphologique de Jijel et Annaba.....                         | 20 |
| 2.1 La région de Jijel .....                                                           | 20 |

|       |                                                                           |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2   | La région d'Annaba .....                                                  | 21 |
| 3     | Cadre climatique de Jijel et Annaba.....                                  | 22 |
| 3.1   | Facteurs climatiques.....                                                 | 22 |
| 3.1.1 | Précipitations et températures .....                                      | 22 |
| 3.2   | Synthèse climatique .....                                                 | 23 |
| 3.2.1 | Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953) .....              | 23 |
| 3.2.2 | Quotient pluviothermique et étages bioclimatiques d'Emberger (1936) ..... | 25 |

## PARTIE II: Matériels et méthodes

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Chapitre I: Matériel végétal.....                                                                                     | 29 |
| 1 Collecte du matériel végétal.....                                                                                   | 29 |
| 1.1 Zones et stations de collecte .....                                                                               | 29 |
| 1.2 Période de collecte .....                                                                                         | 30 |
| 1.3 Plan d'échantillonnage.....                                                                                       | 31 |
| 2 Préparation des échantillons pour l'extraction.....                                                                 | 31 |
| 2.1 Séchage et broyage .....                                                                                          | 31 |
| 3 Identification des spécimens collectés .....                                                                        | 31 |
| 4 Liste des 71 spécimens collectés.....                                                                               | 32 |
| Chapitre II: Investigation phytochimique du <i>Genista numidica</i> Spach.....                                        | 34 |
| 1 Déréplication des extraits de <i>G.numidica</i> .....                                                               | 35 |
| 1.1 Matériel et réactifs.....                                                                                         | 35 |
| 1.2 Déréplication par analyse HPLC-UV-MS/MS .....                                                                     | 36 |
| 1.2.1 Préparation des extraits pour analyse HPLC-UV-MS/MS.....                                                        | 36 |
| 1.2.2 Traitements des données de LC-MS <sup>2</sup> .....                                                             | 40 |
| 1.3 Déréplication par analyse GC-MS .....                                                                             | 42 |
| 1.3.1 Préparation des extraits .....                                                                                  | 42 |
| 1.3.2 Analyse chromatographique par GC-MS .....                                                                       | 44 |
| 2 Analyse par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC).....                                         | 45 |
| 2.1 Condition de mise en œuvre de l'HPTLC .....                                                                       | 46 |
| 2.2 Préparation des extraits méthanoliques de <i>G. numidica</i> ( <i>Precellys</i> ) .....                           | 46 |
| 3 Fractionnement de l'extrait méthanolique de <i>G. numidica</i> par chromatographie de partage centrifuge (CPC)..... | 48 |
| 3.1 Principe de la chromatographie de partage centrifuge (CPC) .....                                                  | 48 |
| 3.2 Mise au point des conditions de séparation par CPC.....                                                           | 50 |

|          |                                                                                                                            |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4</b> | <b>Purification par colonne de chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) des fractions F10 à F12 .....</b>           | <b>51</b> |
| 4.1      | Séparation liquide -liquide des fractions F10 à F12. ....                                                                  | 51        |
| 4.2      | Mise en œuvre de la chromatographie MPLC .....                                                                             | 52        |
| <b>5</b> | <b>Analyse structurale des fractions issues de la MPLC par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....</b> | <b>53</b> |
| <b>6</b> | <b>Visualisation des réseaux moléculaires (Molecular Networking).....</b>                                                  | <b>54</b> |
| 6.1      | Mise en œuvre des réseaux moléculaires .....                                                                               | 55        |
| 6.2      | Acquisition de données.....                                                                                                | 55        |
| 6.3      | Création du fichier MGF .....                                                                                              | 55        |
| 6.4      | Génération des réseaux moléculaires.....                                                                                   | 56        |
| 6.5      | Annotation du réseau moléculaire .....                                                                                     | 57        |
|          | <b>Chapitre III: Dosage et analyses biologiques.....</b>                                                                   | <b>59</b> |
| <b>1</b> | <b>Dosage des composés phénoliques des extraits .....</b>                                                                  | <b>60</b> |
| 1.1      | Extraction des spécimens de <i>G.numidica</i> par (Precellys).....                                                         | 60        |
| 1.2      | Dosage des polyphénols totaux .....                                                                                        | 60        |
| 1.3      | Dosage des flavonoïdes totaux .....                                                                                        | 60        |
| <b>2</b> | <b>Activité antiradicalaire des extraits .....</b>                                                                         | <b>60</b> |
| 2.1      | Activité anti-radicalaire DPPH .....                                                                                       | 60        |
| 2.2      | Activité anti-radicalaire ABTS.....                                                                                        | 60        |
| <b>3</b> | <b>Activité antibactérienne .....</b>                                                                                      | <b>61</b> |
|          | <b>Chapitre IV: Analyses du sol des zones d'études.....</b>                                                                | <b>62</b> |
| <b>1</b> | <b>Analyses physicochimiques du sol.....</b>                                                                               | <b>63</b> |
| 1.1      | Méthode d'échantillonnage.....                                                                                             | 63        |
| 1.2      | Préparation du sol .....                                                                                                   | 63        |
| 1.3      | Analyse granulométrique.....                                                                                               | 63        |
| 1.4      | pH.....                                                                                                                    | 64        |
| 1.5      | Conductivité électrique .....                                                                                              | 64        |
| 1.6      | Matière organique .....                                                                                                    | 65        |
| 1.7      | Calcaire total.....                                                                                                        | 65        |
| 1.8      | Phosphore assimilable .....                                                                                                | 65        |
| <b>2</b> | <b>Dosage de l'azote total et des métaux lourds.....</b>                                                                   | <b>66</b> |
| 2.1      | Dosage de l'azote total.....                                                                                               | 66        |
| 2.2      | Dosage des métaux lourds par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) .....                                               | 66        |

|       |                                                              |    |
|-------|--------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1 | Minéralisation des échantillons de sols .....                | 66 |
| 2.2.2 | Minéralisation de la plante ( <i>Genista numidica</i> )..... | 67 |
| 3     | Analyse des micro-organismes du sol par MALDI-TOF .....      | 67 |
| 3.1   | La spectrométrie de masse MALDI-TOF.....                     | 67 |
| 3.1.1 | Principe.....                                                | 67 |
| 3.2   | Protocole d'isolement des micro-organismes du sol.....       | 69 |
| 3.2.1 | Echantillonnage du sol .....                                 | 69 |
| 3.2.2 | Extraction des micro-organismes du sol.....                  | 69 |
| 3.1.2 | Analyse par MALDI-TOF .....                                  | 72 |

### Partie III: Résultats et discussion

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Chapitre I: Investigation phytochimique du <i>Genista numidica</i> Spach.....                                               | 74  |
| 1 Identification des alcaloïdes chez les spécimens de <i>Genista numidica</i> étudiés.....                                  | 74  |
| 1.1 Identification des alcaloïdes de <i>Genista numidica</i> Spach par déréplication HPLC-UV-MS/MS.....                     | 75  |
| 1.2 Identification des alcaloïdes de <i>Genista numidica</i> Spach par déréplication GC-MS.....                             | 80  |
| 2 Identification des composés phénoliques présents chez les spécimens de <i>Genista numidica</i> étudiés.....               | 86  |
| 2.1 Identification des flavonoïdes et isoflavonoïdes de <i>Genista numidica</i> Spach par déréplication HPLC-UV-MS/MS ..... | 86  |
| 2.2 Analyse par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC).....                                             | 89  |
| 3 Fractionnement de l'extrait MeOH de <i>G. numidica</i> par chromatographie de partage centrifuge (CPC).....               | 92  |
| 4 Purification par colonne de chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) des fractions F10 à F12 .....                 | 93  |
| 5 Elucidation de la structure des composés par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....                  | 94  |
| 6 Analyse par réseaux moléculaire des extraits de <i>G.numidica</i> .....                                                   | 104 |
| 6.1 Annotation des réseaux moléculaires selon la région d'origine.....                                                      | 109 |
| 6.2 Annotation des réseaux moléculaires selon la partie de la plante .....                                                  | 111 |
| 6.2.1 Réseau comparant les parties de plantes pour la région Annaba .....                                                   | 111 |
| 6.2.2 Réseau comparant les parties de plantes pour la région Jijel.....                                                     | 112 |
| Chapitre II : Dosages et analyses biologiques.....                                                                          | 115 |
| 1 Dosage des composés phénoliques.....                                                                                      | 115 |
| 2 Activité antiradicalaire des extraits de <i>Genista numidica</i> .....                                                    | 117 |
| 3 Activité antibactérienne .....                                                                                            | 119 |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Chapitre III : Analyse du sol des zones d'études</b> .....                                                                            | 121 |
| <b>1 Analyses physicochimiques du sol</b> .....                                                                                          | 121 |
| <b>1.1 Analyse granulométrique</b> .....                                                                                                 | 121 |
| <b>1.2 Autres paramètres physicochimiques du sol</b> .....                                                                               | 122 |
| <b>1.2.1 pH</b> .....                                                                                                                    | 122 |
| <b>1.2.2 Conductivité électrique (CE)</b> .....                                                                                          | 122 |
| <b>1.2.3 Matière organique (MO)</b> .....                                                                                                | 122 |
| <b>1.2.4 Calcaire total (CaCO<sub>3</sub>)</b> .....                                                                                     | 123 |
| <b>1.2.5 Phosphore assimilable (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b> .....                                                                    | 123 |
| <b>2 Dosage de l'azote total dans le sol et dans les spécimens de <i>Genista numidica</i></b> .....                                      | 123 |
| <b>3 Dosage des métaux lourds dans le sol et dans la poudre de <i>G.numidica</i> par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)</b> ..... | 124 |
| <b>4 Analyse des micro-organismes du sol par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)</b> .....                                                | 125 |
| <b>4.1 Identification des microorganismes des sols analysés par Maldi-Tof</b> .....                                                      | 127 |
| <b>Conclusions et perspectives de la section I</b> .....                                                                                 | 131 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....                                                                                                 | 132 |
| <b>Annexes</b> .....                                                                                                                     | 138 |

**Liste des tableaux**

|                   |                                                                                                                                                          |            |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tableau 1</b>  | Flavonoïdes et des isoflavonoides identifiés au sein de quelques espèces du genre <i>Genista</i> .                                                       | <b>10</b>  |
| <b>Tableau 2</b>  | Alcaloïdes décrits de quelques espèces du genre <i>Genista</i> .                                                                                         | <b>12</b>  |
| <b>Tableau 3</b>  | Moyennes des températures et précipitations de Jijel (1989-2009).                                                                                        | <b>22</b>  |
| <b>Tableau 4</b>  | Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles de la région d'Annaba (1978-2007).                                                                   | <b>23</b>  |
| <b>Tableau 5</b>  | Valeurs du quotient pluviothermique d'Annaba.                                                                                                            | <b>25</b>  |
| <b>Tableau 6</b>  | Valeurs du quotient pluviothermique de Jijel.                                                                                                            | <b>26</b>  |
| <b>Tableau 7</b>  | Coordonnées GPS des principales stations de la région de Jijel.                                                                                          | <b>30</b>  |
| <b>Tableau 8</b>  | Coordonnées GPS des principales stations de la région d'Annaba.                                                                                          | <b>30</b>  |
| <b>Tableau 9</b>  | Liste des échantillons analysés par LC-MS <sup>2</sup> .                                                                                                 | <b>39</b>  |
| <b>Tableau 10</b> | Echantillons analysés par GC-MS.                                                                                                                         | <b>44</b>  |
| <b>Tableau 11</b> | Liste des échantillons analysés par HPTLC.                                                                                                               | <b>48</b>  |
| <b>Tableau 12</b> | Extraits évalués pour leur activité antibactérienne.                                                                                                     | <b>61</b>  |
| <b>Tableau 13</b> | Identification des échantillons à analyser par Maldi-Tof.                                                                                                | <b>70</b>  |
| <b>Tableau 14</b> | Liste des échantillons analysés par HPLC-UV-MS/MS.                                                                                                       | <b>76</b>  |
| <b>Tableau 15</b> | Temps de rétention, valeurs de m/z des ions parents et fragments des standards et des pics présents sur les chromatogrammes de <i>Genista numidica</i> . | <b>77</b>  |
| <b>Tableau 16</b> | Echantillons analysés par GC-MS.                                                                                                                         | <b>80</b>  |
| <b>Tableau 17</b> | Alcaloïdes identifiés par analyse GC-MS (base NIST) et interprétation des résultats.                                                                     | <b>81</b>  |
| <b>Tableau 18</b> | Temps de rétention, masse et fragment observés pour les témoins et les extraits.                                                                         | <b>87</b>  |
| <b>Tableau 19</b> | Liste des échantillons analysés par HPTLC.                                                                                                               | <b>90</b>  |
| <b>Tableau 20</b> | déplacements chimiques des protons et carbones (ppm) pour le composé.                                                                                    | <b>101</b> |
| <b>Tableau 21</b> | Rappel des identifications issues de la LC-MS <sup>2</sup>                                                                                               | <b>109</b> |
| <b>Tableau 22</b> | Rappel des identifications issues de la GC-MS                                                                                                            | <b>109</b> |
| <b>Tableau 23</b> | Identification des extraits méthanoliques de spécimens de <i>G.numidica</i> provenant des deux régions d'études (Jijel et Annaba).                       | <b>110</b> |



|                   |                                                                                                                                                                                         |            |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tableau 24</b> | Identification des extraits de spécimens de <i>G.numidica</i> de la région d'Annaba.                                                                                                    | <b>111</b> |
| <b>Tableau 25</b> | Identification des extraits de spécimens de <i>G.numidica</i> de la station Laghrifet de la région de Jijel                                                                             | <b>112</b> |
| <b>Tableau 26</b> | Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits MeOH de <i>G.numidica</i> .                                                                                         | <b>115</b> |
| <b>Tableau 27</b> | % d'efficacité du DPPH et ABTS des extraits MeOH de <i>G.numidica</i> .                                                                                                                 | <b>117</b> |
| <b>Tableau 28</b> | Résultats de l'activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques et méthanoliques de <i>G.numidica</i> (200 µg/ml) testé sur les bactéries anaérobies.                                | <b>120</b> |
| <b>Tableau 29</b> | Classes texturales des sols de deux régions d'études (Annaba et Jijel).                                                                                                                 | <b>122</b> |
| <b>Tableau 30</b> | Paramètres d'analyses physico chimiques du sol de deux régions Annaba et Jijel de <i>Genista numidica</i> Spach.                                                                        | <b>122</b> |
| <b>Tableau 31</b> | Taux d'azote et de protéines du sol des deux stations d'étude.                                                                                                                          | <b>123</b> |
| <b>Tableau 32</b> | Dosage des métaux lourds du sol par SAA des deux stations d'études (Annaba et Jijel).                                                                                                   | <b>124</b> |
| <b>Tableau 33</b> | Dosage des métaux lourds par SAA de la poudre de <i>Genista numidica</i> Spach. de deux stations d'études (Annaba et Jijel).                                                            | <b>124</b> |
| <b>Tableau 34</b> | Les échantillons du sol traité et non traité à analyser par Maldi-Tof.                                                                                                                  | <b>125</b> |
| <b>Tableau 35</b> | Résultats positifs des échantillons du sol testés après incubation.                                                                                                                     | <b>125</b> |
| <b>Tableau 36</b> | Score de concordance des spectres obtenus à partir du microorganisme d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification. | <b>128</b> |
| <b>Tableau 37</b> | Description des indices de confiance.                                                                                                                                                   | <b>129</b> |
| <b>Tableau 38</b> | Identification des isolats microbiens par MALDI-TOF MS.                                                                                                                                 | <b>129</b> |

## Liste des figures

|                  |                                                                                                                                          |           |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 1</b>  | Représentation des relations phylogénétiques des Fabacées et leurs alliés.                                                               | <b>06</b> |
| <b>Figure 2</b>  | Principales familles d'alcaloïdes chez les Fabaceae.                                                                                     | <b>11</b> |
| <b>Figure 3</b>  | Habitat de <i>Genista numidica</i> situé dans une colline à Jijel.                                                                       | <b>13</b> |
| <b>Figure 4</b>  | Aire de répartition de <i>Genista numidica</i> ssp <i>numidica</i> dans l'Est Algérien (1/1 000 000 <sup>ème</sup> ).                    | <b>14</b> |
| <b>Figure 5</b>  | La description botanique de <i>Genista numidica</i> Spach selon Maire (1962).                                                            | <b>17</b> |
| <b>Figure 6</b>  | <i>Genista numidica</i> Spach en période de floraison, Jijel (Avril, 2019).                                                              | <b>18</b> |
| <b>Figure 7</b>  | Localisation géographique des zones de collecte Annaba et Jijel (1/50000 <sup>ème</sup> ).                                               | <b>20</b> |
| <b>Figure 8</b>  | Carte géologiques du massif Edough à Annaba (1/200 000), d'après Hilly (1962) tramé in Toubal 1986.                                      | <b>21</b> |
| <b>Figure 9</b>  | Diagramme Ombrothermique Bagnouls et Gaussen de la région d'Annaba pour la période (1978-2007).                                          | <b>24</b> |
| <b>Figure 10</b> | Diagramme Ombrothermique Bagnouls et Gaussen de la région de Jijel (1989-2009).                                                          | <b>24</b> |
| <b>Figure 11</b> | Localisation des deux régions d'études (Jijel et Annaba) dans le Climagramme d'Emberger.                                                 | <b>27</b> |
| <b>Figure 12</b> | Les secteurs phytogéographiques du Nord de l'Algérie (Quézel et Santa, 1962).                                                            | <b>30</b> |
| <b>Figure 13</b> | Protocole d'extraction des spécimens de <i>G.numidica</i> pour LC-MS <sup>2</sup> .                                                      | <b>38</b> |
| <b>Figure 14</b> | Structure chimique des standards (alcaloïdes quinolizidiniques et pipéridiniques).                                                       | <b>39</b> |
| <b>Figure 15</b> | Structure chimique des standards (flavonoïdes et isoflavones).                                                                           | <b>40</b> |
| <b>Figure 16</b> | Interface du logiciel Mass-Hunter.                                                                                                       | <b>41</b> |
| <b>Figure 17</b> | Interface du logiciel Mz-Mine.                                                                                                           | <b>41</b> |
| <b>Figure 18</b> | Protocole d'extraction par macération de <i>Genista numidica</i> Spach. (Jijel et Annaba).                                               | <b>43</b> |
| <b>Figure 19</b> | Modules composant le système HPTLC Camag.                                                                                                | <b>45</b> |
| <b>Figure 20</b> | Protocole d'extraction par Precellys des spécimens de <i>G.numidica</i> (Jijel et Annaba).                                               | <b>47</b> |
| <b>Figure 21</b> | Chromatographie de partage centrifuge modèle rotor 250 mL et 1L (Armen instrument SCPC-250+1000-B et collecteur de fractions BUCHI-684). | <b>49</b> |
| <b>Figure 22</b> | Représentation schématique des deux modes d'élutions en CPC.                                                                             | <b>50</b> |
| <b>Figure 23</b> | Protocole d'extraction liquide -liquide pour MPLC.                                                                                       | <b>52</b> |
| <b>Figure 24</b> | MPLC à gradient (Buchi, modèle C-615).                                                                                                   | <b>53</b> |
| <b>Figure 25</b> | Spectromètre de RMN Bruker Avance III HD 400 MHz.                                                                                        | <b>53</b> |
| <b>Figure 26</b> | Les principales étapes de la création des réseaux moléculaires.                                                                          | <b>54</b> |
| <b>Figure 27</b> | Bases de calcul du paramètre « Cosine ».                                                                                                 | <b>56</b> |
| <b>Figure 28</b> | Exemple de réseau issu de l'analyse par Cytoscape de chromatogrammes rattachés à des groupes différents                                  | <b>57</b> |
| <b>Figure 29</b> | Spectromètre de masse MALDI-TOF laboratoire de la microbiologie (CRAPC).                                                                 | <b>67</b> |
| <b>Figure 30</b> | Principe d'ionisation par la technique MALDI.                                                                                            | <b>68</b> |

|                  |                                                                                                                                                                                                                     |            |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 31</b> | Dilution de la suspension du sol (isolement des microorganismes).                                                                                                                                                   | <b>70</b>  |
| <b>Figure 32</b> | Protocole d'isolement des microorganismes du sol de <i>G.numidica</i> (Annaba et Jijel).                                                                                                                            | <b>71</b>  |
| <b>Figure 33</b> | Photo de la cible du Maldi-Tof (CRAPC).                                                                                                                                                                             | <b>72</b>  |
| <b>Figure 34</b> | Principales classes d'alcaloïdes issus de la lysine retrouvées chez les Fabaceae.                                                                                                                                   | <b>74</b>  |
| <b>Figure 35</b> | Structure des standards utilisés.                                                                                                                                                                                   | <b>75</b>  |
| <b>Figure 36</b> | Schéma de fragmentation des alcaloïdes quinolizidiniques.                                                                                                                                                           | <b>78</b>  |
| <b>Figure 37</b> | Pic A+B (Tr=0,96, m/z=251,2125 et m/z 191,1149), pic C et D (Tr=1,39, m/z 245,1700 et m/z=235,2225), issus du chromatogramme de l'échantillon 7 (Logiciel Mz-mine 2,53).                                            | <b>78</b>  |
| <b>Figure 38</b> | Visualisation 3D des chromatogrammes d'extraits de fleurs (4,7,10,13), feuilles (5,8,11,14) et tiges (6,9,12,15) – Jijel Station 2, Annaba station 2, Annaba station 3, Annaba station 4 - (Logiciel Mz-mine 2.53). | <b>79</b>  |
| <b>Figure 39</b> | Structure des alcaloïdes identifiés.                                                                                                                                                                                | <b>85</b>  |
| <b>Figure 40</b> | Standard des flavonoïdes et isoflavonoides utilisés pour la déréplication HPLC-UV-MS/MS.                                                                                                                            | <b>86</b>  |
| <b>Figure 41</b> | Chromatogrammes comparatifs des extraits analysés.                                                                                                                                                                  | <b>88</b>  |
| <b>Figure 42</b> | Schéma de fragmentation des flavonoïdes et isoflavones témoins.                                                                                                                                                     | <b>89</b>  |
| <b>Figure 43</b> | Plaque HPTLC des extraits de <i>Genista numidica</i> dans le visible.                                                                                                                                               | <b>91</b>  |
| <b>Figure 44</b> | Plaque HPTLC des extraits de <i>Genista numidica</i> sous UV à 254 nm.                                                                                                                                              | <b>91</b>  |
| <b>Figure 45</b> | Plaque HPTLC des extraits sous UV à 366 nm.                                                                                                                                                                         | <b>91</b>  |
| <b>Figure 46</b> | Fractions issues de la CPC.                                                                                                                                                                                         | <b>92</b>  |
| <b>Figure 47</b> | Protocole d'extraction liquide- liquide des fractions F10-F12 d'extrait méthanolique de <i>G. numidica</i> .                                                                                                        | <b>93</b>  |
| <b>Figure 48</b> | Chromatographie couche mince des fractions issues de la MPLC.                                                                                                                                                       | <b>94</b>  |
| <b>Figure 49</b> | Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup> H des fractions 16 à 20.                                                                                                                                                  | <b>95</b>  |
| <b>Figure 50</b> | Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction 16.                                                                                                                                                                       | <b>95</b>  |
| <b>Figure 51</b> | Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction 16, déplacements en ppm.                                                                                                                                                  | <b>96</b>  |
| <b>Figure 52</b> | Spectre RMN <sup>1</sup> H de la fraction 16, déplacements en hertz.                                                                                                                                                | <b>96</b>  |
| <b>Figure 53</b> | Spectres cosy de la fraction 16.                                                                                                                                                                                    | <b>97</b>  |
| <b>Figure 54</b> | Spectres HSQC de la fraction 16.                                                                                                                                                                                    | <b>97</b>  |
| <b>Figure 55</b> | Fragments du composé 16.                                                                                                                                                                                            | <b>99</b>  |
| <b>Figure 56</b> | Spectre Carbone 13 de la fraction 16.                                                                                                                                                                               | <b>99</b>  |
| <b>Figure 57</b> | Spectre HMBC de la fraction 16.                                                                                                                                                                                     | <b>100</b> |
| <b>Figure 58</b> | structure proposée pour le composé 16.                                                                                                                                                                              | <b>101</b> |
| <b>Figure 59</b> | Spectre MS de la fraction 16 mode négatif [MH] <sup>-</sup> : m/z = 417.                                                                                                                                            | <b>102</b> |
| <b>Figure 60</b> | Spectre de masse de la fraction 16 mode positif [MNa] <sup>+</sup> : m/z = 441.                                                                                                                                     | <b>103</b> |
| <b>Figure 61</b> | Spectre MS de la fraction 17 mode négatif [MH] <sup>-</sup> : m/z = 417.                                                                                                                                            | <b>103</b> |
| <b>Figure 62</b> | Spectre de masse de la fraction 17 mode positif [MNa] <sup>+</sup> : m/z = 441.                                                                                                                                     | <b>104</b> |
| <b>Figure 63</b> | Méthode d'obtention des réseaux moléculaires.                                                                                                                                                                       | <b>105</b> |
| <b>Figure 64</b> | Réseau comparant l'ensemble des extraits issus des deux stations (Annaba et Jijel).                                                                                                                                 | <b>110</b> |
| <b>Figure 65</b> | Séparation de la suspension limono-argileuse par la pipette de robinson (BNEDER).                                                                                                                                   | <b>121</b> |

|                  |                                                            |            |
|------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 66</b> | Résultats positif du milieu BENNETT.                       | <b>126</b> |
| <b>Figure 67</b> | Résultats négatif du milieu sabouraud et gélose nutritive. | <b>126</b> |

**Première partie :**  
**Recueil bibliographique**

## Chapitre I : Description de *Genista numidica* Spach.

*Genista numidica* Spach est une espèce de la famille des Fabaceae, rattaché à l'ordre des Fabales. Cette espèce est endémique d'Algérie où cependant d'autres espèces du même genre sont présentes. Cette espèce a fait l'objet de peu d'études, alors que le genre *Genista* est capable de produire des métabolites d'intérêt biologique. La description de *Genista numidica* Spach. comportera son positionnement dans la classification phylogénétique ainsi que les principaux composés produits par le genre *Genista* et potentiellement présents chez *Genista numidica* Spach.

### 1 L'ordre de Fabales

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 19 000 espèces. Les familles principales sont les Fabaceae, les Polygalaceae, les Surianaceae. Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétale *Genista numidica* que nous avons étudiée (Judd et al., 2002).

#### 1.1 Les Fabaceae

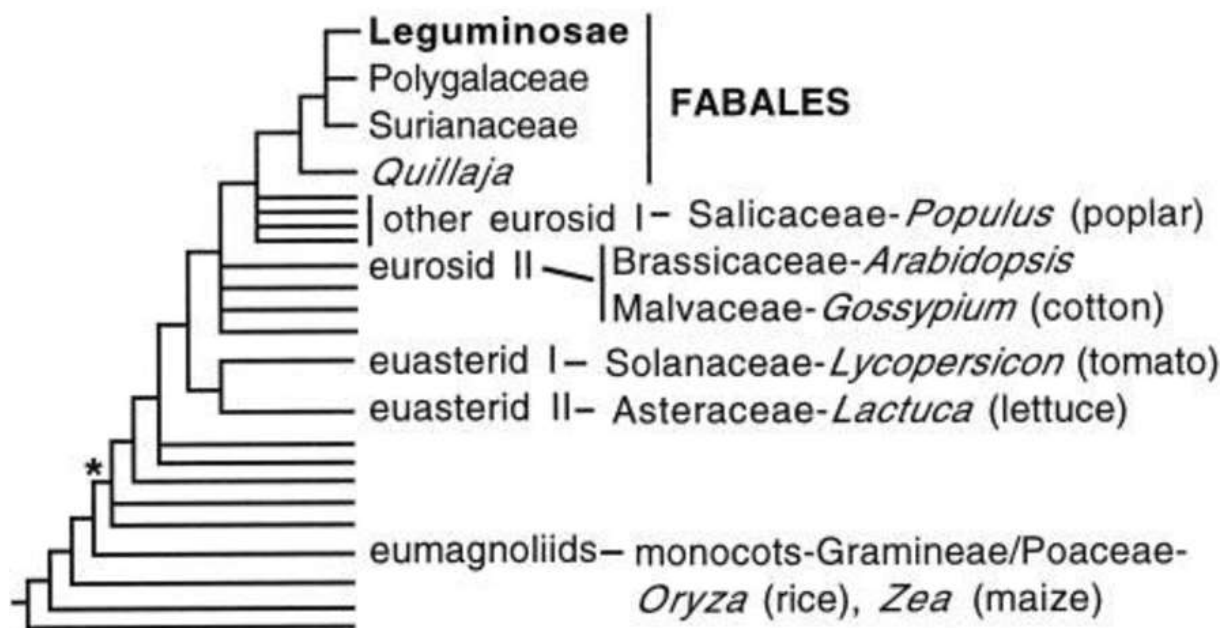
##### 1.1.1 Description botanique

Les plantes Fabaceae sont généralement de plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*). Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques. La longueur des poils est variable et les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Elles sont entières à parfois dentées serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Ces plantes sont constituées de renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines. Les inflorescences sont presque toujours indéterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement au nombre de 5, libres ou soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différent par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs étant souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10, abritées dans le

périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes. Les grains de pollen sont tricolporés, tricolpés, ou triporés, généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle est souvent unique, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore. L'ovaire est supère, à placentation pariétale. Le fruit est généralement une gousse, 16 parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscence, un akène, une drupe ou une baie (Spichiger et al., 2002).

### 1.1.2 Taxonomie des Fabaceae

Taxonomiquement, les Fabacées ont été traditionnellement divisées en trois sous familles, les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (Papilionoideae) (quoique souvent ces sous familles sont considérées maintenant comme étant largement séparées), et sont considérées plus liées aux Connaraceae et aux Sapindaceae qu'aux Polygalaceae et Surianaceae. En se basant sur l'anatomie, la morphologie, et sur leur distribution biogéographique (Polhill, 1981 ; Doyle et Lucow, 2003)



**Figure 1 :** Représentation des relations phylogénétiques des Fabacées et leurs alliés (clade des Fabales, eurosid I, APG II (2002), Fabids APG III (2009) avec les autres clades majeurs de plantes à fleurs. L'arbre est tiré à partir de (Soltis et al. 2000).

## **2 Le genre *Genista***

### **2.1 Description botanique et répartition géographique**

#### **2.1.1 Description botanique**

Parmi les 700 genres de la famille des Fabaceae, environ 53 genres et 337 espèces sont trouvés en Algérie. Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par Linné en 1753, il appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille des Papilionaceae et à la tribu des Genisteae, ce genre se distingue par ses effectifs élevés d'espèces, sous espèces et ces variétés endémiques et rares (Maire, 1987).

D'après Quézel et Santa, (Quezel, Santa, 1962), *Genista* est d'une façon générale un arbuste à calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, plus rarement le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit, les 10 étamines sont monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscence, variable. Les arbrisseaux sont épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Les feuilles sont composées de 1 à 3 paires de folioles stipulées ou non, graines non arillées.

#### **2.1.2 Répartition géographique**

Le genre *Genista* est composé de 100 espèces distribuées dans le bassin méditerranéen, en Europe, en Afrique du Nord (Libye, Tunisie, Algérie et Maroc) et en Asie de l'Ouest (Noccioli et al., 2011). Parmi ces espèces, 23 sont présentes en Algérie, dont 11 endémiques situées dans la région Est et Sud Est et au grand Sahara (Quezel et Santa, 1963).

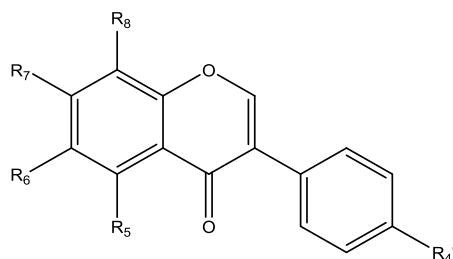
### **2.2 Composition phytochimique du genre *Genista***

Les études phytochimiques antérieures sur le genre *Genista* indiquent la présence d'une part d'alcaloïdes quinolizidiniques et pipéridiniques (Martins et al., 2005 ; Pistelli et al., 2001 ; Kacem et al., 2014), et d'autre part, de flavonoïdes et isoflavonoïdes (Giachi et al., 2009 ; Venditti et al., 2019), qui sont des marqueurs chimiotaxonomiques du genre (Harborne, 1994). La présence de saponines (Boutaghane, 2013) et de sesquiterpènes (Kacem, 2016) est également rapportée.

Pour le genre *Genista*, 56 composés sont répertoriés dans le Dictionnaire des produits naturels : des flavonoïdes, des isoflavones, des alcaloïdes et des triterpènes. Les composés phénoliques sont présentés ci-dessous.

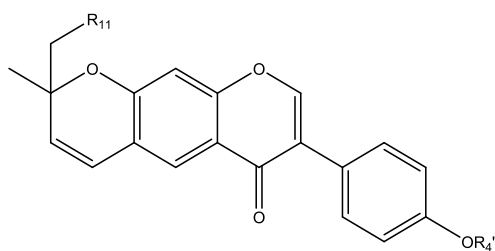


### 2.2.1 Isoflavones

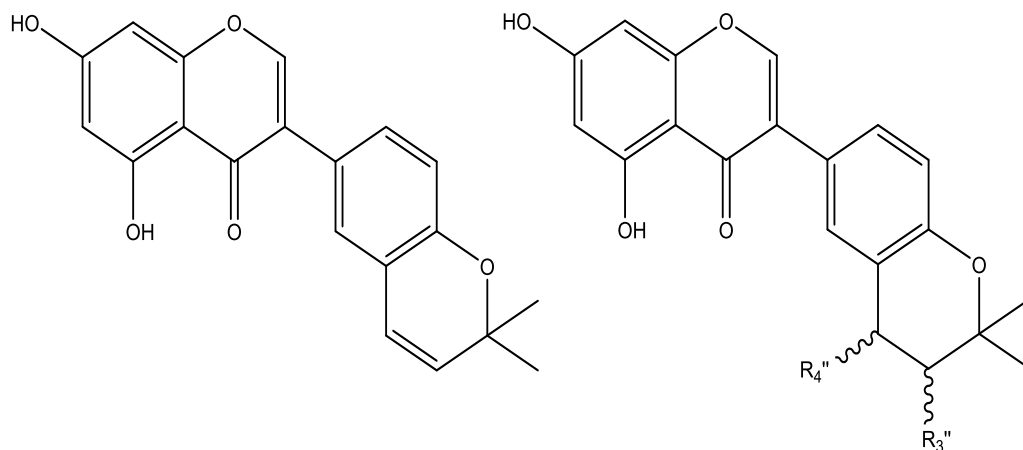


| Nom                                                                                                                              | R5               | R6 | R7               | R8      | R4'              | Formule brute                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----|------------------|---------|------------------|-------------------------------------------------|
| 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone                                                                                               | OH               | H  | OCH <sub>3</sub> | H       | OH               | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  |
| 4',7-Dihydroxy-5-methoxyisoflavone                                                                                               | OCH <sub>3</sub> | H  | OH               | H       | OH               | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  |
| 4',5-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone; 4'-O-β-D-Glucopyranoside                                                                     | OH               | H  | OCH <sub>3</sub> | H       | O-β-D-Glc        | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> |
| 8-C-β-D-Glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyisoflavone(=8-C-β-glucopyranosyl-génistéine                                              | OH               | H  | OH               | β-D-Glc | OH               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> |
| 8-C-β-D-Glucopyranosyl-4',5,7trihydroxyisoflavone; 5-Me ether (= 5-O-Methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine <b>5OMeC8CG</b> ) | OCH <sub>3</sub> | H  | OH               | β-D-Glc | OH               | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> |
| 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone; 7-O-β-D-glucopyranoside                                                                          | H                | H  | O-β-D-Glc        | H       | OCH <sub>3</sub> | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  |

#### ➤ Isoflavones prénylées

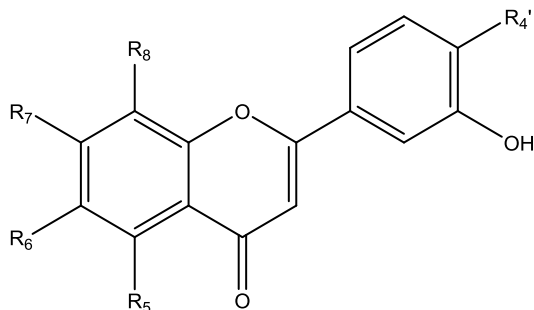


| Nom                                          | R4'  | R11                | Formule brute                                   |
|----------------------------------------------|------|--------------------|-------------------------------------------------|
| Alpinumisoflavone ; 11-hydroxy(2)            | -H   | CH <sub>2</sub> OH | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>  |
| Alpinumisoflavone ; 4'-O-β-D-glucopyranoside | -Glc | CH <sub>3</sub>    | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub> |



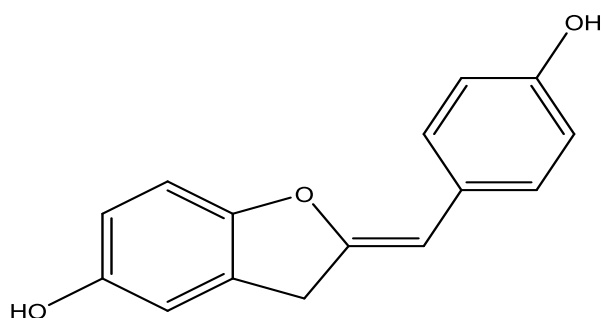
| Nom                                        | R3''  | R4'' | Formule brute                                  |
|--------------------------------------------|-------|------|------------------------------------------------|
| Isoderrone                                 | CH=CH |      | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> |
| Isoderrone;3',4'-Dihydro,3'S,4'R-dihydroxy | OH    | OH   | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> |
| Ficusoflavone                              | OH    | H    | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> |

## 2.2.2 Flavonoïdes



| Nom                                                                            | R5 | R6 | R7 | R8      | R4'       | Formule brute                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|---------|-----------|-------------------------------------------------|
| 8-C-β-D-Glucopyranosyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavone; 4'-O-β-D-Glucopyranoside | OH | H  | OH | β-D-Glc | O-β-D-Glc | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> |

## ➤ Aurones



| Nom                             | Formule brute                                  |
|---------------------------------|------------------------------------------------|
| 4',6-Dihydroxyaurone ; (Z)-form | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> |

D'autres flavonoïdes et isoflavonoïdes (Tableau ci-dessous) sont également présents dans d'autres espèces du genre *Genista*.

**Tableau 1** : Flavonoïdes et des isoflavonoïdes identifiés au sein de quelques espèces du genre *Genista*.

| Espèce                          | Molécules identifiées                                                          | Références              |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>Genista cineria</i>          | 8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine, 6-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine           | Van Rensen et al., 1996 |
| <i>Genista corcica</i>          | Daidzéine, Isoprunétine, 5-methoxytoxifoline, lutéoline, isoderrone.           | Pistelli et al., 2000   |
| <i>Genista pichisermolliana</i> | 4-O-β-D-glucopyranosyl-alpinumisoflavone                                       | Noccioli et al., 2011   |
| <i>Genista moricii</i>          | Daidzeine, génistéine, isoprunetine, 7-O-β-D-glucopyranosyl-lutéoline          | Giachi et al., 2002     |
| <i>Genista tenera</i>           | 7-O-β-D-glucopyranosyl-génistéine, 7-O-β-D-glucopyranosyl-lutéoline, lutéoline | Rauter et al., 2005     |
| <i>Genista saharea</i>          | 5-O-Methoxy-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine                                  | Mekkiou et al., 2005    |
| <i>Genista cilentina</i>        | Génistéine, lutéoline, apigénine, isoliquiritigénine.                          | Venditti et al., 2019   |

### 2.2.3 Alcaloïdes

Les principales classes d'alcaloïdes présents chez les Fabaceae sont les alcaloïdes dérivés de la lysine : alcaloïdes pipéridiniques, quinolizidiniques et indolizidiniques, mais également ceux dérivés de l'ornithine : alcaloïdes pyrrolizidiniques.

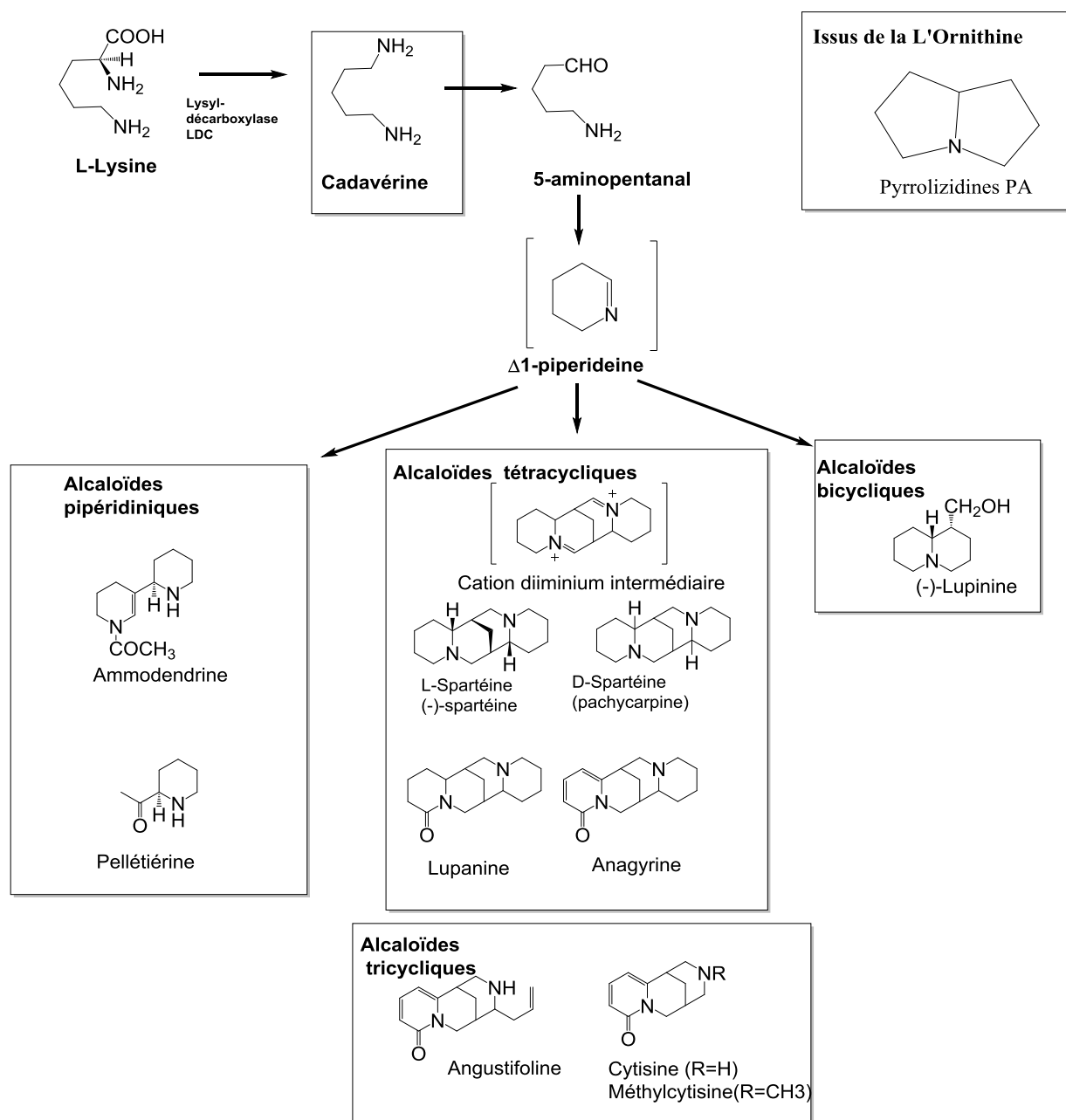


Figure 2 : Principales familles d'alcaloïdes chez les Fabaceae.

**Tableau 2 :** Alcaloïdes décrits de quelques espèces du genre *Genista*.

| Espèce                     | Molécules identifiées                                                                                                           | Références            |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Genista quadriflora</i> | N-méthylpelletierine, pelletierine, N-méthylammodendrine, hystrine, spartéine, baptifoline, 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine | Kacem et al., 2014    |
| <i>Genista ephedroides</i> | Rétamine, lupanine, anagrine, 12- $\alpha$ -hydroxylupanine, 17-oxorétamine                                                     | Pistelli et al., 2001 |
| <i>Genista lobelii</i>     | Spartéine, ammodendrine, cytisine, lupanine, anagrine                                                                           | Kirch et al., 1995    |

## 2.3 Investigation biologique du genre *Genista*

### 2.3.1 Activité antibactérienne et antifongique

Kacem et al 2016 ont montré une activité antifongique marquée de l'huile essentielle de *Genista quadriflora* contre *Fusarium oxysporum* et une activité antibactérienne importante contre *Staphylococcus aureus* (CMI : 0,9 0,1 et 1,7 0,3 mg/ml).

### 2.3.2 Activité antidiabétique et antioxydante

Rauter et al., 2005 ont montré que l'extrait butanolique des parties aériennes de *Genista tenera*, provoque une diminution de la glycémie post-prandiale de 62,5% chez les rats traités par une dose de 200 mg/kg, dès le 7ème jour de traitement. Cette étude montre également une activité antioxydante et antiacétylcholinésterase de l'extrait butanolique de *Genista tenera*.

### 2.3.3 Cytotoxicité

Les résultats de l'étude réalisée par Rigano et al (2009), ont montré que les extraits méthanoliques de *Genista tinctoria* et *Genista sessilifolia* inhibent la croissance des cellules de mélanome humain M14 (Rigano et al., 2009).

## 3 L'espèce *Genista numidica* Spach.

### 3.1 Généralités

*Genista numidica* Spach est endémique au Nord- Est Algérien, en Numidie. La Numide algérienne au sens des divisions biogéographiques proposées par Quezel et Santa (1962- 1963) s'étend de la longitude de Skikda face à la mer jusqu'à la frontière tunisienne. Elle est délimitée au Nord par la méditerranée et au Sud par les régions de Souk Ahras, Guelma et Constantine. Elle est subdivisée en Numidie orientale et Numidie occidentale séparée par l'Oued Seybouse.

A partir des données disponibles dans la bibliographie, la petite Kabylie et la grande Kabylie font partie des secteurs les plus remarquables pour l'endémisme. En ce qui concerne les espèces rares, la Numidie littorale arrive en tête. L'ensemble de « Kabylies-Numidie-Kroumirie » forme un point chaud régional méconnu, constitué de forêts, de montagnes et d'écosystèmes littoraux (Véla et Benhouhou, 2007). D'après la flore de Quézel et Santa (1962-1963) et Maire (1987), *Genista numidica* fait partie des secteurs Kabylies-Numidie littorale. On peut résumer les autres caractéristiques de l'espèce *Genista numidica* comme suit :

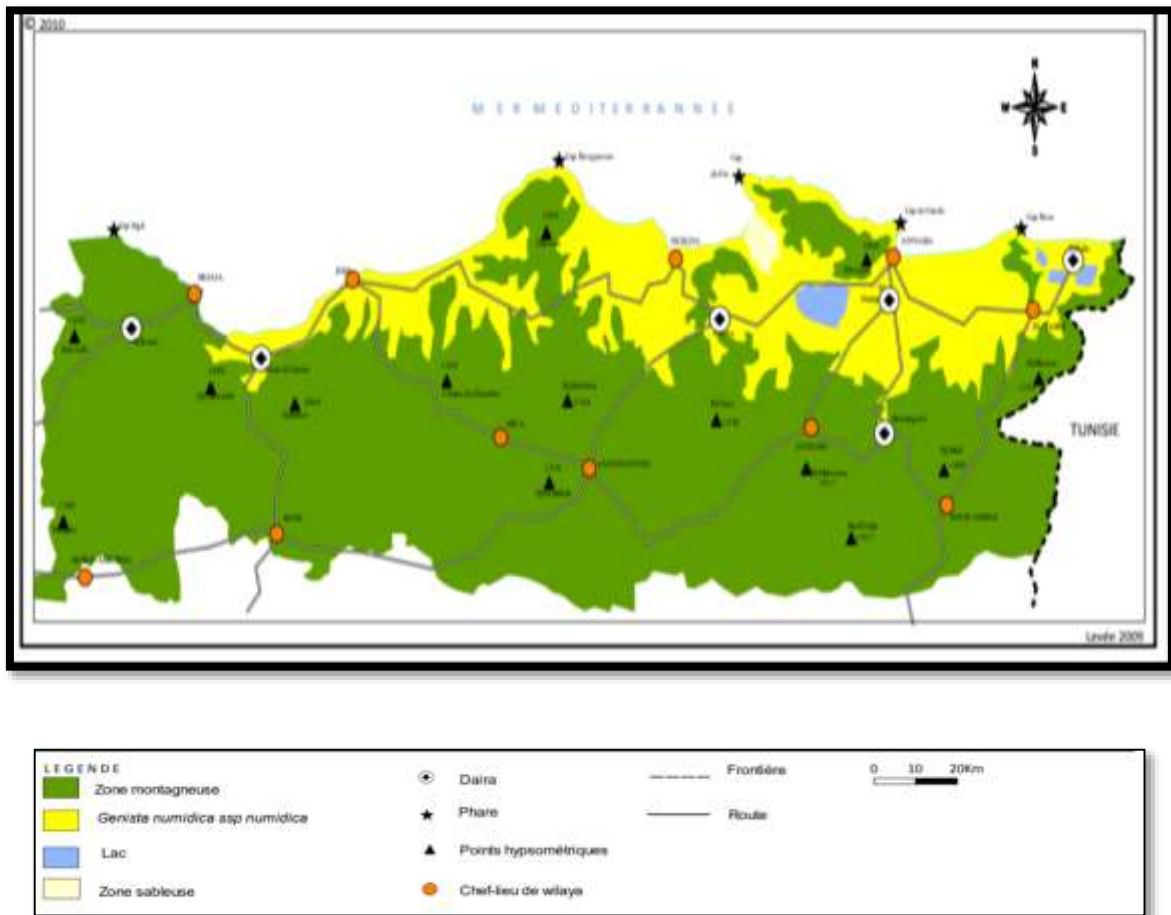
- Floraison : **Mai-Juin.**
- Ecologie : D'après Quézel et Santa (1962-1963), *Genista numidica* se développe en forêts claires, broussailles, rochers des plaines, des collines et des basses montagnes dans les régions bien arrosées et semi-arides (Figure 1).
- Nom vernaculaire : En français Genêt de Numidie et en arabe Teq-taq.



**Figure 3 :** Habitat de *Genista numidica* situé dans une colline à Jijel (Avril, 2019).

### 3.2 Répartition géographique de *Genista numidica* en Algérie

*Genista numidica* est rare dans les Sahels littoraux oranais mais, assez commun en Numidie et dans l'atlas Tellien algérois. D'après la carte réalisée par Ati (2009), *Genista numidica* se situe entre 0-500 m d'altitude et ceinture la chaîne montagneuse depuis El Kala jusqu'à Béjaïa.



**Figure 4 :** Aire de répartition de *Genista numidica* ssp *numidica* dans l'Est Algérien

(1/1 000 000<sup>ème</sup>) (ATI Samira et Toubal Oumessaad ,2009).

**3.3 Classification taxonomique du *Genista numidica* Spach.**

**3.3.1 Classification phylogénétique selon APG III (2009) (Tison et De Foucault, 2014)**

Domaine : **Biota**

Règne : **Plantae** (Haechel, 1866)

Sous règne : **Viridae plantae**

Infra-Règne: **Streptophyta** (John, Williamson and Guiry, 2011)

Classe : **Equisetopsida** (C.Agardh, 1825)

Clade : **Tracheophyta** (Sinnottex Cavalier-Smith, 1988)

Clade : **Spermatophyta**

Sous-Classe : **Magnoliidae** (Novak ex Takht., 1967)

Super-Ordre : **Rosanae** (Takht., 1967)

Ordre : **Fabales** (Bromhead, 1838)

Famille : **Fabaceae** (Lindl., 1836)

Sous-Famille : **Papilionoideae** (DC., 1825)

Super-Tribu: **Genistoids**

Tribu: **Genisteae** (Bronn, 1827)

Genre: ***Genista*** (L., 1753)

Espèce: ***Genista numidica* Spach. 1844**

**3.4 Etude morphologique de *Genista numidica* Spach (Quézel et Santa, 1963)**

**3.4.1 Appareil végétatif**

**3.4.1.1 Port**

C'est un arbrisseau ou un arbuste de 0,6-2,5 m de hauteur, dressé, buissonnant, vert, à rameaux cylindriques, dressés, pubescents-soyeux dans la jeunesse, puis glabrescents, feuillés puis nu

**3.4.1.2 Tige**

Tiges à feuilles persistantes, les inférieures trifoliolées à folioles longues de 8-12 mm.

**3.4.1.3 Feuille**

Les feuilles inférieures sont trifoliolées, les supérieures sont unifoliolées, toutes sub-sessiles. Les folioles de 5-13 mm de long, sont linéaires, lancéolées ou spatulées, entières, glabres sur la face supérieure et pubescentes soyeuses sur la face inférieure.



### **3.4.2 Appareil reproducteur**

#### **3.4.2.1 Inflorescence**

Elle est en grappe terminale de 5-30 flores, courte et dense.

#### **3.4.2.2 Fleur**

Fleurs jaune d'or, 10-11 mm de long., étalées ou étalées-dressées. Calice persistant, nettement bilabié, 3-5 cm de long., ± densément villeux-soyeux, à poils ordinairement apprimés, rarement ± étalés-dressés ; tube calicinal un peu atténué ou brusquement arrondi-subombiliqué à la base, 12-18-nerviés ; lèvres ± inégales ; labre divisé jusqu'à la base en 2 segments ovales, aigus ou ± longuement acuminés ; labiole ordinairement nettement plus long que le labre, tridenté, à dents ordinairement un peu inégales et courtes, triangulaires ou sub-linéaires, ± aiguës.

- Calice : fortement bilabié, lèvre supérieure à 2 dents triangulaires, l'inférieure à 3 dents sétacées. et persistant de 3-5cm de long, plus ou moins densément villeux soyeux.
- Corolle : velue soyeuse extérieurement
- Etendard de 8-9 mm de long et largement ovale, de 5mm de large et les ailes sont un peu plus courtes, de 8 mm de long, oblongues cultriformes et glabres
- Carène : est de 10-11 mm de long, oblongue cultriforme, droite, dressée, villeuse-soyeuse et argentée sur le dos.
  - ✓ Androcée : les étamines sont concrescentes en gaine fermée. L'ovaire est sessile, 4-8 ovulé, lancéolé et villeux.

#### **3.4.2.3 La gousse**

Elle est courte, ovoïde dépassant à peine le calice en général monosperme. Elle est villeuse-tomentueuse, rarement glabre, brune ou noirâtre.

#### **3.4.2.4 graine**

Elle est ovoïde-comprimée, lisse et luisante.



**Figure 5 :**(a) Description botanique de *Genista numidica* Spach selon Maire (1 : Fleur et pièces florales ; 2 : gynécées ; 3 : gousse) (1962) – (b) Planche du muséum national d’histoire naturelle – Paris.



**Figure 6 :** *Genista numidica* Spach en période de floraison, Jijel (Avril, 2019).

### 3.5 Etude phytochimique de *Genista numidica* Spach.

Une seule étude phytochimique porte sur *Genista numidica* Spach. Elle rapporte essentiellement la présence de saponines dont la kaikasaponine, la kudzusaponine, la

soyasaponine I (Boutaghane, 2019). Par ailleurs, cette étude décrit la présence de néoliquiritine, de 7-O- $\beta$ -d-glucopyranosyl-4' dihydroxyflavone, de cynaroside, de génistéine, de 4',7-di-O- $\beta$ -d-glucopyranosyl-5-O-methylgénistéine et plusieurs autres composés.

## **CHAPITRE II : Contexte écologique du *Genista numidica* Spach.**

La définition du contexte écologique, en tant que composante abiotique de l'habitat de *Genista numidica*, se fera sur la base de l'analyse de divers éléments (cadre géographique, géologique et climatique). Dans ce contexte, nous avons choisi deux régions d'études : Annaba et Jijel comme biotopes de *Genista numidica* Spach.

### **1 Cadre physique et limites géographiques de Jijel et Annaba**

#### **1.1 La région de Jijel**

La région de Jijel fait partie du tell algérien, elle est située au Nord-Est entre les latitudes 36° 10 et 36° 50 Nord et les longitudes 5° 25 et 6° 30 Est (Figure 07).

Le territoire de la wilaya dont la superficie s'élève à 2396 km<sup>2</sup> est bordé :

- Au Nord par la méditerranée.
- Au Sud par la wilaya de Mila.
- Au Sud-Est par la wilaya de Constantine.
- Au Sud-Ouest par la wilaya de Sétif, la wilaya de Skikda délimite la partie Est, tandis que celle de Bejaia borde la partie Ouest. Administrativement la wilaya de Jijel compte 28 communes organisées en 11 Daïra (Anonyme, 1997).

#### **1.2 La région d'Annaba**

La wilaya d'Annaba borde la partie nord-orientale du Tell algérien, Située au Nord-Est du pays, elle occupe une position stratégique, faisant face à la mer sur une bande littorale de plus de 16 km, totalisant de ce fait une superficie cadastrale de 1,412 km<sup>2</sup> soit 0,06% du territoire national (Figure 07).

La wilaya d'Annaba est constituée de six Daïras autour desquelles gravitent 12 communes, dont 05 urbaines, en l'occurrence : Annaba, El Bouni, Sidi Amar, El Hadjar et Berrahal. Elle est comprise entre les latitudes Nord (36°30) et (37°30) et les longitudes (08°40) Est. Du point de vue géographique elle est limitée :

- Au Nord par la mer Méditerranée.
- Au Sud par la wilaya de Guelma.
- A l'Est par la wilaya d'El Tarf.
- A l'Ouest par la wilaya de Skikda.

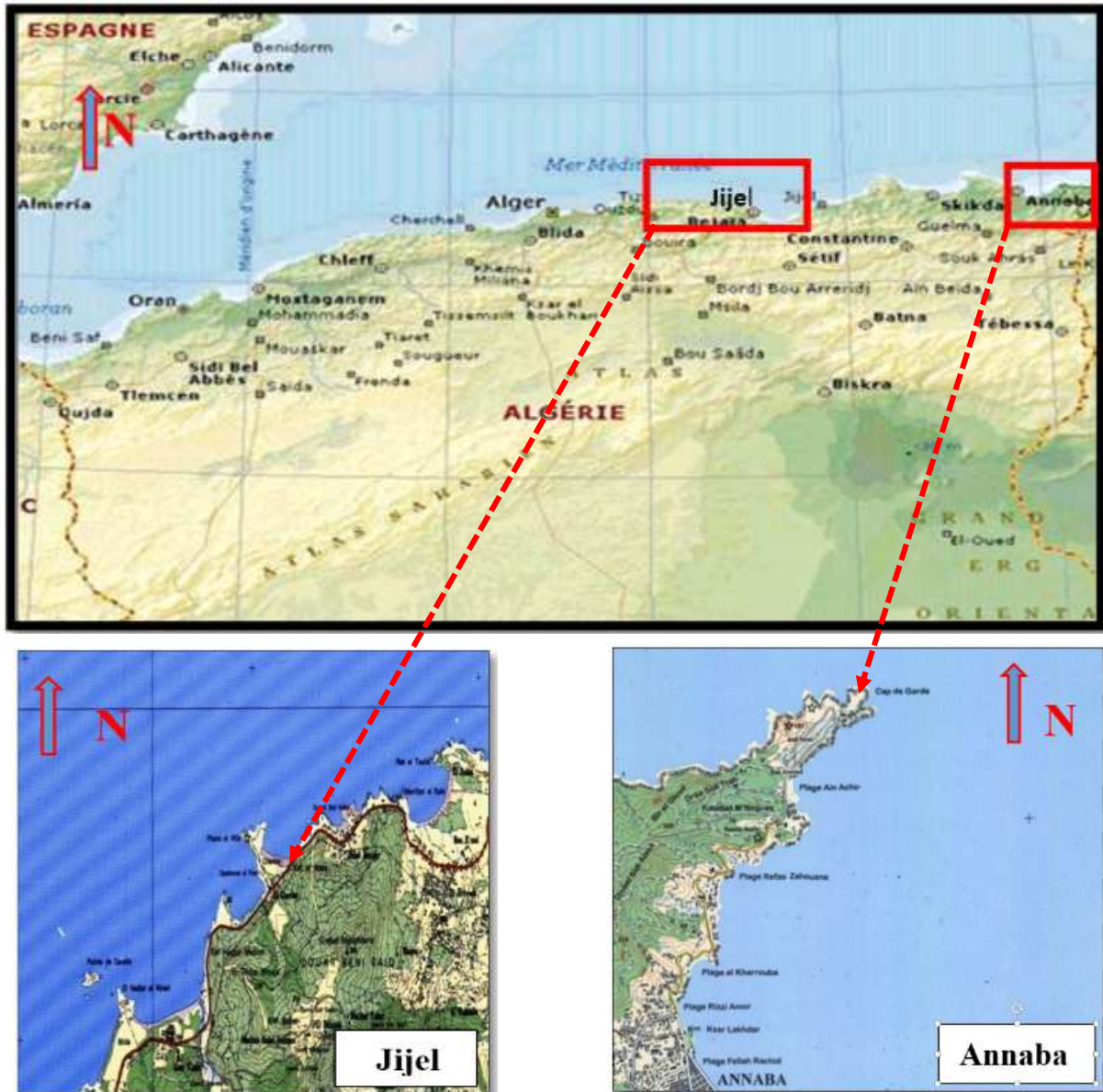


Figure 7 : Localisation géographique des zones de collecte Annaba et Jijel (1/50000<sup>ème</sup>).

## 2 Cadre géologique et géomorphologique de Jijel et Annaba

### 2.1 La région de Jijel

La région de Jijel présente un relief montagneux très complexé dans sa structure et sa morphologie. Jijel est caractérisée par un grand massif montagneux, par un ensemble collinaire et par des étendues de plaines côtières et de vallées. Ce territoire est subdivisé en trois principaux secteurs :

- La Kabylie de Babors qui correspond à tout le territoire côtier occidental et s'étend jusqu'à la limite Sud-Ouest de Jijel.
- La Kabylie de Collo qui correspond au secteur oriental et les monts de Tamesguida.

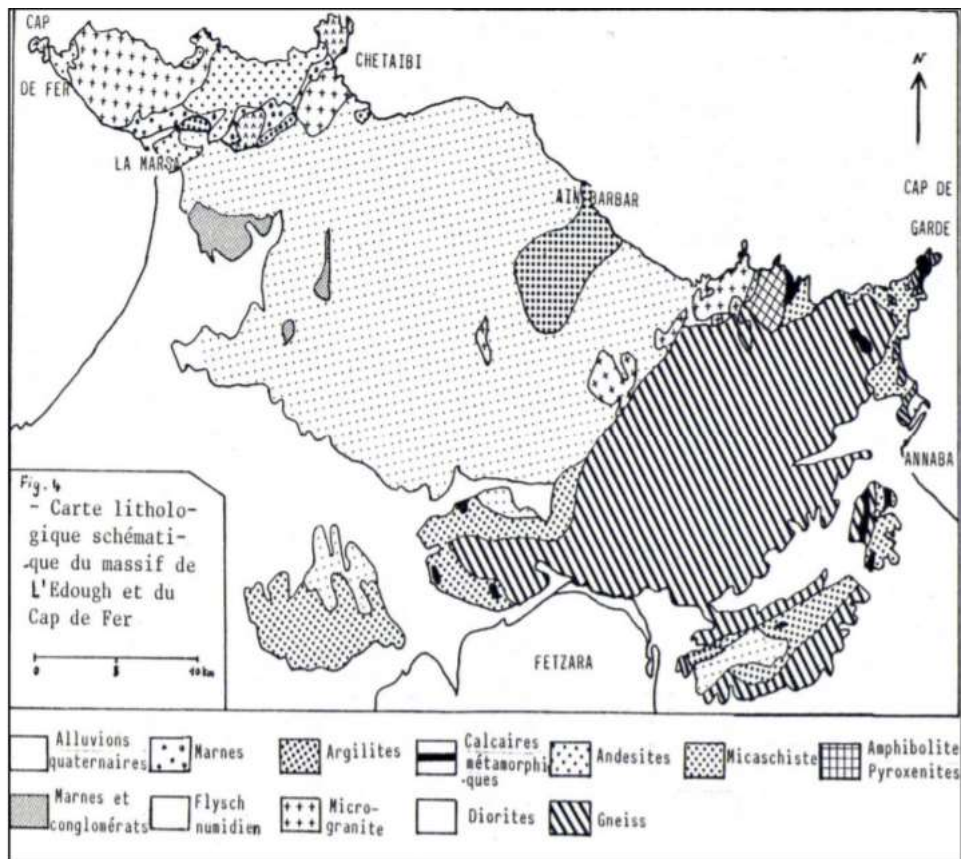


- La chaîne de Constantine qui se limite juste au versant Nord de Zouahra et M'sida Aicha (Anonyme, 1997).

## 2.2 La région d'Annaba

La région d'Annaba se distingue par trois principales catégories de formation de terrains cristallins dont le massif de l'Edough, constitué de :

- Terrain éruptifs et métamorphiques (granites, micaschistes, etc...) ;
- Terrain sédimentaires de l'oligocène qui forme la chaîne numidique (principalement des grès et des argiles numidiennes) ;
- Terrains sédimentaires quaternaires constituant le remplissage de la plaine : alluvions, graviers, sables, etc (Ati, 2009).



**Figure 8 :** Carte géologique du massif Edough à Annaba (1/200 000), d'après Hilly (1962) tramé in Toubal et Boumaza (1986).

### 3 Cadre climatique de Jijel et Annaba

Le climat d’Algérie a fait l’objet de nombreuses études analytiques et synthétiques, notamment par Seltzer (1946) ; Bagnouls et Gaussen (1953) ; Emberger (1954) ; Stewart (1975) : Tous ces auteurs s’accordent à reconnaître l’intégration du climat algérien au climat méditerranéen, caractérisé par une saison sèche et chaude coïncidant avec la saison estivale, et une saison froide et pluvieuse coïncidant avec la saison hivernale.

La région Nord-orientale de l’Algérie est caractérisée par un climat méditerranéen de transit, marqué par des oscillations saisonnières (en été, c’est un climat subtropical faisant de la saison chaude une des plus longues, et en hiver, il s’apparente beaucoup plus aux caractéristiques de la zone tempérée).

#### 3.1 Facteurs climatiques

Les séries utilisées correspondent aux longues périodes d’observation allant de 1989 jusqu’à 2009 pour la région de Jijel et entre 1978 et 2007 pour celle d’Annaba. Les données ont été acquises auprès de l’Office National de la Météorologie de Jijel et Annaba (O.N.M).

##### 3.1.1 Précipitations et températures

Les précipitations des deux régions étudiées sont présentées dans les tableaux 3 et 4.

###### ➤ Jijel

A partir du tableau 3, on remarque que la région de Jijel enregistre un maximum de pluie au mois de Décembre 194,8 mm/an, alors que le minimum de pluie a été enregistré au mois de juin 3,2 mm/an. Pour les températures, le mois le plus chaud est celui d’Aout avec une valeur de 26,15°C. Néanmoins, le mois le plus froid est celui de Janvier avec une valeur de température de 11,41°C.

**Tableau 3** : Moyennes des températures moyennes, mensuelles et précipitations de Jijel (1989-2009).

| Mois   | Jan   | Fév   | Mar  | Avr  | Mai   | Jui   | Juillt | Aout  | Sep   | Oct  | No    | De    |
|--------|-------|-------|------|------|-------|-------|--------|-------|-------|------|-------|-------|
| T °C   | 11,41 | 11,74 | 13,6 | 15,3 | 18,75 | 22,52 | 25,52  | 26,15 | 23,67 | 20,3 | 15,69 | 12,76 |
| P (mm) | 134,2 | 101,4 | 81,8 | 88,8 | 50,3  | 3,2   | 12,7   | 12,4  | 62,7  | 83,9 | 151,3 | 194,8 |

###### ➤ Annaba

D’après le tableau ci-dessous, on remarque que la région d’Annaba enregistre un maximum de pluie au mois de décembre 122,61mm/an, alors que le minimum de pluie a été enregistré au mois de juillet 2,51 mm/an. L’examen du tableau 4 montre également, que le mois le plus froid est le mois de Janvier avec une température de 6,9 °C et le mois le plus chaud est celui d’Aout avec une température de 31,4°C.

**Tableau 4 :** Moyennes des précipitations mensuelles, minimales et maximales de la région d'Annaba (1978-2007).

| Mois          | Jan    | Fév   | Mar   | Avr   | Mai   | Jui   | Juill | Aout | Sep   | Oct   | No    | De     | Moyenne |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|---------|
| <b>M (°C)</b> | 16,7   | 17,1  | 18,3  | 21,3  | 24,3  | 27,2  | 30,7  | 31,4 | 29,3  | 25,8  | 20,9  | 17     | 23,3    |
| <b>m (°C)</b> | 6,9    | 9,9   | 7,5   | 9,7   | 13,2  | 15,8  | 19    | 19,7 | 18,3  | 14,7  | 10,1  | 7,3    | 12,5    |
| <b>M+m/2</b>  | 11,8   | 13,5  | 12,9  | 15,5  | 18,75 | 21,5  | 24,8  | 25,5 | 23,8  | 20,25 | 15,5  | 11,12  | 17,9    |
| <b>P (mm)</b> | 100,52 | 81,59 | 69,35 | 59,42 | 36,72 | 14,69 | 2,51  | 9,4  | 36,42 | 71,9  | 86,29 | 122,61 | 691,42  |

M (°C) : Température moyenne des maxima du mois le plus froid.

m (°C) : Température moyenne des minima du mois le plus chaud.

M+m/2 : Température moyenne mensuelle.

### 3.2 Synthèse climatique

Deux repères nous permettent de situer la zone d'étude dans le contexte global du climat à savoir, le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953), ainsi que le climagramme d'Emberger modifié par Stewart en 1969.

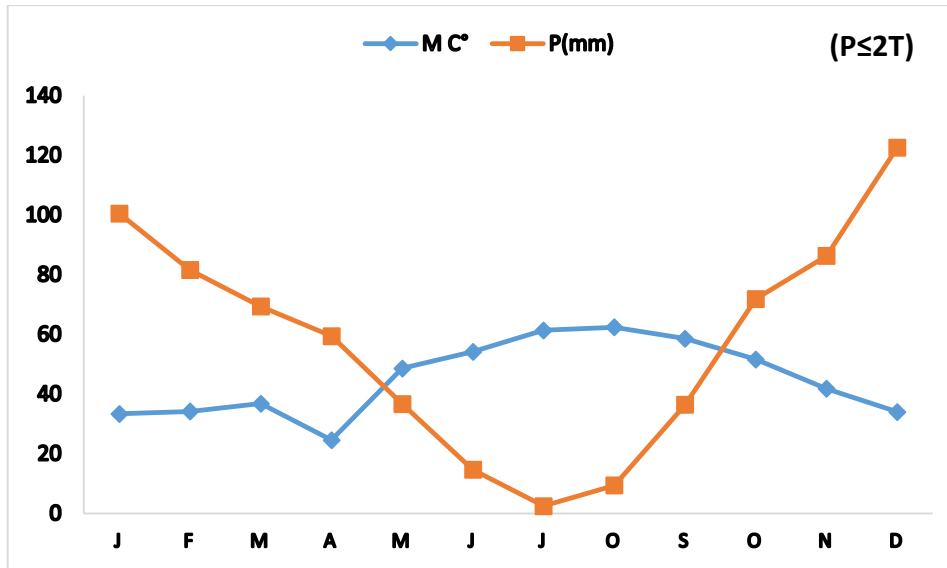
#### 3.2.1 Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen (1953)

Le diagramme ombrothermique, permet de distinguer les différentes périodes climatiques, les précipitations sont portées en ordonnées selon une échelle double des températures ( $P \leq 2T$ ).

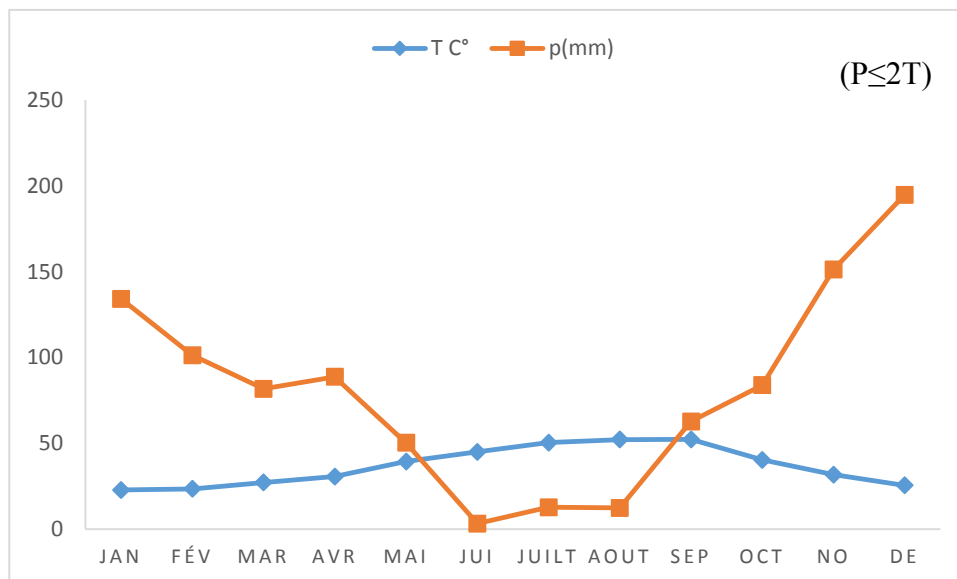
Selon **Gaussen et Bagnouls (1953)**, il y a sécheresse lorsque la courbe des précipitations rencontre celle des températures et passe au-dessous de cette dernière. Son intensité est traduite par la surface du graphe entre deux courbes pendant cette période. Ce diagramme permet de connaître également « la marche des températures et des précipitations » au cours de l'année.

Ce type de représentation est complété par la partie de la courbe situé en dessous de la limite de température de démarrage végétatif. La saison de croissance est représentée par la partie de courbe se trouvant en dessus de la limite de température de reprise végétative.





**Figure 9 :** Diagramme Ombrothermique Bagnouls et Gaussen de la région d'Annaba pour la période (1978-2007).



**Figure 10 :** Diagramme Ombrothermique Bagnouls et Gaussen de la région de Jijel (1989-2009).

Le diagramme ombrothermique de Gaussen (1953) d'Annaba et de Jijel fait apparaître deux périodes bien délimitées :

- Une période sèche relativement courte, s'étala du mois de Mai jusqu'à la fin du mois de septembre pour la région d'Annaba. Pour et la région de Jijel, la période sèche s'étala du mois de Mai jusqu'au début du mois de Septembre (figure 9 et 10).

- Une période humide s'étale sur le reste de l'année (figure 9 et 10).

### 3.2.2 Quotient pluviothermique et étages bioclimatiques d'Emberger (1936)

Les précipitations exercent une action prépondérante pour la définition de la sécheresse globale du climat. Les limites de séparation entre les différents étages climatiques restent encore imprécises. Il est intéressant de signaler qu'il ne s'agit pas de lignes au sens géométrique du mot, mais plutôt de bandes de transition mixte. À ce titre, Emberger a bien précisé que, sur le diagramme, les limites ont été tracées là où le changement de la végétation a été observé.

Pour classer et caractériser les climats des régions méditerranéennes, Emberger a défini en 1955 le quotient pluviométrique noté (Q), qui s'exprime par la formule suivante :

$$Q = 2000 P / (M_2 - m_2)$$

Où P: moyenne des précipitations annuelles en mm; M: moyenne des températures maximales du mois le plus chaud en degrés Kelvin (°K); m: la moyenne des températures minimales du mois le plus froid en degrés Kelvin

Le quotient d'Emberger est spécifique du climat méditerranéen, il est le plus fréquemment utilisé en Afrique du Nord. Le quotient Q<sub>2</sub> modifié par Stewart (1969) a été formulé de la façon suivante :

$$Q_2 = 3.43 P / M - m$$

P : pluviométrie moyenne annuelle (mm).

M : Température moyenne des maxima du mois le plus chaud (°C).

m : Température moyenne des minima du mois le plus froid (°C).

Le résultat de calcul de Q<sub>2</sub> de la région d'Annaba permettant de déterminer l'étage bioclimatique est présenté en dessous.

**Tableau 5 :** Valeurs du quotient pluviothermique d'Annaba.

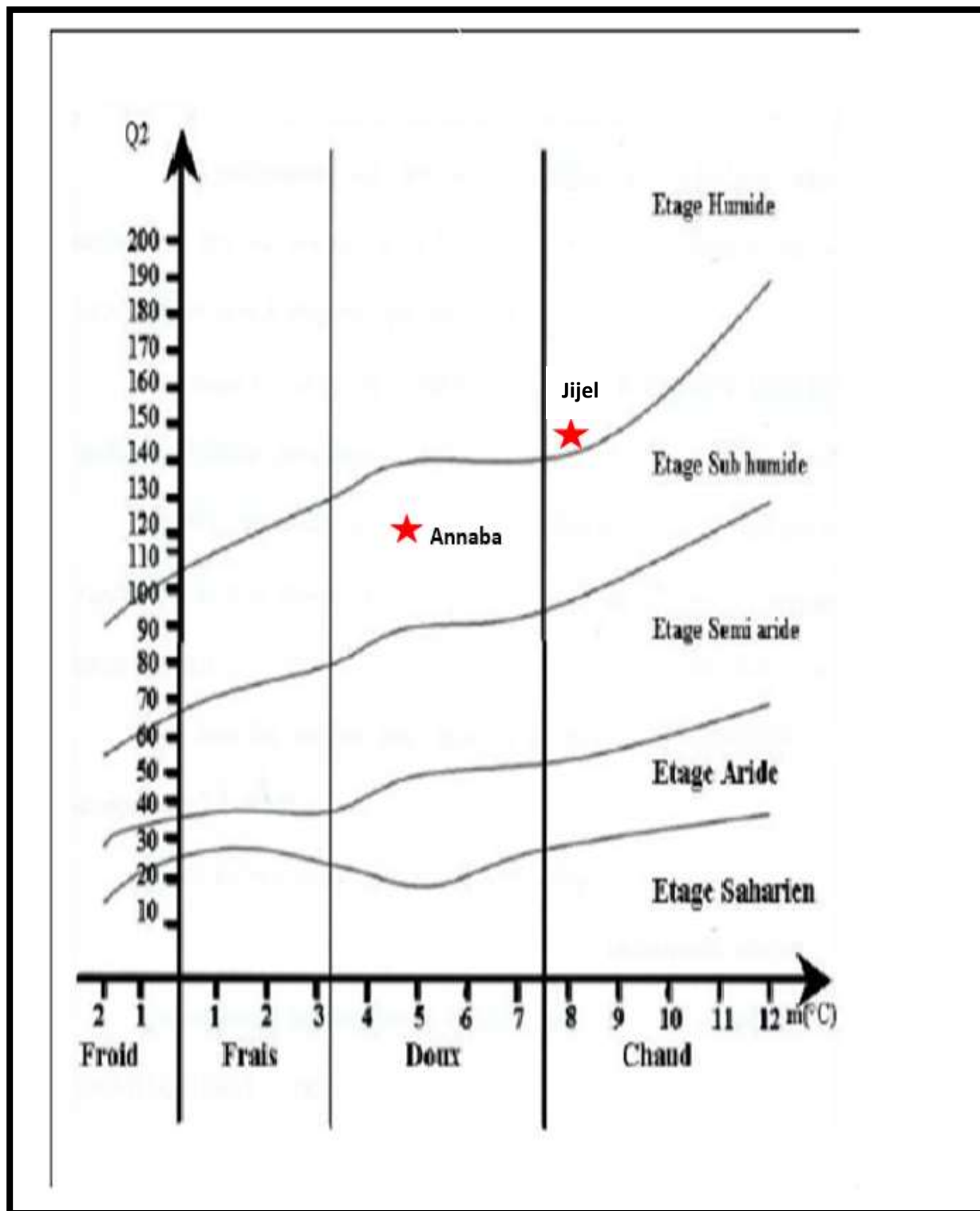
| Station | P (mm) | M (°C) | m (°C) | Q <sub>2</sub> | Etage bioclimatique | Variante thermique |
|---------|--------|--------|--------|----------------|---------------------|--------------------|
| Annaba  | 691,42 | 31,4   | 8,9    | 99             | Sub-humide          | Doux               |

D'après le climagramme d'Emberger, la région d'Annaba présente un bioclimat Sub-humide à hiver doux.

Pour la région de Jijel et par manque de données (températures maximales et minimales), on n'a pas pu calculer le  $Q_2$ . Merdas (2007) a trouvé une valeur de  $Q_2$  de 108 (voir tableau 06).

**Tableau 6:** Valeurs du quotient pluviothermique de Jijel.

| Station | P (mm) | M (°C) | m (°C) | $Q_2$ | Etage bioclimatique | Variante thermique |
|---------|--------|--------|--------|-------|---------------------|--------------------|
| Jijel   | 863,8  | 29,9   | 9,8    | 108   | Humide              | Chaud              |



**Figure 11 :** Localisation des deux régions d'études (Annaba et Jijel) dans le Climagramme d'Emberger.

# **Partie II :**

## **Matériels et Méthodes**

## Chapitre I : Matériel et végétal

Les objectifs de notre travail sont de comparer des populations de *Genista numidica* issues de deux zones géographiques distinctes afin de mettre en évidence d'éventuels écotypes à travers l'étude d'une part du profil phytochimique, et d'autre part de l'analyse du sol (pédologie, composition microbiologique associée).

### 1 Collecte du matériel végétal

#### 1.1 Zones et stations de collecte

D'après la flore de Quézel et Santa, (1962-1963) et Maire (1987) *Genista numidica* Spach fait partie des secteurs Kabylies-Numidie littorale. Deux régions ont été choisies pour réaliser notre collecte des échantillons, ce choix a été basé sur le facteur bioclimatique et phytogéographique :

- La région de Jijel situé dans la petite Kabylie (K2).
- La région d'Annaba qui fait partie de la Numidie littorale (K3) (voir figure 1).

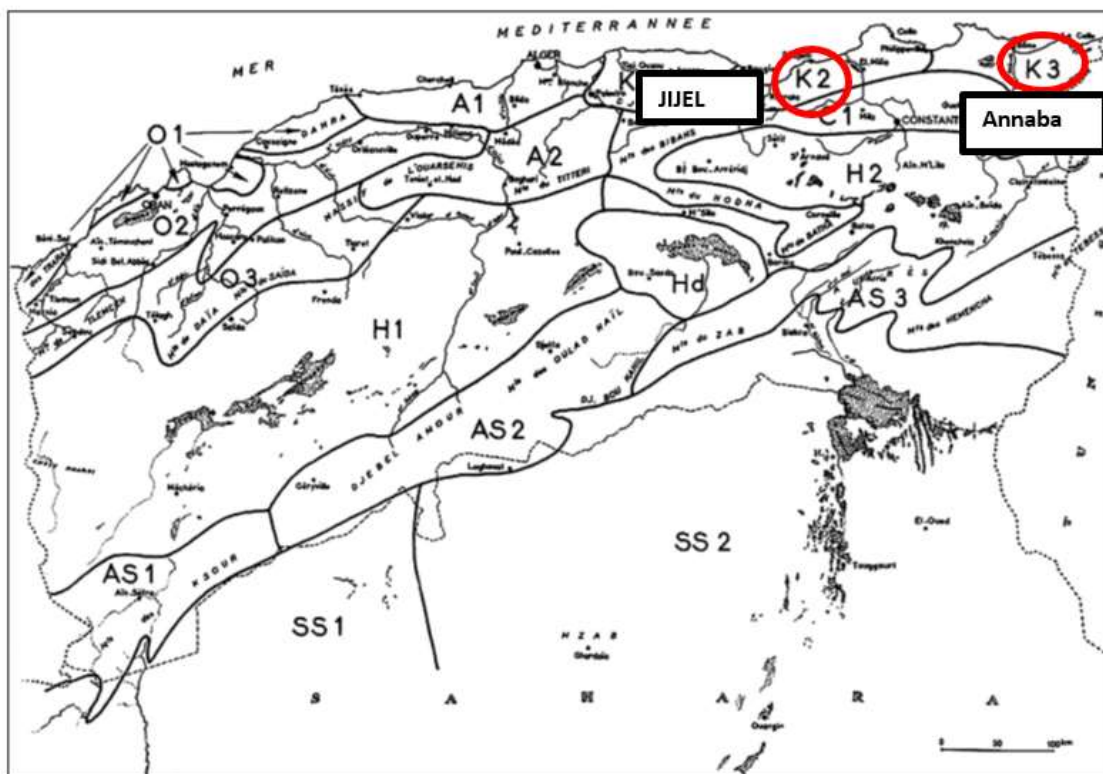


Figure 12 : Les secteurs phytogéographiques du Nord de l'Algérie (Quézel et Santa, 1962).

- K1, K2, K3, respectivement : la Grande Kabylie, la Petite Kabylie, incluant la Kabylie de Collo, la Numidie littorale ceinturant les villes d'Annaba (ex-Bône) et El Kala (ex-La Calle).

Nous avons réalisé une collecte de *G.numidica* réparties sur différentes stations des deux régions sélectionnées (Annaba et Jijel). Pour des raisons d'accessibilité du terrain, nous avons choisi trois stations à Jijel et quatre stations à Annaba (tableau 5et 6).

**Tableau 7 :** Coordonnées GPS des principales stations de la région de Jijel.

| COMMUNE              | LOCALITE | NOM DE STATION            | STATION | LATITUDE NORD | LONGITUDE EST |
|----------------------|----------|---------------------------|---------|---------------|---------------|
| Jijel<br>(El Aouana) | Aftis    | Laghrifet                 | 1       | 36°48'17.2"   | 5°40'48.7"    |
|                      |          |                           | 2       | 36°48'23.8"   | 5°41'10.4"    |
|                      |          | Grand Phare<br>(Ras Afia) | 3       | 36°48'50.3"   | 5°41'33.5"    |

**Tableau 8 :** Coordonnées GPS des principales stations de la région d'Annaba.

| COMMUNE | LOCALITE          | NOM DE STATION          | STATION | LATITUDE NORD   | LONGITUDE EST  |
|---------|-------------------|-------------------------|---------|-----------------|----------------|
| Annaba  | Massif<br>Eldough | Cap de Garde            | 1       | 36° 57' 31.248" | 7° 46' 36.386" |
|         |                   |                         | 2       | 36° 57' 33.185" | 7° 46' 26.774" |
|         |                   |                         | 3       | 36° 57' 30.294" | 7° 46' 15.726" |
|         |                   | Boukhalfa<br>(Serraidi) | 4       | 36° 56' 53.894" | 7° 45' 6.527"  |

## 1.2 Période de collecte

Les échantillons de *G.numidica* sont issus du regroupement de plusieurs prélèvements effectués sur le terrain, durant les années 2015, 2016, 2017, 2018 et 2019. Le premier prélèvement était en décembre 2015, suivie par un prélèvement en période de floraison (mai 2016) qui permet de s'assurer d'une identification précise. 25 rameaux de *Genista numidica* sont le résultat des deux échantillonnages effectués en 2016 à Jijel et Annaba. Chaque rameau contient toute la partie aérienne (fleur, feuille et tige) sauf pour quelques rameaux qui ne sont pas encore fleurit. En mars 2017, un deuxième échantillonnage a eu lieu dans les mêmes régions de collecte, mais en grande quantité (1kg de *Genista numidica* pour chaque région d'étude).

### 1.3 Plan d'échantillonnage

Un échantillonnage au hasard ou aléatoire est adapté. C'est une méthode qui consiste à prélever au hasard et de façon indépendante «n» unités d'échantillonnage d'une population de «N» éléments (Gounot, 1969).

## 2 Préparation des échantillons pour l'extraction

### 2.1 Séchage et broyage

Les 25 rameaux de *Genista numidica* collectés en 2016 provenant des deux zones d'étude (Annaba et Jijel) ont été séchés à température ambiante, à l'ombre et à l'abri de l'humidité pendant dix jours. Les mêmes conditions de séchage ont été appliquées pour le deuxième échantillonnage effectué en 2017.

Après le séchage, les 25 rameaux sont triés et les 3 parties (fleur, feuille et tige) sont isolées. Le broyage se fait par un broyeur à mâchoire. Au total, on a obtenu 71 spécimens (tableau en dessous). D'autre part, un broyage de toute la partie aérienne sans séparation (fleurs, feuilles et tiges) a été effectué sur une quantité de 1kg pour chaque région de collecte (Jijel et Annaba), à l'aide d'un broyeur à couteau Fritsch® pulvirisette 19 avec un tamis de 1 mm. L'étude phytochimique de *Genista numidica* (extraction, fractionnement, purification et élucidation structurale) sera effectuée sur cette matrice végétale.

## 3 Identification des spécimens collectés

Les spécimens collectés de *Genista numidica* ont été identifiés par Pr Kaabeche, Professeur en Biologie végétal à la faculté des sciences de Sétif 1. La reconnaissance du matériel végétal a été faite selon les caractères morphologiques cités dans la flore de Maire (1952-1987) et la flore de Quezel et Santa (1962), en utilisant la loupe optique binoculaire (Optika). La détermination a été réalisée sur des échantillons en analysant les parties aériennes végétatives (tiges et feuilles) et reproductives (fleurs). Ensuite, les échantillons témoins, ont été conservés au laboratoire de Pharmacognosie à Paris Descartes (France) et le laboratoire de Phytothérapie appliquée aux maladies chroniques (LPAMC) Sétif 1 (Algérie).



## 4 Liste des 71 spécimens collectés

Les échantillons collectés d'après notre échantillonnage effectués sur les deux zones d'études sont présentés en dessous.

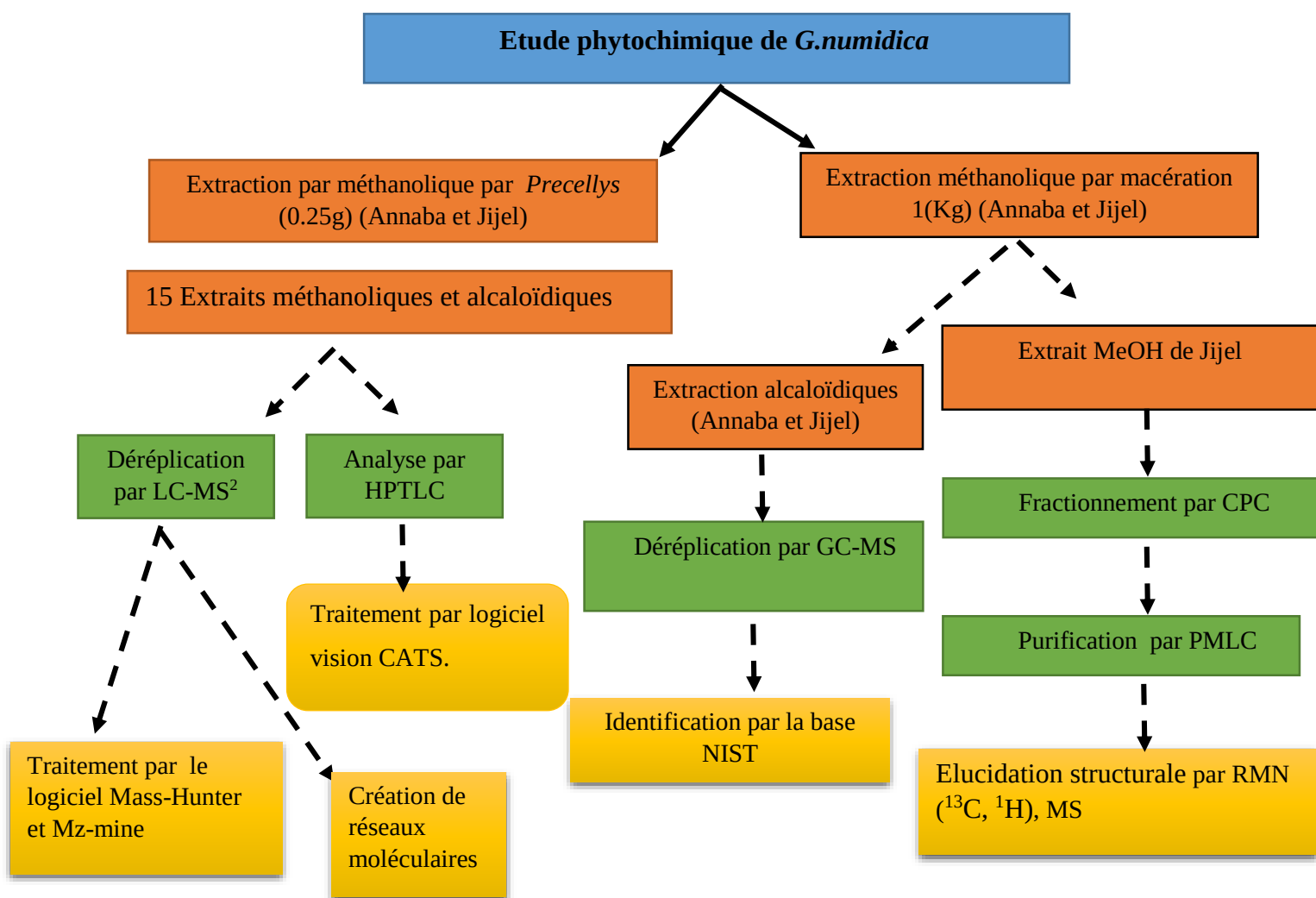
| Région | Nom de station | N° de station | Pieds | Spécimens | Code                          | N° D'échantillon |
|--------|----------------|---------------|-------|-----------|-------------------------------|------------------|
| Jijel  | Laghrifet      | 1             | 1     | Fleur     | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -01-Fl | 1                |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -01-Fe | 2                |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -01-Ti | 3                |
|        |                |               | 2     | Fleur     | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -02-Fl | 4                |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -02-Fe | 5                |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -02-Ti | 6                |
|        |                |               | 3     | Fleur     | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -03-Fl | 7                |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -03-Fe | 8                |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -03-Ti | 9                |
|        |                |               | 4     | Fleur     | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -04-Fl | 10               |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -04-Fe | 11               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Lg-St <sub>1</sub> -04-Ti | 12               |
|        | Grand Phare    | 2             | 5     | Fleur     | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -01-Fl | 13               |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -01-Fe | 14               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -01-Ti | 15               |
|        |                |               | 6     | Fleur     | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -02-Fl | 16               |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -02-Fe | 17               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -02-Ti | 18               |
|        |                |               | 7     | Fleur     | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -03-Fl | 19               |
|        |                |               |       | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -03-Fe | 20               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>2</sub> -03-Ti | 21               |
|        |                | 3             | 8     | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -01-Fe | 22               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -01-Ti | 23               |
|        |                |               | 9     | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -02-Fe | 24               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -02-Ti | 25               |
|        |                |               | 10    | Feuille   | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -03-Fe | 26               |
|        |                |               |       | Tige      | Jij-Gp-St <sub>3</sub> -03-Ti | 27               |
| Annaba | Cap de Garde   | 1             | 11    | Fleur     | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -01-Fl | 28               |
|        |                |               |       | Feuille   | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -01-Fe | 29               |
|        |                |               |       | Tige      | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -01-Ti | 30               |
|        |                |               | 12    | Fleur     | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -02-Fl | 31               |
|        |                |               |       | Feuille   | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -02-Fe | 32               |
|        |                |               |       | Tige      | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -02-Ti | 33               |
|        |                |               | 13    | Fleur     | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -03-Fl | 34               |
|        |                |               |       | Feuille   | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -03-Fe | 35               |
|        |                |               |       | Tige      | Ann-Cg-St <sub>1</sub> -03-Ti | 36               |
|        |                | 2             | 14    | Fleur     | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -01-Fl | 37               |
|        |                |               |       | Feuille   | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -01-Fe | 38               |
|        |                |               |       | Tige      | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -01-Ti | 39               |
|        |                |               | 15    | Fleur     | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -02-Fl | 40               |
|        |                |               |       | Feuille   | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -02-Fe | 41               |
|        |                |               |       | Tige      | Ann-Cg-St <sub>2</sub> -02-Ti | 42               |

|        |                                  |                  |                                  |         |                   |       |
|--------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|---------|-------------------|-------|
| Annaba | Boukhalfa<br>(Route de Serraidi) | 3                | 16                               | Fleur   | Ann-Cg-St2-03-Fl  | 43    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St2-03-Fe  | 44    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg-St2-03-Ti  | 45    |
|        |                                  |                  | 17                               | Fleur   | Ann-Cg-St2-04-Fl  | 46    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St2-04-Fe  | 47    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg-St2-04-Ti  | 48    |
|        |                                  |                  | 18                               | Fleur   | Ann-Cg-St3-01-Fl  | 49    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St3-01-Fe  | 50    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg-St3-01-Ti  | 51    |
|        |                                  | 4                | 19                               | Fleur   | Ann-Cg-St3-02-Fl  | 52    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St3-02-Fe  | 53    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg-St3-02-Ti  | 54    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St3-03-Fe  | 56    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg-St3-03-Ti  | 57    |
|        |                                  |                  | 20                               | Fleur   | Ann-Cg-St3-04-Fl  | 58    |
|        |                                  |                  |                                  | Feuille | Ann-Cg-St3-04-Fe  | 59    |
|        |                                  |                  |                                  | Tige    | Ann-Cg- St3-04-Ti | 60    |
|        |                                  |                  | Boukhalfa<br>(Route de Serraidi) | 4       | 21                | Fleur |
|        | Feuille                          | Ann-Rs-St4-01-Fe |                                  |         |                   | 62    |
|        | Tige                             | Ann-Rs-St4-01-Ti |                                  |         |                   | 63    |
|        | 22                               | Feuille          |                                  |         | Ann-Rs-St4-02-Fe  | 64    |
|        |                                  | Tige             |                                  |         | Ann-Rs-St4-02-Ti  | 65    |
|        | 23                               | Fleur            |                                  |         | Ann-Rs-St4-03-Fl  | 66    |
|        |                                  | Feuille          |                                  |         | Ann-Rs-St4-03-Fe  | 67    |
|        | 24                               | Tige             |                                  |         | Ann-Rs-St4-03-Ti  | 68    |
|        |                                  | Fleur            |                                  |         | Ann-Rs-St4-04-Fl  | 69    |
|        |                                  | Feuille          |                                  |         | Ann-Rs-St4-04-Fe  | 70    |
|        |                                  | Tige             | Ann-Rs-St4-04-Ti                 | 71      |                   |       |

**Chapitre II : Investigation phytochimique du *Genista numidica* Spach.**

Cette partie du travail de thèse a consisté à la réalisation d'une investigation phytochimique sur les spécimens de *Genista numidica* provenant des deux zones de collectes choisies, Jijel et Annaba. Les matières premières végétales séchées et pulvérisées ont fait l'objet de différents types d'extractions (Extraction par Precellys et extraction méthanolique par macération). Une approche déréplicative a été appliquée aux différents extraits de *Genista numidica* obtenus, d'une part par LC-MS<sup>2</sup> en comparaison avec des standards et d'autre part, par GC-MS.

Un fractionnement de l'extrait méthanolique des échantillons de *Genista numidica* collecté à Jijel (station Laghrifet), a été mis en œuvre, en utilisant différentes techniques chromatographiques : Chromatographie de partage centrifuge (CPC), chromatographie liquide moyenne pression (MPLC). Les composés isolés ont pu être identifiés suite à une analyse structurale par combinaison de diverses méthodes spectroscopiques (RMN : <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H, MS).



## 1 Déréplication des extraits de *G.numidica*

La déréplication est une démarche visant à identifier des composés au sein de mélanges complexes qui sont des extraits bruts ou des fractions obtenues lors des premières étapes de purification. Cette stratégie permet d'obtenir une estimation rapide de la composition d'un extrait et d'évaluer son potentiel de nouveauté en termes de structure et l'intérêt de son étude. Elle met en œuvre la combinaison de méthodes chromatographiques et de méthodes de détection basées sur la spectrométrie de masse (le plus souvent), mais aussi la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou autres. La déréplication associant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse est notée HPLC/MS ou LC/MS. La spectrométrie de masse peut associer différentes méthodes d'ionisation et de fragmentation. Le couplage avec la MS<sup>2</sup> associe une détection basée sur la fragmentation des ions parents, elle est notée HPLC-MS/MS ou HPLC-MS<sup>2</sup>.

La déréplication implique ensuite la corrélation des données obtenues à l'issue de l'analyse avec des bases de données contenant les données spectroscopiques d'un nombre plus ou moins variable de composés naturels (bases de données type Dictionary of Natural Products (DNP), ou autres).

Ces approches sont fondées sur le fait que des molécules structurellement apparentées ou identiques partagent des propriétés physiques similaires, notamment des profils UV, spectres de masse, déplacements chimiques en RMN ou temps de rétention chromatographiques.

La spectrométrie de masse est plus sensible que la RMN, toutefois le niveau de confiance reste limité par rapport à l'évaluation d'un ensemble complet de données physiques avec celles déjà publiées. La déréplication par spectrométrie de masse peut notamment aboutir à un grand nombre de résultats correspondant à une masse exacte dans les bases de données : (Dictionary of Natural of Natural Produits, SciFinder, Reaxys...). L'utilisation des données de fragmentation en spectrométrie de masse (MS/MS) permet donc d'obtenir un niveau de preuve supplémentaire.

La déréplication peut également être mise en œuvre avec des méthodes de chromatographie gazeuse (GC-MS). La base de données la plus utilisée dans ce cas est la base NIST.

### 1.1 Matériel et réactifs

- L'analyse a été réalisée sur une chaîne LC/ESI-QTOF MS/MS LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-Tof à 3 énergies CID différentes : 20, 45 et 70 eV. Les données MS et MS ont été traitées avec les logiciels Mzmine 2.24 et Mass-Hunter.

- Les réactifs utilisés dans ce travail proviennent d'Aldrich, Merck, Prolabo, Sigma. Les solvants sont fournis par Carlo Erba.

## **1.2 Déréplication par analyse HPLC-UV-MS/MS**

L'analyse par HPLC-UV-MS/MS a été réalisée au laboratoire de Pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay, en collaboration avec le Dr A. Maciuk (UMR BioCIS). Cette approche a été menée à l'échelle analytique sur des extraits méthanoliques et alcaloïdiques obtenus à partir de petites quantités de matériel végétal (0, 25g).

### **1.2.1 Préparation des extraits pour analyse HPLC-UV-MS/MS**

Parmi les 71 spécimens de *G.numidica*, nous avons décidé de sélectionner 15 spécimens pour la déréplication par LC-MS<sup>2</sup> (voir tableau ci-dessous). Deux types d'extraction ont été mise en œuvre. D'une part une extraction méthanolique par ultra-sons afin d'extraire une large gamme de composés de polarité différente, et ainsi être exhaustif en termes d'extraction de métabolites secondaires, et d'autre part, une extraction plus spécifique des alcaloïdes par pré-traitement de la matrice végétale par une base.

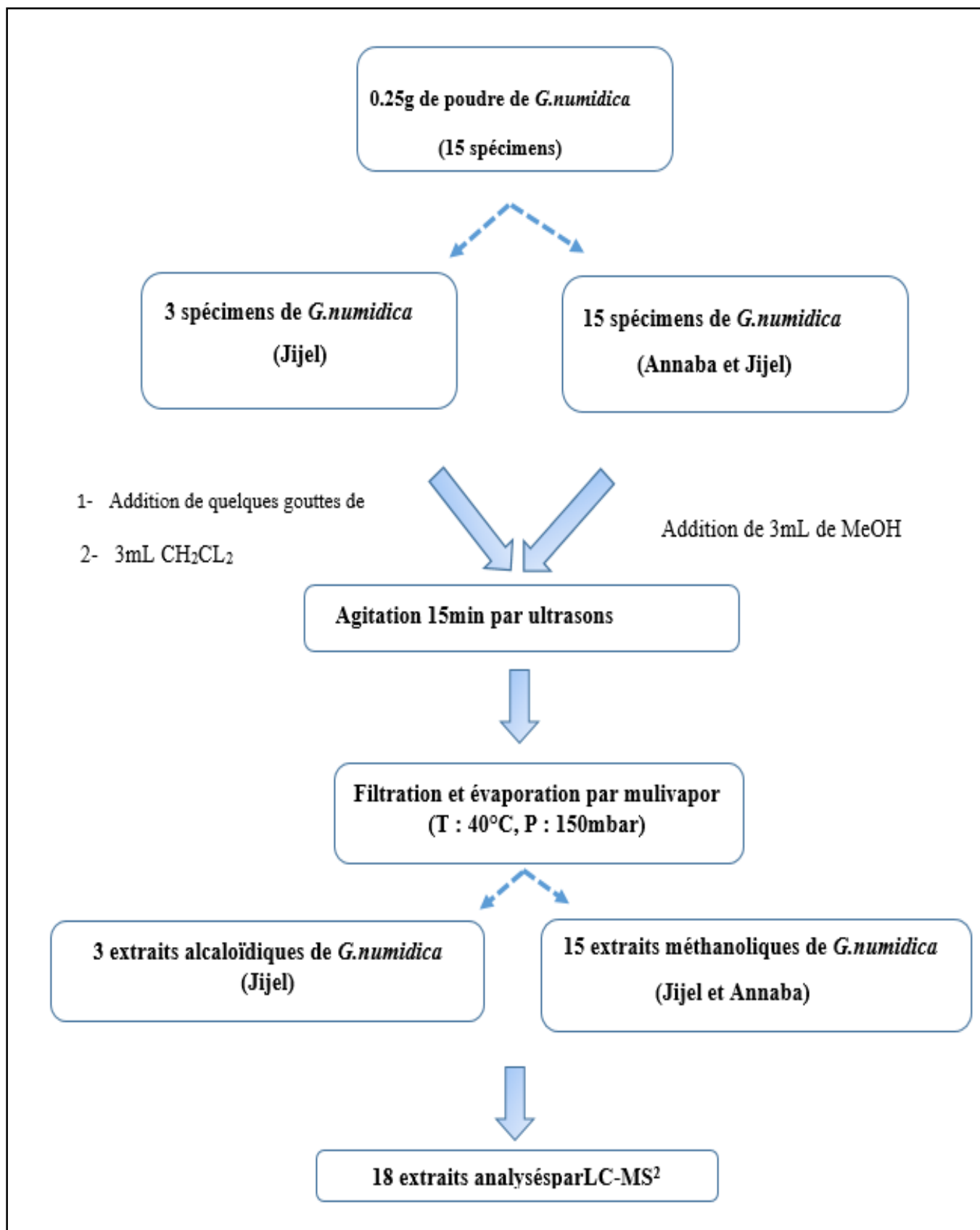
#### **1.2.1.1 Extraction méthanolique des spécimens de *G.numidica***

0, 25g de poudre de plante des 15 spécimens de *G.numidica* ont été mis en présence de 3 mL de méthanol (MeOH), puis soumis à une agitation par ultrasons pendant 15 mn. Ils ont été ensuite filtrés puis évaporés à l'aide d'un réglé à une température de 40°C et une pression de 150mbar. On obtient 15 extraits méthanoliques de *Genista numidica*.

#### **1.2.1.2 Extraction des alcaloïdes des spécimens de *G.numidica***

Cette extraction a été réalisée uniquement sur les 3 spécimens de l'échantillon de *G.numidica* provenant de Jijel (station Laghrifet) afin de pouvoir la comparer aux extraits méthanoliques issus des mêmes échantillons. C'est une extraction classique des alcaloïdes qui consiste à traiter la matière végétale par une base (ammoniaque diluée), puis extraire les alcaloïdes sous forme de bases par un solvant organique, dans notre cas le dichlorométhane. Quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH à 30% ont été mélangés à 0, 25g de poudre de plante jusqu'à l'obtention d'une pâte, sur laquelle on ajoute 3 mL de dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Le mélange est soumis à une agitation sous ultrasons pendant 15 mn. Après filtration et rinçage avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, les extraits sont évaporés dans le Multivapor (Buchi) réglé à une température de 40°C et une pression de 150mbar. On obtient ainsi 3 extraits alcaloïdiques de *G.numidica*.

10 mg d'extraits de *G.numidica* (15 extraits méthanoliques et 3 extraits alcaloïdiques) ont été solubilisés dans 1mL MeOH, puis filtré par une membrane HPLC (0.2µm) avant d'être injectés en LC-MS<sup>2</sup> (tableau 7). Les données LC-MS<sup>2</sup> ont été enregistrées sur un LC/ESI-QTOF MS/MS LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-Tof à 3 énergies CID différentes : 20, 45 et 70 eV. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvant A (eau contenant 0.1% d'acide formique) et de solvant B (acétonitrile contenant 0.1% d'acide formique) à un débit de 0.4mL/min. L'élution par gradient a commencé avec 95% de solvant A et 5% de solvant B pendant 6 min et est passée à 100% B en 2min et a été maintenue pendant 2 autres min.

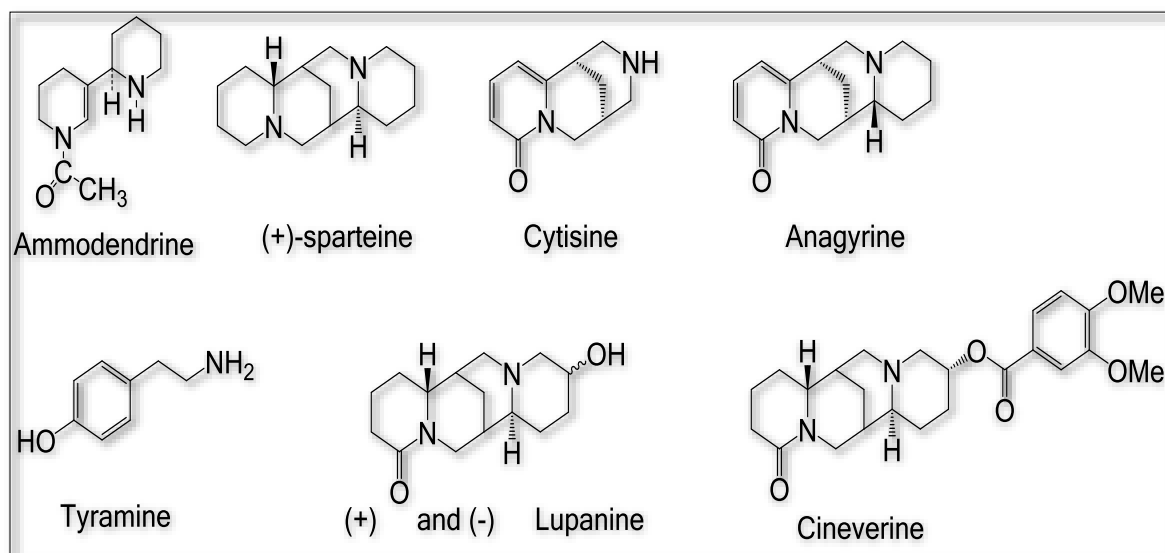


**Figure 13 :** Protocole d'extraction des spécimens de *G.numidica* pour LC-MS<sup>2</sup>.

**Tableau 9 :** Liste des échantillons analysés par LC-MS<sup>2</sup>.

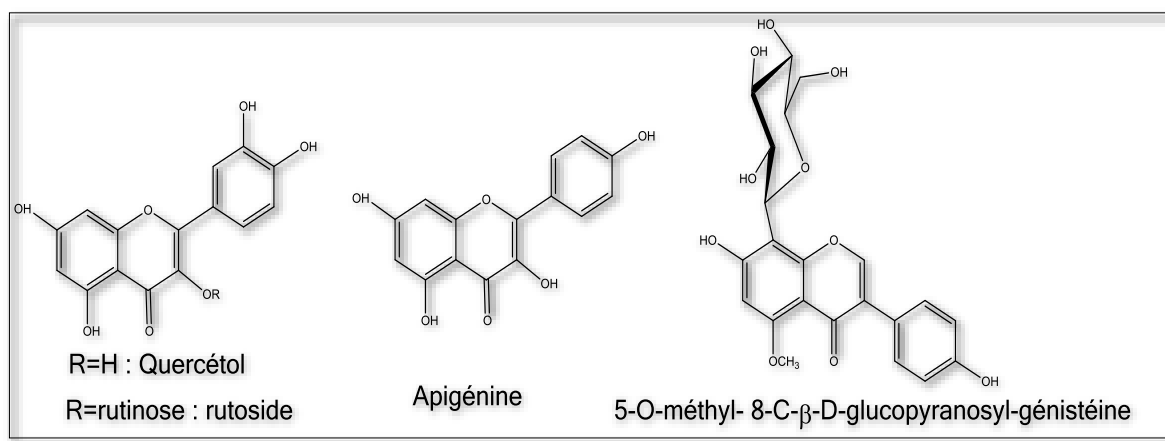
| EXTRAITS                               | ECHANTILLON | REGION | STATION      | SPECIMENS | CODE                 |
|----------------------------------------|-------------|--------|--------------|-----------|----------------------|
| méthanoliques<br>( <i>G.numidica</i> ) | LC-1        | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st1   |
|                                        | LC-2        | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st1 |
|                                        | LC-3        | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-Lg-St1    |
|                                        | LC-4        | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st2   |
|                                        | LC-5        | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st2 |
|                                        | LC-6        | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-Lg-St2    |
|                                        | LC-7        | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-Cg-st2     |
|                                        | LC-8        | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St2   |
|                                        | LC-9        | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-Cg-St2      |
|                                        | LC-10       | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-St3        |
|                                        | LC-11       | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-St3      |
|                                        | LC-12       | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-St3         |
|                                        | LC-13       | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-St4        |
|                                        | LC-14       | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-St4      |
|                                        | LC-15       | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-St4         |
| alcaloïdique<br>( <i>G.numidica</i> )  | LC-16       | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-Fleur-St1      |
|                                        | LC-17       | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-Feuille-St1    |
|                                        | LC-18       | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-St1       |

Parallèlement à l'analyse des extraits, l'injection de solutions de composés de référence (standards) a été envisagée. Un mélange de composés flavonoidiques et alcaloïdiques identifiés au sein d'autres espèces du genre *Genista* ont été analysés dans les mêmes conditions.



**Figure14 :** Structure chimique des standards (alcaloïdes quinolizidiniques et pipéridiniques).





**Figure 15 :** Structure chimique des standards (flavonoïdes et isoflavones).

### 1.2.2 Traitements des données de LC-MS<sup>2</sup>

Les données HPLC-UV-MS/MS ont été traitées avec les logiciels Mzmine 2.24 et Mass-Hunter. Ces logiciels permettent de visualiser sous forme de chromatogramme les données de l'analyse. De nombreux paramètres peuvent être fixés afin d'obtenir des chromatogrammes pertinents. Ces paramètres seront d'une grande importance lors de la mise en œuvre de méthodes de visualisation telle que le Molecular Networking.

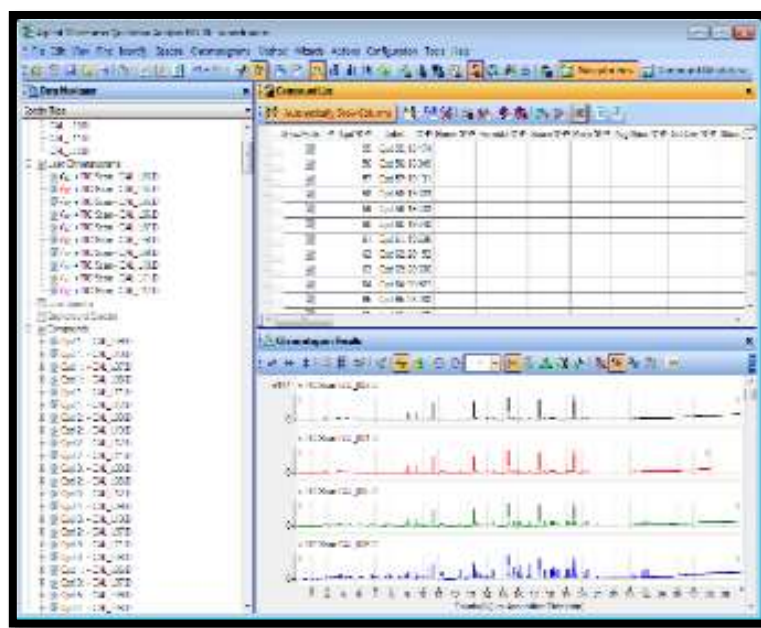
#### ➤ Création du/des chromatogrammes

La création des chromatogrammes nécessite une série d'étapes récapitulées comme suit :

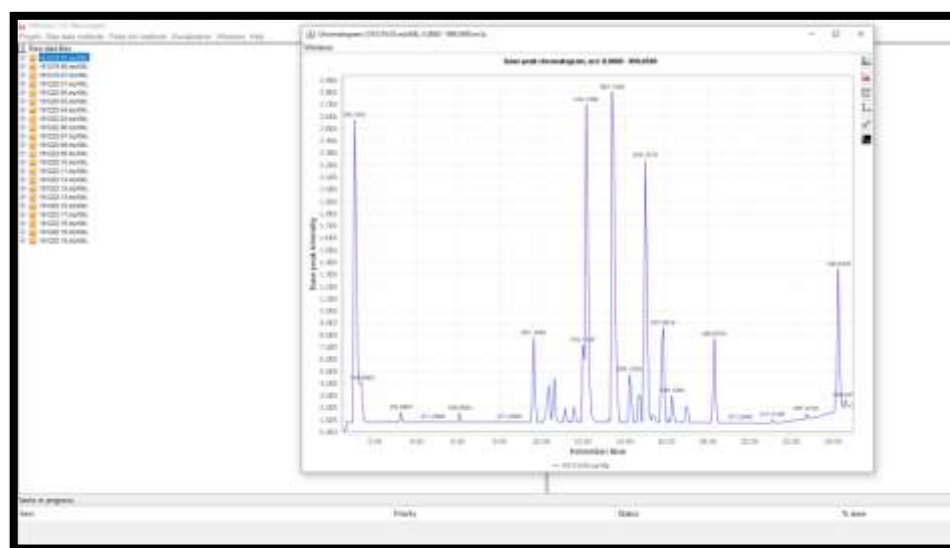
- Détection de pics : les seuils de détection de pics doivent être définis, à la fois pour la détection en MS1, mais également pour les données de fragmentation MS/MS.
- Correction de la ligne de base.
- Alignement de pics : lorsqu'il y a plusieurs chromatogrammes à traiter.
- Détection de massifs isotopiques.

#### ➤ Visualisation du/des chromatogrammes

- TIC : Total Ion Chromatogramme, visualise l'ensemble des ions détectés.
- Chromatogrammes à différentes longueurs d'onde lorsqu'une détection UV existe.



**Figure 16 :** Interface du logiciel Mass-Hunter.



**Figure 17 :** Interface du logiciel Mz-Mine.

➤ Identification de composé

C'est l'étape de déréplication à proprement parler. Elle fait le lien entre un pic chromatographique et une structure chimique d'un composé. Cette étape nécessite soit d'avoir une base de données interne contenant les données spectrales des composés, soit d'avoir injecté des standards qui permettent l'identification.

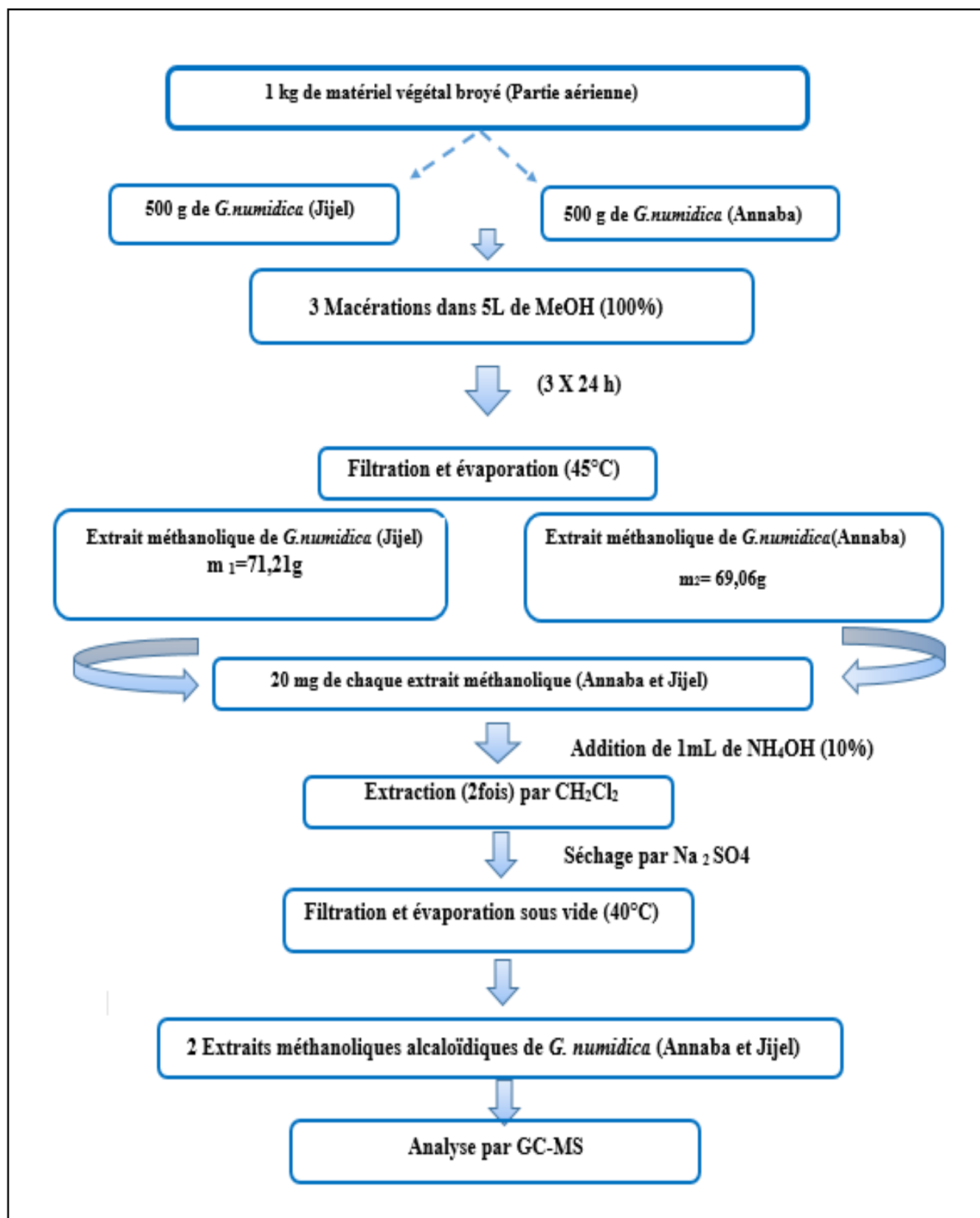
### 1.3 Déréplication par analyse GC-MS

La déréplication peut également mettre en œuvre la chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode concerne plus spécifiquement les composés volatils, ou rendus volatils par dérivatisation. Dans le cas de *Genista numidica*, les alcaloïdes, la déréplication par GC-MS se prêtent particulièrement à l'analyse du contenu alcaloïdique puisque les alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques sont volatils. Pour cette partie, la préparation d'un extrait alcaloïdique en grande quantité a été envisagée, en vue de purifications ultérieures. Pour cela, nous sommes partis de la partie aérienne complète sans séparation des différentes parties de plante.

#### 1.3.1 Préparation des extraits

500g de matériel végétal constitué par la partie aérienne de *Genista numidica*, pour chaque région (Annaba et Jijel) préalablement séchés et pulvérisés, sont mis à macérer dans 5L de MeOH (3×24 h). Après filtration puis évaporation par le rotavapeur à une température n'excédant pas 45°C, 71,21gd'extrait méthanolique pour la région de Jijel et 69,06g pour la région d'Annaba ont été obtenus. Les stations choisies pour la macération sont : la station du Grand Phare de la région de Jijel et la station du Cap de Garde de la région d'Annaba.

1mL de NH<sub>4</sub>OH à 10% est ajouté à 20mg de chaque extrait méthanolique sec (Annaba et Jijel), puis une extraction répétée (2 fois) par le dichrométhane a été effectuée. La phase organique a été séchée par NaSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporées. Enfin, on obtient deux extraits méthanoliques alcaloïdiques (Annaba et Jijel).



**Figure 18 :** Protocole d'extraction par macération de *Genista numidica* Spach. (Jijel et Annaba).

Les extraits méthanoliques alcaloïdiques (5 mg) ont été solubilisés dans 1mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Au total, on a obtenu 6 solutions à injecter en GC/MS.

**Tableau 10:** Echantillons analysés par GC-MS.

| Nom de la région       | Nom de la station |   | Partie de la plante                    | Echantillons | Rendement d'extraction |
|------------------------|-------------------|---|----------------------------------------|--------------|------------------------|
| Extraits méthanoliques |                   |   |                                        |              |                        |
| Jijel                  | Laghrifet –       | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) | GC-1         | 14,24%                 |
| Annaba                 | Cap de Garde      | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) | GC-2         | 13,81 %                |
| Extraits alcaloïdiques |                   |   |                                        |              |                        |
| Jijel                  | Laghrifet –       | 1 | Partie aérienne                        | GC-3         | 1,3%                   |
| Annaba                 | Cap de Garde      | 1 | Partie aérienne, pied 1                | GC-4         | 1,4%                   |
|                        |                   | 1 | Partie aérienne, pied 2                | GC-5         | 1,2%                   |
|                        |                   | 2 | Partie aérienne                        | GC-6         | 1,7%                   |

### 1.3.2 Analyse chromatographique par GC-MS

Les analyses des extraits méthanoliques alcaloïdiques et les extraits alcaloïdiques, ont été réalisées sur un GCMS-QP2010SE Système Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'une colonne capillaire de longueur : 122-5032 :30m×0, 250 mm ×0, 25µm DB-5. La détection a été par un spectromètre de masse Agilent 5973N en mode d'ionisation par impact électronique, avec une température de source de 220 °C, température d'interface : 240°C, Mode : balayage et une énergie d'ionisation de 70 eV (Nurgun et Semiha,2009).

Les conditions chromatographiques étaient :

- Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1 mL/min, et un split ratio de 20,00 (Mode d'injection : Split, Pression : 100KPa, Débit total : 28, 7 mL, Débit de la colonne : 1,22 mL/min, Débit de la purge : 3ml/min,)

- **Température de la colonne : 120°C**

- **Température de l'injecteur : 250 °C**

**Volume d'injection : 0,2µL**

Les échantillons ont été analysés avec la colonne maintenue initialement pendant 2 minutes à 120 °C après l'injection, puis la température a été augmentée à 300°C avec une rampe de chauffage à 6°C/minute, avec un maintien de 10 minutes est la température de 300°C.

## 2 Analyse par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)

L'HPTLC est un outil analytique dérivé d'une amélioration de la chromatographie sur couche mince, offrant ainsi une meilleure séparation et résolution. Cette amélioration est caractérisée par l'utilisation d'une silice de granulométrie plus fine (1µm), répartie sur une couche plus fine (150µm), permettant une élution sur des plaques de 10cm au lieu de 20cm (pour une plaque CCM classique).

L'efficacité de cette technique est obtenue par le fait que chaque étape est réalisée par automatisation (déphasage d'échantillon, élution de plaque et balayage, visualisation, traitement) et contrôlée par un logiciel. Ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons en un temps réduit d'une manière standardisée, réduisant ainsi les écarts de résultats.



**Figure 19** : Modules composant le système HPTLC Camag : Déposeur automatique ATS4, chambre de migration ADC2, visualiseur (Visible, 254 et 366 nm) et scanner (multi-longueurs d'ondes)

Les échantillons sont déposés à l'aide d'un déposeur automatique, la plaque est ensuite mise à migrer dans une chambre de développement contenant la phase mobile. Les révélateurs peuvent être ensuite pulvérisés ou la plaque peut être plongée dans une cuve d'immersion. La plaque révélée (ou non) peut être observée dans un visualiseur équipé d'un appareil photo dans le visible, l'UV (254 nm ou 366 nm). Le scanner permet quant à lui l'analyse par mesure d'absorbance à différentes longueur d'ondes de la plaque. Le tout est monitoré par le logiciel vision CATS.

## 2.1 Condition de mise en œuvre de l’HPTLC

**Phase mobile** : Le système composé d’acétate d’éthyle /acide formique /acide acétique /eau, (100 /11/11/26, v/v/v/v) est un solvant couramment utilisé pour la détection de flavonoïdes et composés phénoliques en CCM classique, notamment dans le cadre de contrôle de drogues végétales à la Pharmacopée. C’est donc le système de solvant qui a été sélectionné.

**Révéléteur** : Le révélateur choisi est le réactif de Neu (diphénylborate), qui forme des chélates avec les flavonoïdes entraînant un effet bathochrome améliorant leur visualisation (dans le visible) et l’émission d’une fluorescence caractéristique jaune à orange à 366nm.

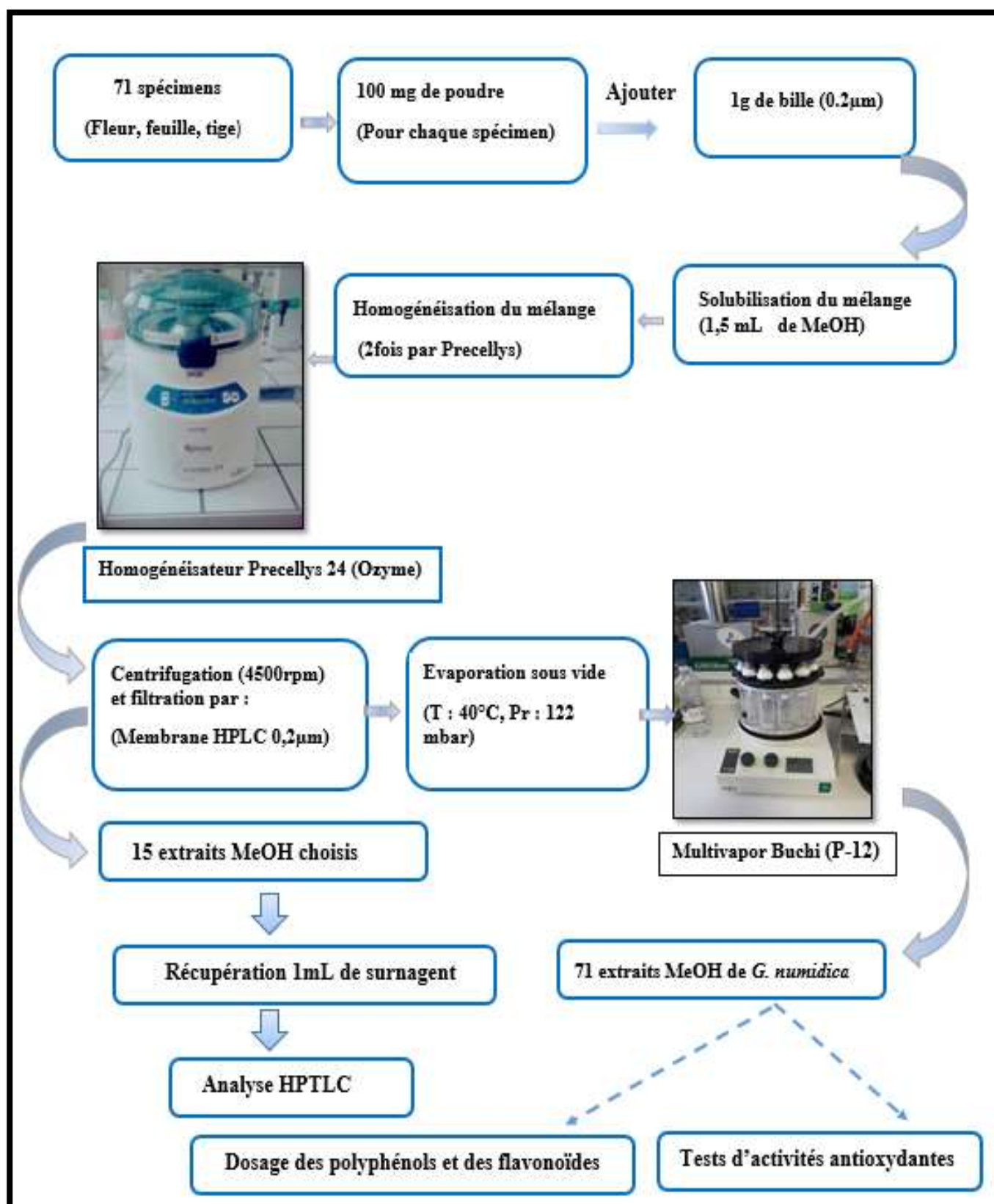
**Phase stationnaire et dépôts** :

|                            |                                                          |
|----------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>Phase stationnaire</b>  | Merck, plaque HPTLC silica gel 60 F 254                  |
| <b>Format de la plaque</b> | 200,0 x 100,0 mm                                         |
| <b>Type d’application</b>  | Bande                                                    |
| <b>Application</b>         | Position Y : 8,0 mm, longueur : 8,0 mm, largeur : 0,0 mm |
| <b>Piste</b>               | Première position X : 20 mm, distance : 11,4 mm          |
| <b>Position du solvant</b> | 70 mm                                                    |

## 2.2 Préparation des extraits méthanoliques de *G. numidica* (Precellys)

Le schéma suivant présente le mode opératoire appliqué conjointement pour l’analyse HPTLC et pour les dosages de polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante (voir chapitre II dosages). Pour l’HPTLC, cette extraction a été réalisée sur 15 extraits choisis de *G.numidica* qui ont été comparés avec 3 extraits de racine, fleur et un isoflavone isolé de l’espèce *Calobota saharea*. Au total, 18 extraits méthanoliques (Tableau 9) ont été préparés selon le protocole suivant : pour 100 mg de poudre de chaque spécimen, on met 1g de bille (0,2 µm), puis 1,5 mL de MeOH sont ajoutés. L’homogénéisation de ce mélange a été faite 2fois à l’aide d’un homogénéisateur (Ozyme Precellys 24). Ensuite, les échantillons sont centrifugés à la centrifugeuse réglée à 4500 pm, pendant 5mn. Après filtration sur membrane de nylon (0,2 µm) on récupère 1mL de surnageant qu’on transfère dans un Vial.





**Figure 20 :** Protocole d'extraction par Precellys des spécimens de *G. numidica* (Jijel et Annaba).



**Tableau 11** : Liste des échantillons analysés par HPTLC.

| Echantillon | Région | Station            | Specimen | Code                              | V (µL) |
|-------------|--------|--------------------|----------|-----------------------------------|--------|
| HPTLC-1     | Jijel  | Laghrifet          | Fleur    | Fleur-Jij-Lg-st <sub>1</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-2     | Jijel  | Laghrifet          | Feuille  | Feuille –Jij-Lg-st <sub>1</sub>   | 10,0   |
| HPTLC-3     | Jijel  | Laghrifet          | Tige     | Tige-Jij-Lg-st <sub>1</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-4     | Jijel  | Grand Phare        | Fleur    | Fleur-Jij-Gp-st <sub>2</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-5     | Jijel  | Grand Phare        | Feuille  | Feuille-Jij-Gp-st <sub>2</sub>    | 10,0   |
| HPTLC-6     | Jijel  | Grand Phare        | Tige     | Tige-Jij-Gp-st <sub>2</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-7     | Annaba | Cap de Garde       | Fleur    | Fleur-Ann-Cg-st <sub>2</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-8     | Annaba | Cap de Garde       | Feuille  | Feuille-Ann-Cg-st <sub>2</sub>    | 10,0   |
| HPTLC-9     | Annaba | Cap de Garde       | Tige     | Tige-Ann-Cg-st <sub>2</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-10    | Annaba | Serraidi           | Fleur    | Fleur-Ann-Ser-st <sub>4</sub>     | 10,0   |
| HPTLC-11    | Annaba | Serraidi           | Feuille  | Feuille-Ann-Ser-st <sub>4</sub>   | 10,0   |
| HPTLC-12    | Annaba | Serraidi           | Tige     | tige-Ann-Serr-st <sub>4</sub>     | 10,0   |
| HPTLC-13    | M'Sila | Boussaâda          | Racine   | Racine de <i>Calobota saharea</i> | 10,0   |
| HPTLC-14    | M'Sila | Boussaâda          | Fleur    | Fleur de <i>Calobota saharea</i>  | 10,0   |
| HPTLC-15    | M'Sila | Boussaâda (témoin) | -        | Isoflavone (molécule pure)        | 10,0   |

### 3 Fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. numidica* par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Dans cette partie du travail, nous avons mis en œuvre un fractionnement uniquement sur l'extrait méthanolique de *G. numidica* provenant de la région de Jijel (station Laghrifet). Ce fractionnement a été réalisé en utilisant la chromatographie de partage centrifuge (CPC)

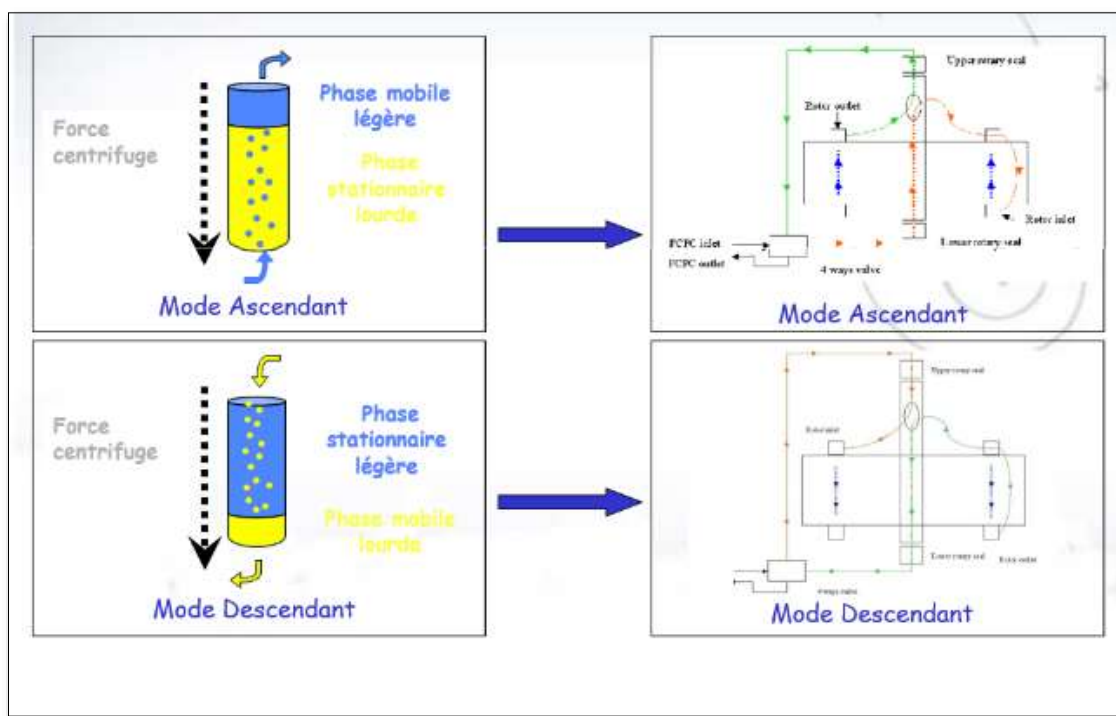
#### 3.1 Principe de la chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La CPC est une méthode de chromatographie liquide /liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système biphasique de solvants. Une phase liquide stationnaire est maintenue dans la colonne par un champ de forces centrifuges, généré par la mise en rotation de la colonne chromatographique. L'autre phase liquide mobile est alors pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se partagent entre les deux phases en fonction de leur coefficient de partages respectifs (Marchal et al., 2003).



**Figure 21 : Chromatographie** de partage centrifuge modèle rotor 250 mL et 1L (Armen instrument SCPC-250+1000-B et collecteur de fractions BUCHI-684).

Quand la colonne est mise en rotation, le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La pompe permet de faire passer la phase mobile à travers la phase stationnaire, permettant l'échange entre les deux phases. Lorsque la phase inférieure (souvent la phase aqueuse) est la phase stationnaire, la phase mobile (souvent la phase organique) est pompée en mode ascendant dans la cellule. Inversement lorsque la phase supérieure est la phase stationnaire, la phase mobile est pompée en mode descendant (voir figure 22).



**Figure 22 :** Représentation schématique des deux modes d'élutions en CPC.

### 3.2 Mise au point des conditions de séparation par CPC

Le système biphasique de solvant adopté pour cette analyse, est un mélange quaternaire (Cyclohexane/Acétone/MeOH/H<sub>2</sub>O), (1/2/1/2, v/v/v/v). A l'aide d'une grande ampoule à décanter (5L), le mélange quaternaire ainsi préparé est séparé en deux phases (supérieure et inférieure).

Après remplissage avec la phase stationnaire (phase inférieure) à vitesse lente (200 tr/min), la rotation a été augmentée à 1600 tr/min et la phase mobile pompée dans le système. Il est à noter qu'avant la mise en marche du rotor, la phase inférieure est pompée dans la colonne du rotor jusqu'à son remplissage 250 mL. Après injection de l'extrait méthanolique de *G. numidica* (Jijel), on a récupéré au total 24 fractions de 30mL. On a ensuite procédé à l'extrusion en pompant la phase inférieure à 30 mL/min et 600tr/min, et on a récupéré 20fractions de 30 mL. Toutes les fractions ont été évaporées sous pression réduite et pesées, après réalisation d'une analyse CCM.

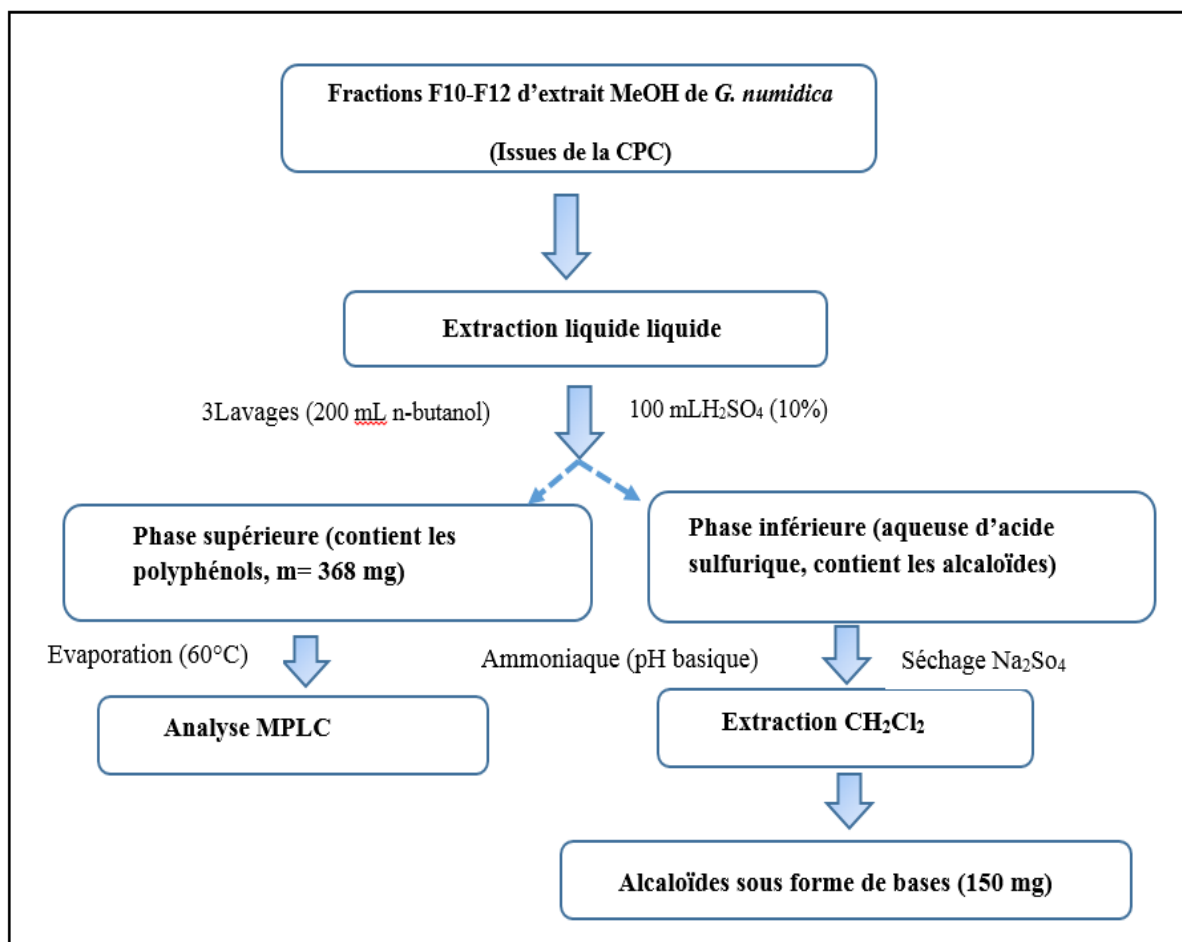
#### **4 Purification par colonne de chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) des fractions F10 à F12**

La chromatographie en phase liquide à moyenne pression (MPLC) est une chromatographie liquide sur colonne avec une pression suffisante générée par la pompe pour pousser le solvant à travers une colonne contenant de la silice en phase normale. Cette opération vise à isoler le flavonoïde majoritaire présent dans les fractions 10 à 12 issues de la CPC.

##### **4.1 Séparation liquide -liquide des fractions F10 à F12.**

Dans une ampoule à décanter de 500 mL, les fractions (F10-F12) issues du fractionnement CPC ont été soumises à une extraction liquide/liquide afin de séparer composés phénoliques et alcaloïdes. Pour cela, on ajoute 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) à 432 mg des fractions récupérées après évaporation. Puis on ajoute soigneusement 200 mL de n-butanol, (3 lavages), on obtient deux phases : une phase inférieure aqueuse (contenant les alcaloïdes) et une phase organique supérieure qui contient les polyphénols. Après évaporation, on a obtenu une masse de 368g qui va subir un autre fractionnement par MPLC.

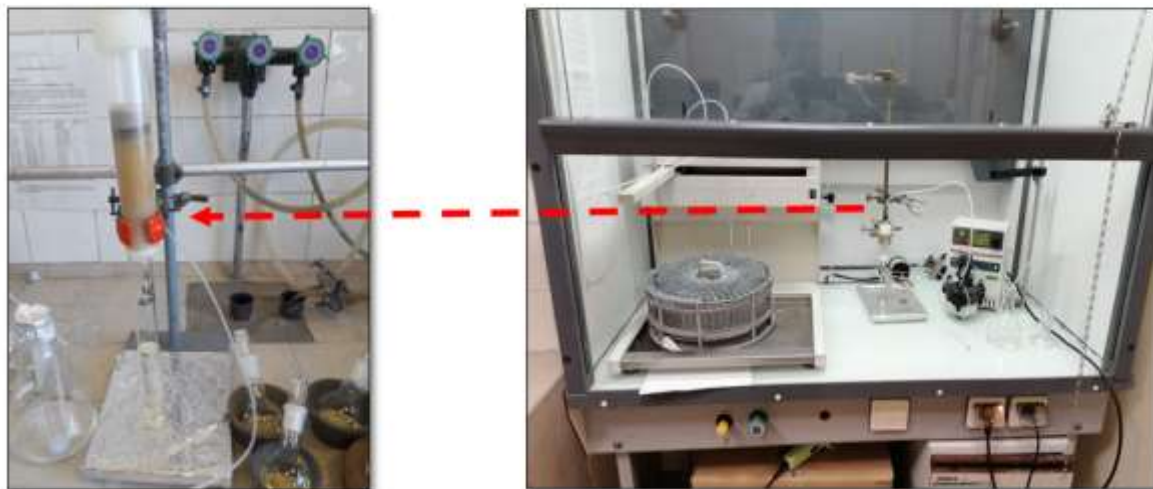
Dans une ampoule à décanter, on verse la phase aqueuse (acide sulfurique) et on ajoute de l'ammoniaque jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Puis, on ajoute 4 volumes de dichlorométhane pour extraire les alcaloïdes. La phase organique séparée est séchée par le sulfate de sodium. Après filtration et évaporation, on obtient les alcaloïdes purs sous forme de base (150mg) (voir figure 23).



**Figure 23 :** Protocole d'extraction liquide -liquide pour MPLC.

#### 4.2 Mise en œuvre de la chromatographie MPLC

- **Dépôt** : Dans un ballon de 250 mL, on solubilise dans le méthanol un mélange constitué de : 368 mg de l'extrait polyphénolique de *G. numidica* récupéré par l'extraction liquide/liquide et 1g de Silice 60 M (0,04-0,063mm). Le résidu sec récupéré après évaporation sous vide constitue le dépôt qui sera chromatographié.
- **Phase mobile** : Gradient de cyclohexane /acétate d'éthyle à différentes concentrations.
- La phase stationnaire : **12g de Silice 60 M (0,04-0,063mm)**
- Débit : **5- 10 mL/min,**
- Pression: **0,2bar, Pression max: 7,00bar.**



**Figure 24 :** MPLC à gradient (Buchi, modèle C-615).

### 5 Analyse structurale des fractions issues de la MPLC par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique basée sur l'évolution du moment magnétique des noyaux placés dans un champ magnétique. Cette technique expérimentale permet d'obtenir des informations concernant l'environnement local du noyau étudié. Les analyses RMN des fractions obtenues après la purification par MPLC, ont été réalisées sur des appareils Bruker Avance III HD, Wissembourg, France, (400 MHz et 300 MHz). Les solvants deutérés utilisés sont CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>. Le traitement des données a été effectué par le logiciel Topspin ©(Bruker).

6 mg des fractions ciblées sont solubilisés dans 0,6 mL de solvant deutéré, MeOD ou/et DMSO-d<sub>6</sub> (Sigma Aldrich), et placés dans des tubes RMN.

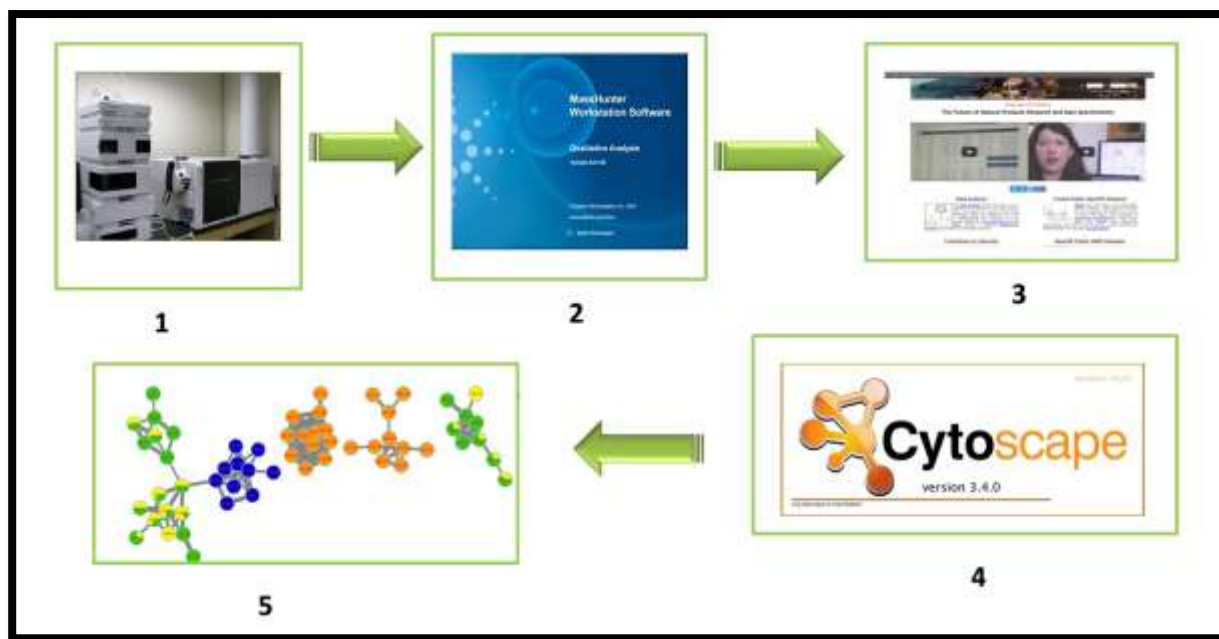


**Figure 25 :** Spectromètre de RMN Bruker Avance III HD 400 MHz.

## 6 Visualisation des réseaux moléculaires (Molecular Networking)

Les données de LC-MS<sup>2</sup> peuvent être traitées de manière à créer des réseaux moléculaires qui sont l'image des ions identifiés lors de l'analyse, et surtout du lien de parenté structurale entre ces ions. En effet, la fragmentation MS/MS est beaucoup plus caractéristique d'une molécule et plus discriminatoire que la MS seule. Le schéma de fragmentation MS/MS dépend de la structure et de l'occurrence des groupes fonctionnels et de leur réactivité dans la dissociation induite par collision en phase gazeuse. Cette méthode a été développée par Dorrestein et ses collaborateurs qui ont conçu un outil de création de lien de parenté structurale basée sur la fragmentation en spectrométrie de masse, et ainsi la mise en réseau de un ou plusieurs composés structurellement proches.

Ainsi, cette mise en réseau moléculaire permet notamment de relier à des composés connus (identifiés à l'aide de standards ou par déréplication) leurs analogues connexes. Le flux opérationnel « workflow » est décrit ici :



**Figure 26** : Principales étapes de la création des réseaux moléculaires.



## 6.1 Mise en œuvre des réseaux moléculaires

La collecte de spectres MS/MS est souvent acquise en couplage HPLC-MS avec spectromètres MS Orbitrap ou QToF (temps de vol).

## 6.2 Acquisition de données

Le traitement des données collectées est essentiel pour générer le fichier MGF correspondant, avec les informations MS, MS/MS, charge et temps de conservation pour chaque pic détecté dans les chromatogrammes LC-MS. Les logiciels Mass-Hunter et Mz-mine peuvent générer des fichiers MGF à l'issue du traitement des données. Le fichier .mgf contient la liste de tous les ions détectés et des fragments associés.

## 6.3 Création du fichier MGF

Le réseau moléculaire est généré dans la plateforme en ligne en d'accès libre GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) : <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>.



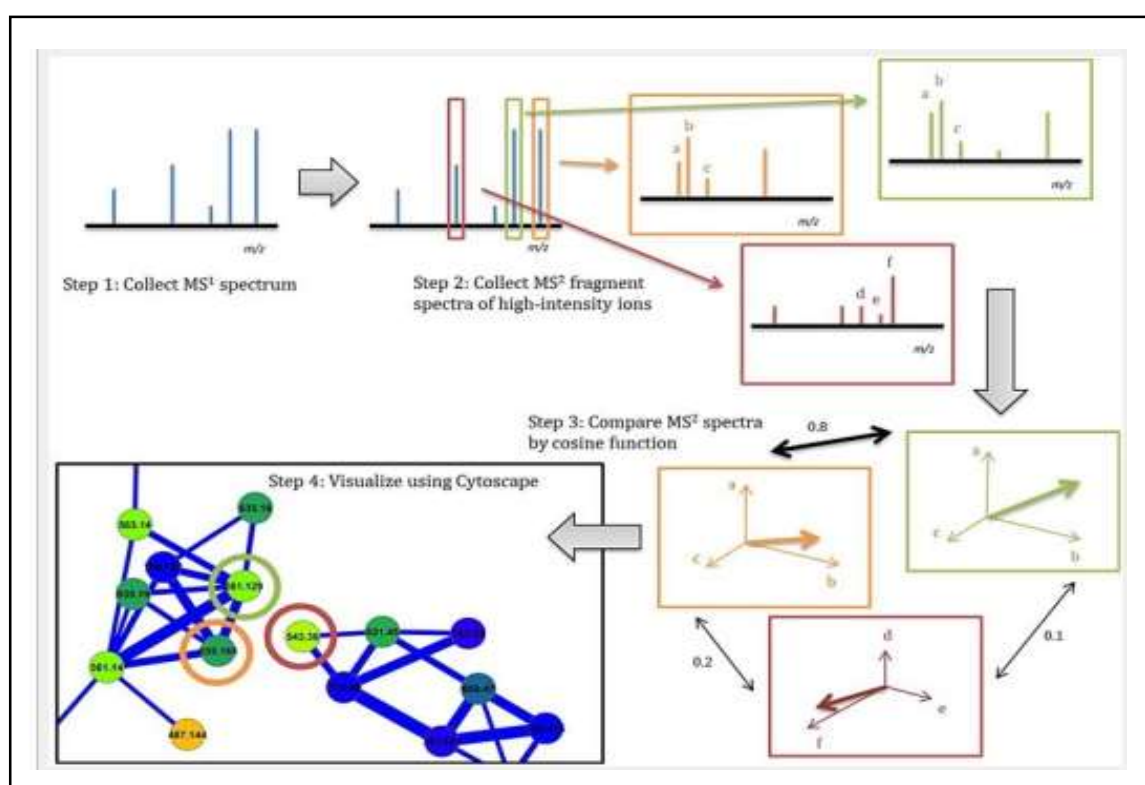
Les fichiers .mgf sont chargés sur la plateforme.

- Fichiers mgf des différents extraits.
- Fichiers mgf des standards :
- On peut définir des groupes de chromatogrammes (groupmapping) pour pouvoir les discriminer dans le réseau final sur une base arbitraire (origine géographique, partie de plante, activité biologique etc...) (par des codes couleurs notamment).



Là encore, plusieurs paramètres (Network options) peuvent être fixés afin de générer un réseau, c'est là qu'on peut notamment fixer la tolérance pour la valeur de masse de l'ion parent et de l'ion fragment. C'est également là qu'on définit la valeur de cosinus qui sera retenue pour créer un lien entre deux ions. On peut également fixer le nombre maximal de liens qu'on souhaite visualiser par « nœud » (node).

Le paramètre « cosinus » est la valeur du cosinus de l'angle entre deux vecteurs. Ces vecteurs sont la traduction de la similarité entre les spectres de fragmentation de deux composés. Plus ces composés sont proches structuralement, plus la valeur de cosinus est proche de 1.



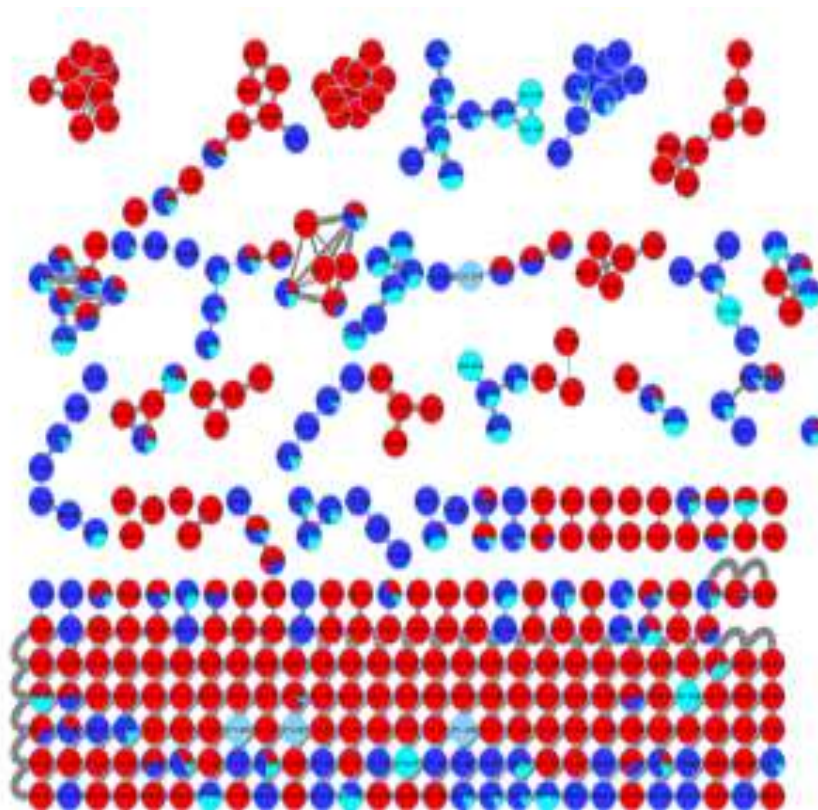
**Figure 27 :** Bases de calcul du paramètre « Cosinus » - tiré de (Boudreau et al. 2015)

#### 6.4 Génération des réseaux moléculaires

Enfin, le logiciel Cytoscape permet de construire le réseau moléculaire à partir des fichiers issus du GNPS. La plateforme GNPS traite les fichiers .mgf et renvoie des fichiers contenant les informations nécessaires à la création du réseau :

- La liste des ions parents (avec le m/z et temps de rétention pour chaque ion)
- La liste des liens établis entre ions selon leur similarité structurale
- Les valeurs cosinus attribuées à chaque lien.

Le logiciel Cytoscape permet de visualiser l'ensemble de ces liens dans un plan. Un code couleur peut être attribué selon le groupe auquel est rattaché l'ion parent. Ainsi si un ion est présent dans deux groupes différents, un camembert (« chart ») montre la contribution d'un groupe ou d'un autre en ce composé.



**Figure 28 :** Exemple de réseau issu de l'analyse par Cytoscape de chromatogrammes rattachés à des groupes différents (groupe 1 en rouge, groupe 2 en bleu foncé et groupe 3 en bleu clair).

### 6.5 Annotation du réseau moléculaire

Le réseau peut être annoté de différentes manières. On peut visualiser les valeurs de  $m/z$  des ions parents, les temps de rétention, ou même des structures identifiées dans la plateforme GNPS. On peut associer ces informations au groupmapping, et donc savoir quels ions sont présents dans tel ou tel groupe (zone géographique, partie de plante, fraction active ou inactive biologiquement).

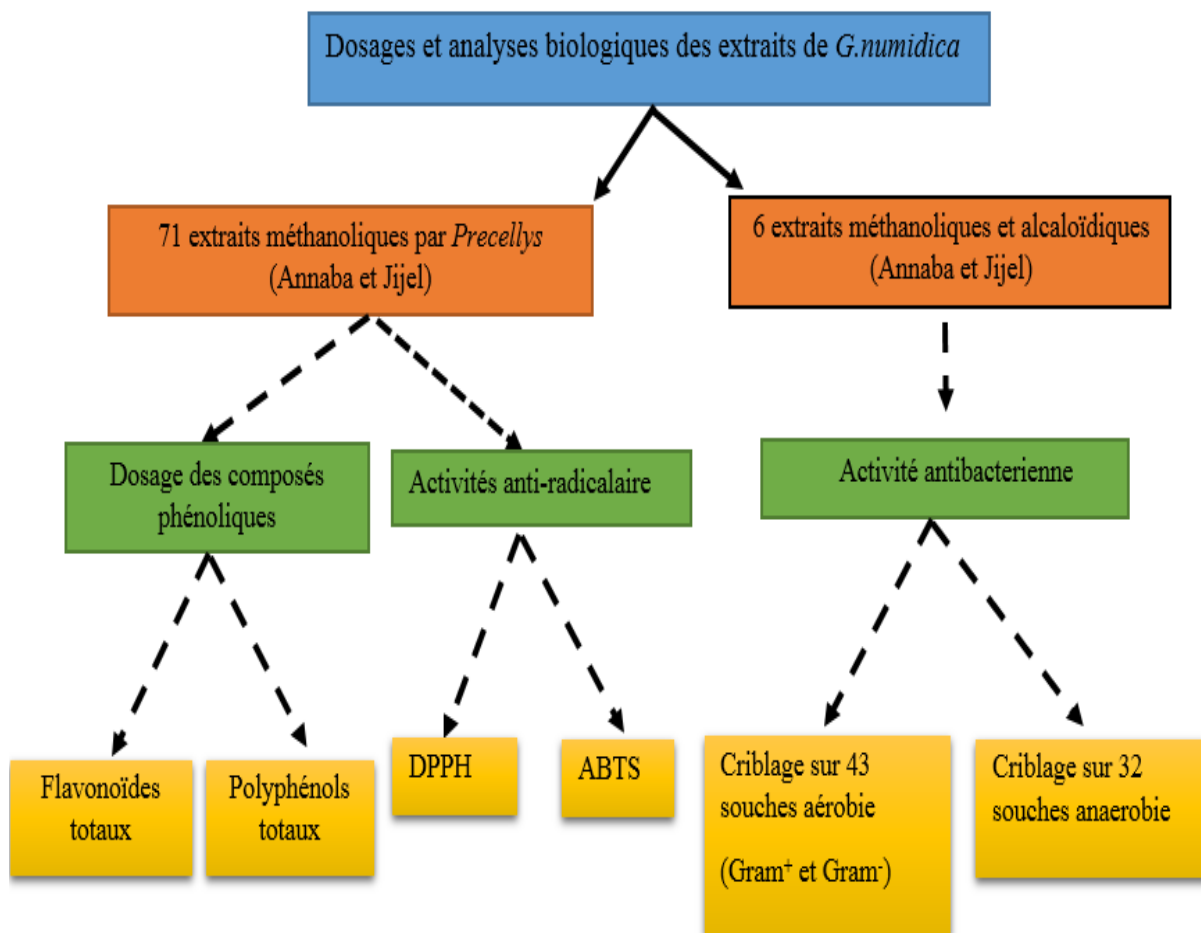
Cette étape correspond à une déréplication puisqu'elle fait le lien entre une valeur de  $m/z$  et un composé présent dans la base de données du GNPS.

La plupart du temps, plusieurs structures potentielles sont identifiées. L'utilisateur doit donc effectuer un travail de tri.

Une fois les structures confirmées (éventuellement par l'utilisation de standards), on peut identifier les composés proches structuralement.

**Chapitre III : Dosages et analyses biologiques**

Les différents dosages et analyses biologiques effectués sur l'ensemble des extraits méthanoliques et alcaloïdiques de *G.numidica* sont présentés suivant le schéma en dessous.



## 1 Dosage des composés phénoliques des extraits

### 1.1 Extraction des spécimens de *G.numidica* par (Precellys)

Cette extraction a été réalisée sur l'ensemble des 71 échantillons de *G. numidica* et 24 spécimens d'autres espèces de *Genista* (voir tableau liste de 71 échantillons) selon le même protocole que la préparation des extraits pour analyse HPTLC : pour 100 mg de poudre de chaque spécimen, on a mis 1g de bille (0,2µm), puis 1,5ml de MeOH est ajouté. L'homogénéisation de ce mélange a été faite 2 fois à l'aide d'un homogénéisateur (Ozyme Precellys 24). Ensuite, on passe les échantillons à la centrifugeuse réglée à 4500 pm, pendant 5mn. Après filtration sur membranes en nylon (0, 2µm) le solvant est évaporé à l'aide d'un mulivapor Buchi (P-12), réglé à 40°C et une pression de 122 mbar.

### 1.2 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu d'après Clarcke et ses collaborateurs (2013). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique (La méthode détaillée est décrite dans la partie *Pistacia lentiscus*).

### 1.3 Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés par la méthode de trichlorure d'aluminium d'après Bampouli et ses collaborateurs (2015) (La méthode détaillée est décrite dans la partie *Pistacia lentiscus*).

## 2 Activité antiradicalaire des extraits

L'étude de l'activité antioxydante de 71 extraits méthanoliques de *Genista numidica* est testée selon deux méthodes : piégeage du radical libre DPPH, Piégeage de l'ABTS.

### 2.1 Activité anti-radicalaire DPPH

L'activité inhibitrice du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Clarcke et al., 2013. Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Le protocole détaillé est décrit dans la partie *Pistacia lentiscus*).

### 2.2 Activité anti-radicalaire ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> a été déterminée selon le procédé de Clarcke et al., 2013. (Méthode détaillée dans la partie *Pistacia lentiscus*).

### 3 Activité antibactérienne

Les évaluations de l'activité antibactérienne ont été effectuées au laboratoire de microbiologie, de la faculté de pharmacie de l'Université de Paris sous la direction de Dr Marylin Lesco et l'encadrement du Dr Sergio Ortiz.

Dans cette étude, nous avons testé l'effet des extraits méthanoliques et des extraits alcaloïdiques de *Genista numidica* sur différentes souches bactérienne de référence (American Type Culture Collection (ATCC) et Collection de l'Institut Pasteur (CIP) et des isolats cliniques. Au départ un test de criblage a été utilisé pour sélectionner l'extrait actif en utilisant 43 souches bactériennes qui appartiennent aux différents genres bactériens aérobie à Gram+ et Gram- (Annexe 1). Egalement, l'effet des deux types d'extraits (méthanoliques et alcaloïdiques) de *Genista numidica* a été testé contre des 32 bactéries anaérobies.

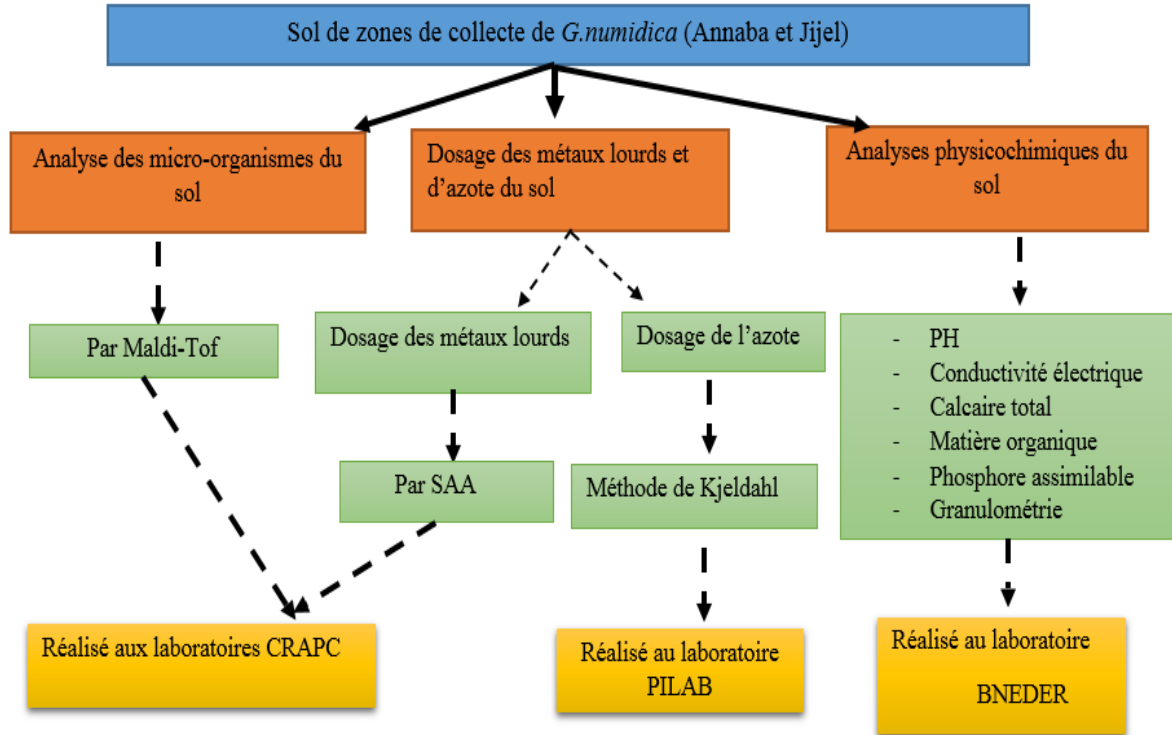
**Tableau 12 :** Extraits évalués pour leur activité antibactérienne.

| Région | Nom de la station              |          | Partie de la plante                           | Echantillons             |
|--------|--------------------------------|----------|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Jijel  | <b>Laghrifet – Grand Phare</b> | <b>1</b> | <b>Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige)</b> | GC-1<br><b>Extrait 5</b> |
| Annaba | <b>Cap de Garde</b>            | <b>1</b> | <b>Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige)</b> | GC-2<br><b>Extrait 6</b> |
| Jijel  | <b>Laghrifet – Grand Phare</b> | <b>1</b> | <b>Partie aérienne</b>                        | GC-3<br><b>Extrait 1</b> |
| Annaba | <b>Cap de Garde</b>            | <b>1</b> | <b>Partie aérienne, pied 1</b>                | GC-4<br><b>Extrait 2</b> |
|        |                                | <b>1</b> | <b>Partie aérienne, pied 2</b>                | GC-5<br><b>Extrait 3</b> |
|        |                                | <b>2</b> | <b>Partie aérienne</b>                        | GC-6<br><b>Extrait 4</b> |

Les extraits sont solubilisés dans les milieux de culture adaptés afin d'obtenir une concentration de 200 µg/mL (Agar Mueller Hinton ou Wilkin-Chalgren) et placés dans des boîtes de Pétri. Après solidification et séchage, les suspensions bactériennes sont inoculées avec un inoculateur de Steers. Les boîtes sont incubées sous conditions aérobies pendant 24h. L'absence de croissance bactérienne est le signe d'une activité antibactérienne.

## Chapitre IV : Analyse du sol des zones d'études

L'ensemble des analyses réalisées sur le sol des deux zones d'études (Annaba et Jijel) sont récapitulés suivant l'organigramme présenté en dessous.



## **1 Analyses physicochimiques du sol**

Les analyses physicochimiques du sol ont été réalisées au niveau du laboratoire du sol du Bureau national pour le développement rural **B.N.E.D.E.R** à Alger, sous la direction de Mme Sam Hassiba. Les techniques d'analyses des différents paramètres, sont extraites des traités habituels de pédologie utilisées par le laboratoire suscit

### **1.1 Méthode d'échantillonnage**

Des échantillons de sol du biotope de *Genista numidica* ont été prélevés dans les deux régions d'études (Annaba et Jijel). Un profil de sol a été réalisé à l'aide d'une tarière manuelle dans les vingt premiers centimètres. Ces échantillons doivent être représentatifs d'un emplacement précis et avoir une quantité suffisante (500g).

### **1.2 Préparation du sol**

Les échantillons des sols prélevés sont séchés à l'air libre pendant 2 jours à température ambiante (25 à 30°C). Ces échantillons séchés, ne sont pas broyés mais simplement forcés à la main au travers d'un tamis de 2mm. Après, ils sont convenablement mélangés pour former un cône, en aplatissant son sommet en quatre portions égales (quadrants), à l'aide d'une règle propre. Ensuite, prélever deux portions ou quadrants diagonaux opposés et remettre les deux autres dans le sac. Enfin, combiner les deux portions ou quadrants et répéter ce processus jusqu'à obtention de la quantité nécessaire pour remplir un gobelet qui sera destiné différentes aux analyses physicochimiques.

### **1.3 Analyse granulométrique**

L'analyse granulométrique consiste à séparer la partie minérale du sol en fractions, selon le diamètre des particules, et à déterminer les proportions relatives à ces fractions. Cette manipulation se fait selon deux étapes :

1. Destruction de la matière organique par l'eau oxygénée.
2. Dispersion des argiles par l'hexamétaphosphate de sodium.

Les fractions grossières, sables grossiers et fins, sont séparées par tamisage, tandis que les fractions fines inférieures à 50µm (limon et argile), selon la loi de stocks, se fait à la pipette Robinson dans des conditions bien déterminées de température et de temps.

#### ➤ Mode opératoire

Peser 5 g de sol, puis ajouter 100 mL d'eau oxygénée à 20 volumes, laisser l'attaque s'effectuer pendant 24 h (remuer avec une baguette de verre) , porter le mélange sur bain de sable 70 °C pendant 2 h . Après, ajouter 40 mL de l'hexamétaphosphate de sodium à une concentration de 50g/L, puis compléter à 200 mL, il est à noter qu'il faut bien homogénéiser le mélange avant le



tamiser sous l'eau à 200  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  au-dessus d'une éprouvette graduée de 1L. Cette étape nous permet la séparation des sables fins et sable grossiers, ces deux fractions sont transférées dans des capsules préalablement pesées à vide, puis séchage dans l'étuve à 105 °C. Après refroidissement, peser à nouveau pour déterminer les fractions grossières (sables grossiers et fins). Ensuite, séparer la suspension limono-argileuse (A + LF + LG) qui est recueillie préalablement dans l'éprouvette lors du tamisage et complétée à 1000 ml, selon les étapes suivantes :

- On pèse 3 piluliers référencés, prévus pour les trois prélèvements. Puis une homogénéisation par retournement, Un prélèvement avec la pipette Robinson de 25 mL de la suspension des argiles, des limons fins et des limons grossiers a été effectué à une profondeur de 12,6 cm après une décantation de 1 min.
- Une homogénéiser à nouveau a été effectuée, on laisse décanter 4 min 30 s, puis on prélève à une profondeur de 10 cm 25 ml les argiles et les limons fins. Ensuite, il faut remuer complètement en suspension le contenu de l'éprouvette et laisser décanter 4 heures, puis on prélève à 5 cm de profondeur pour récupérer les argiles. Enfin, les piluliers sont maintenus dans une étuve à 105°C pendant 24 h, et pesés après refroidissement.

#### **1.4 pH**

La détermination du pH s'effectue en mesurant la force électromotrice qui apparaît entre deux électrodes plongées dans la solution à étudier. L'une d'elle est l'électrode de mesure ou électrode indicatrice (électrode de verre). L'autre est l'électrode de référence ou de comparaison.

Le procédé consiste à ajouter à 20 g de sol tamisé à 2 mm, 50 mL d'eau distillée dégazée. La suspension est agitée puis laissée reposer pendant 18 heures pour permettre à plus d'argiles suspendues de se déposer. Le pH est ensuite mesuré par immersion des électrodes dans la solution claire surnageant à l'aide du pH-mètre.

#### **1.5 Conductivité électrique**

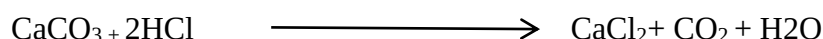
La mesure de la conductivité permet d'obtenir rapidement une estimation de la teneur en sels dissous. Elle est mesurée dans l'extrait de sol à température donnée dans le rapport sol/eau : 1/5 puis agitée pendant 15 minutes sans repos. La valeur de la conductivité du milieu est lue directement sur l'écran digital du conductimètre, elle est exprimée en  $\text{mS}/\text{cm}^2$ .

**1.6 Matière organique**

Le dosage de la matière organique est réalisé selon la méthode Walkley et Black(1934) à partir du dosage de l'un de ses constituants, le carbone présent sous un taux pratiquement constant de 58%. Cette méthode est basée sur l'oxydation du carbone, par le bichromate de potassium en milieu fortement acide.

**1.7 Calcaire total**

La quantité totale de calcaire du sol est déterminée selon la méthode décrite par Duchaufour (1965). Cette méthode utilise le calcimètre de Bernard, elle est basée sur la réaction caractéristique des calcaires en présence de HCl. Il s'agit de comparer le volume de gaz carbonique dégagé par la même réaction du même acide du carbonate de calcium pur et sec en quantité connue, à température et pression constantes. Le dosage est basé sur la réaction suivante :

**➤ Mode opératoire**

Introduire 1g de terre finement broyée, au fond de l'ermeneyer, et les humecter par une quelques gouttes d'eau distillée, puis mettre le tube à hémolyse au  $\frac{3}{4}$  avec HCl et l'introduire avec précaution dans l'ermeneyer en évitant de faire couler l'acide. Boucher convenablement l'ermeneyer en le raccordant au calcimètre. Après avoir vérifié le niveau de référence de la burette et noté sa valeur, verser rapidement l'acide sur l'échantillon en inclinant le flacon. Agiter le flacon jusqu'à cessation du dégagement gazeux. Le volume de CO<sub>2</sub> dégagé est noté sur la burette en prenant soin d'équilibrer les niveaux dans l'ampoule et dans la burette.

**1.8 Phosphore assimilable**

La détermination de phosphore assimilable a été effectuée selon la méthode **d'Olsen et Dean (1965)**. Une solution alcaline de bicarbonate 0,5 M à pH 8,5 est utilisée pour l'extraction des ions phosphates. Le principe général de cette méthode repose sur le fait que dans une solution acide de molybdate contenant des ions orthophosphoriques, un complexe phosphomolybdique se forme et il peut être réduit par un agent réducteur qui est le chlorure stanneux.

Il est cependant nécessaire d'utiliser le charbon actif pour absorber la matière organique qui a tendance à être dissoute par la solution d'extraction et à empêcher la lecture au colorimètre. Le dosage de phosphore se fait au colorimètre à 660 nm de longueur d'onde. Une courbe d'étalonnage est effectuée avec des solutions étalons de 0, 1, 2, 3,4 et 5ppm de phosphore.

## 2 Dosage de l'azote total et des métaux lourds

### 2.1 Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total du sol des deux stations (Annaba et Jijel) a été fait au niveau du laboratoire d'analyse et de contrôle de qualité **PILAB** à Blida (responsable du laboratoire Mr Kebaili Allal).

La méthode utilisée est celle de KJELDAHL. Le principe de la méthode consiste à transformer l'azote des composés organiques en azote ammoniacal par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré et à ébullition. Cet acide oxyde la matière organique, le carbone et l'hydrogène se dégagent sous forme de  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . L'azote transformé en ammoniac est fixé par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à l'état de sulfate d'ammonium. Pour aider à cette transformation, la minéralisation est achevée en présence d'un catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) qui rend l'action de l'acide sulfurique plus oxydante en augmentant la température d'ébullition. L'ammoniac formé est déplacée de sa combinaison en présence d'une quantité de  $\text{NaOH}$  en excès, distillée dans de l'acide borique.

Les différentes étapes de la méthode KJELDAHL sont résumées comme suit :

- **La minéralisation : A chaud et en milieu alcalin, l'ammoniac se dégage selon la réaction :**



- **La distillation : Le  $\text{NH}_3$  est refroidi (Réfrigérant à eau) et recueilli dans l'acide borique selon cette réaction :**



- **Le titrage proprement-dit : Ce complexe obtenu est titré avec l'acide sulfurique :**



### 2.2 Dosage des métaux lourds par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Un dosage des métaux lourds par SAA a été réalisé sur des échantillons de sol et de plante (*Genista numidica*) provenant de Jijel et Annaba.

#### 2.2.1 Minéralisation des échantillons de sols

La minéralisation du sol a été effectuée selon la méthode décrite par Bakircioglu et ces collaborateurs (2012), détaillée dans le chapitre matériel et méthodes de *Pistacia lentiscus*.

### 2.2.2 Minéralisation de la plante (*Genista numidica*)

Pour 0,5g de poudre de *Genista numidica* (partie aérienne), on ajoute 6ml d'  $\text{HNO}_3$  (65%) et 2 mL d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Puis, on laisse le mélange à température ambiante pendant 10min avant le mettre à l'étuve pendant 20min à une température de 110°C. Après refroidissement, les échantillons ont été filtrés dans des fioles jaugées de 50 mL, préparés au préalable, les fioles sont complétées au trait de jauge par l'eau bidistillée. Un blanc composé d'acide nitrique et d'eau oxygéné doit être préparé avec les échantillons à analyser (Application book, Soil total digestion –HRR-EN-13).

## 3 Analyse des micro-organismes du sol par MALDI-TOF

L'analyse des microorganismes du sol de *G.numidica* provenant des deux régions (Annaba et Jijel) a été réalisée au centre de recherche de (CRAPC) dans le laboratoire de microbiologie sous l'encadrement de Mme Kaced Amel.

### 3.1 La spectrométrie de masse MALDI-TOF

#### 3.1.1 Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur une technique d'ionisation, mise au point dans les années 80, et conduisant à l'identification de biomarqueurs de poids moléculaires élevés : il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI : Matrix-Assisted Laser Désorption ionisation). La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides (Cristina C., 2012).

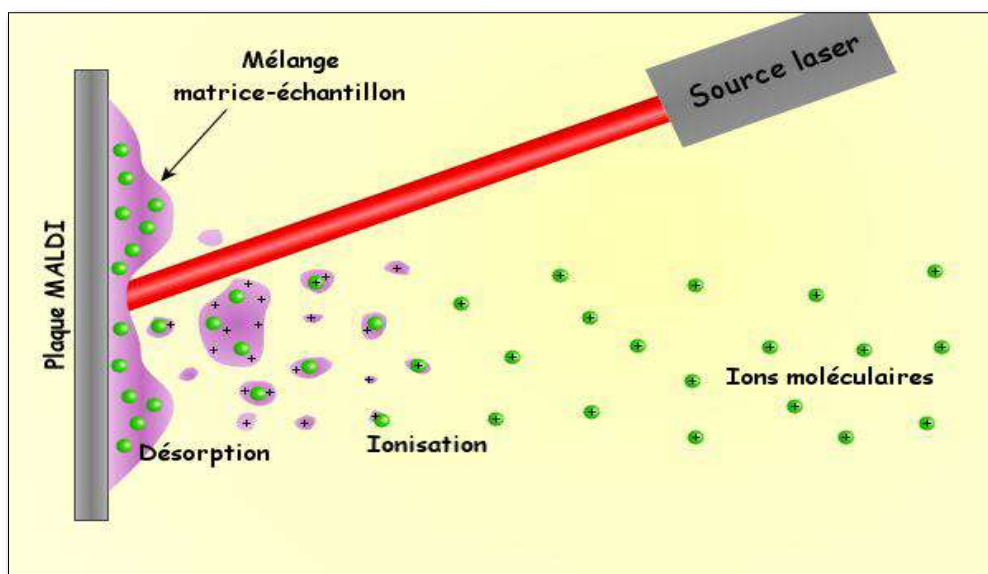


**Figure 29 :** Spectromètre de masse MALDI-TOF laboratoire de la microbiologie (CRAPC).

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge.

Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre.

Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres. Il est à noter que la spectrométrie Maldi-Tof a été adaptée récemment comme technique rapide, précise et peu coûteuse pour la routine des laboratoires de microbiologie (Descy et Meex., 2010).



**Figure 30 :** Principe d'ionisation par la technique MALDI.

L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet) (Cristina., 2012).

### **3.2 Protocole d'isolement des micro-organismes du sol**

#### **3.2.1 Echantillonnage du sol**

Des échantillons de sol ont été prélevés à une profondeur de 20 cm au mois de mars 2019 dans les deux régions d'études (Annaba et Jijel). Ils ont été récoltés le plus près possible des racines d'un individu de *G.numidica*. Trois prélèvements ont été effectués sur chaque zone de collecte, au total on a recueilli 6 échantillons. Ces échantillons de sols sont mis dans des boîtes stériles bien fermées puis étiquetées et conservées dans une glacière. Il est à noter que le changement de gants entre chaque échantillonnage est important afin d'éviter les contaminations d'un autre lieu avec celui tout juste échantillonné.

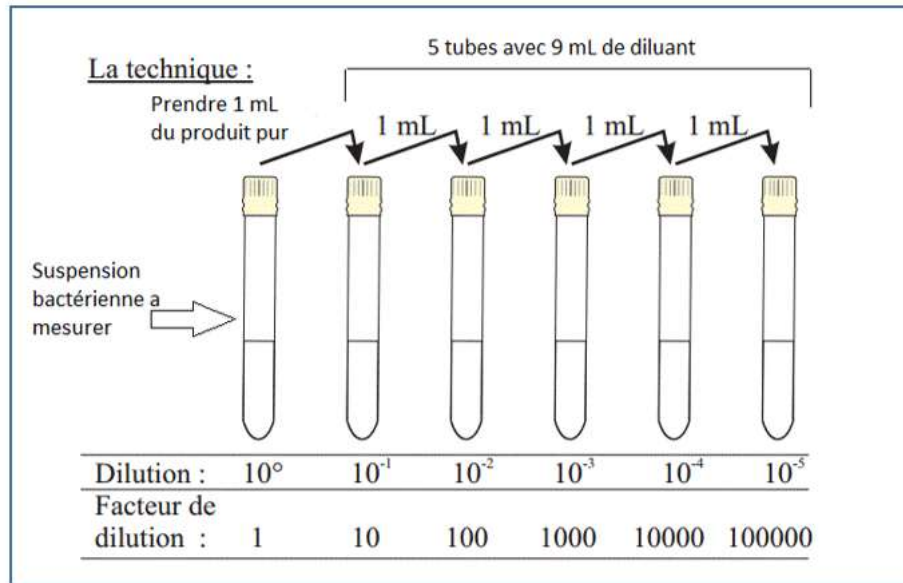
#### **3.2.2 Extraction des micro-organismes du sol**

##### **3.2.2.1 Isolement des actinomycètes**

On transfère 2 g du sol dans un tube stérile contenant 0,2 g de  $\text{CaCO}_3$  et incubé à 26°C pendant 7 à 9 jours dans une atmosphère d'humidité saturante. Cela conduit à une augmentation de 100 fois des colonies de Streptomycètes isolées sur plaque par rapport au témoin non traité. En même temps se produit une diminution de la flore fongique. Quant aux bactéries, la plupart seront éliminées par l'étape de séchage de l'échantillon. Au 9<sup>ème</sup> jour, les tubes sont placés dans un bain-marie à 50 °C pendant 1 h avant de transférer 1g de l'échantillon et les tubes sont suspendus dans 10 mL d'eau physiologique stérile, agités avec un vortex et laissés décanter (ou centrifuger 5 min à 1500 rpm). Chaque suspension constitue la dilution  $10^{-1}$ . Faire des dilutions jusqu'à  $10^{-4}$ . Ensuite, on étale 100  $\mu\text{L}$  des dilutions  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  sur milieu de Bennett en boîtes de Pétri. Incuber au moins une semaine à l'étuve à 30°C.

##### **3.2.2.2 Isolement des bactéries et des champignons**

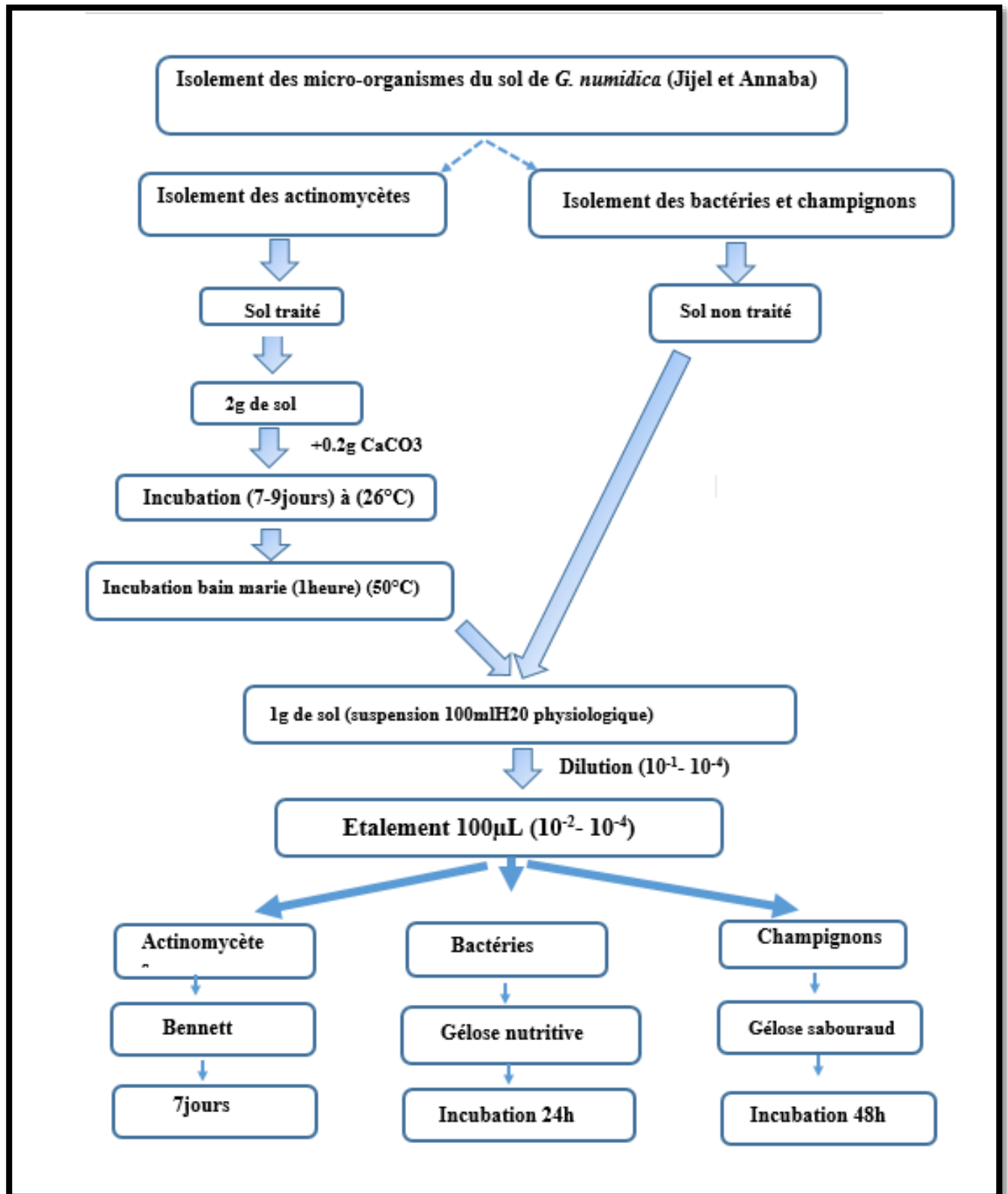
L'isolement des bactéries et des champignons est identique à celle des actinomycètes mais avec l'élimination de l'étape de traitement avec le  $\text{CaCO}_3$  et commence par la suspension de 1g de sol dans 10 ml d'eau physiologique. Quant aux milieux de culture, on a utilisé la Gélose nutritive pour les bactéries et la Gélose sabouraud pour les champignons.



**Figure 31 :** Dilution de la suspension du sol (isolement des microorganismes).

**Tableau 13 :** Identification des échantillons à analyser par Maldi-Tof.

| Nom d'échantillon    | Code d'échantillon | Nom d'échantillon        | Code d'échantillon |
|----------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| Sol traité           |                    | Sol non traité           |                    |
| Sol-Annaba-traité-01 | A-T-01             | Sol-Annaba-traité-01     | A-N-01             |
| Sol-Annaba-traité-02 | A-T-02             | Sol-Annaba-traité-02     | A-N-02             |
| Sol-Annaba-traité-03 | A-T-03             | Sol-Annaba-traité-03     | A-N-03             |
| Sol-Jijel-traité-01  | J-T-01             | Sol-Jijel- non traité-01 | J-N-01             |
| Sol-Jijel-traité-02  | J-T-02             | Sol-Jijel-non traité-02  | J-N-02             |
| Sol-Jijel-traité-03  | J-T-03             | Sol-Jijel--non traité-03 | J-N-03             |



**Figure 32 :** Protocole d'isolement des microorganismes du sol de *G.numidica* (Annaba et Jijel).



### **3.1.2 Analyse par MALDI-TOF**

Pour les bactéries, 1  $\mu$ L de l'acide formique (80%) plus 1  $\mu$ L de la matrice HCCA sont ajoutés à une colonie de souche.

Quant aux champignons et actinomycètes la méthode est la suivante :

Une petite quantité de matériel biologique (une colonie ou plus) est placée dans un tube Eppendorf, on y ajoute 300  $\mu$ L d'eau grade HPLC, le tout est mélangé à l'aide d'un agitateur Vortex. On ajoute alors 900  $\mu$ L d'éthanol. Après agitation au Vortex, le mélange est centrifugé pendant 2 min à 13.000 rpm. Le surnageant est récupéré à la pipette. Après centrifugation du culot restant, l'éthanol résiduel est éliminé. Après évaporation totale de l'éthanol à l'air libre, 10 à 100  $\mu$ L d'acide formique 70% sont ajoutés au culot. Le tube est agité au Vortex. Après addition d'un volume équivalent d'acétonitrile, le tube est à nouveau agité. Le tout est centrifugé pendant 2 min à 13.000 rpm. 1  $\mu$ L de surnageant est ensuite sur la cible du Maldi. Après séchage, 1  $\mu$ L de matrice HCCA est ajouté. La matrice est introduite dans l'appareil après séchage.



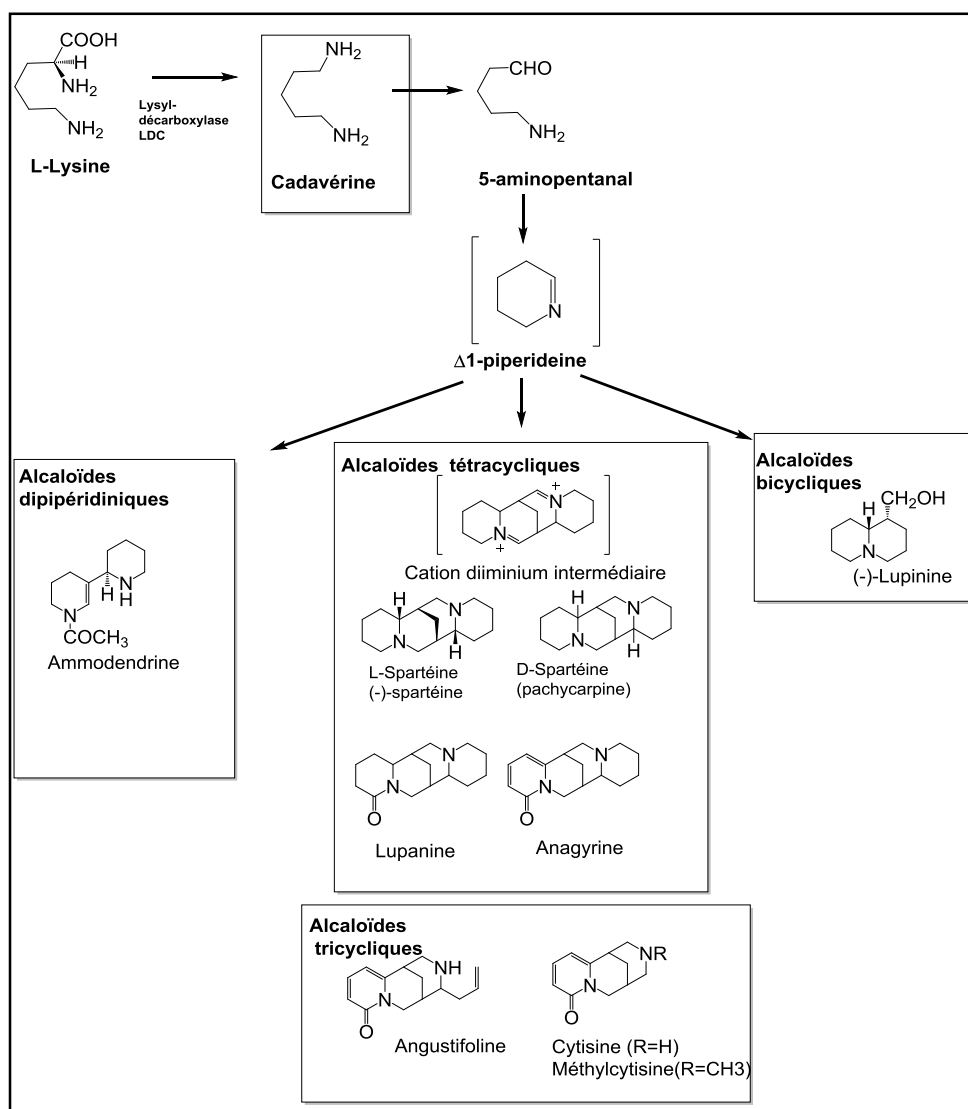
**Figure 33 :** Photo de la cible du Maldi-Tof (CRAPC).

# **Partie III :**

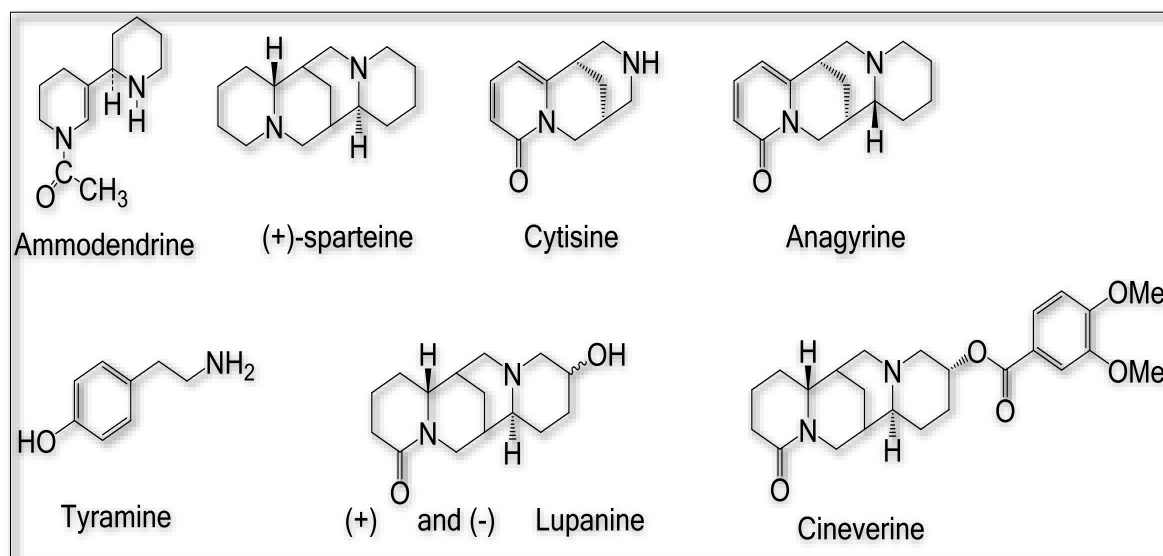
## **Résultats et discussion**

Chapitre I : Investigation phytochimique du *Genista numidica* Spach.1 Identification des alcaloïdes chez les spécimens de *Genista numidica* étudiés.

Les standards ont été choisis sur une base chimiotaxonomiques. En effet, la tribu des Genistae produit des alcaloïdes issus de la lysine, notamment les alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques, mais aussi un peu de dérivés de la tyrosine, telle que la tyramine. Les alcaloïdes quinolizidiniques des Genistae peuvent être bi-tri- ou tetracyclique. La lupanine, précurseur tetracyclique de la spartéine, peut mener aux dérivés oxydés à motif  $\alpha$ -pyridone, tels que la cytisine ou l'anagrine.



**Figure 34** : Principales classes d'alcaloïdes issus de la lysine retrouvées chez les Fabaceae.



**Figure 35 :** Structure des standards utilisés.

### 1.1 Identification des alcaloïdes de *Genista numidica* Spach par déréplication HPLC-UV-MS/MS

L'analyse par HPLC-UV-MS/MS a été envisagée sur les échantillons de *Genista numidica* issus des deux régions d'étude Jijel et Annaba. Pour ces deux régions, plusieurs stations ont été étudiées. Pour une petite quantité des spécimens collectés, la séparation des 3 parties fleurs, feuilles et tiges a été envisagée. Pour ces échantillons, une extraction au méthanol par ultrasons a été mise en œuvre. A titre de comparaison, une extraction alcaloïdique classique a été envisagée pour un des échantillons (Jijel, Station 1). Le tableau suivant représente la liste des échantillons analysés.

**Tableau 14 :** Liste des échantillons analysés par HPLC-UV-MS/MS.

| Extraits                                      | Echantillon  | Région | Station      | Spécimens | Code                 |
|-----------------------------------------------|--------------|--------|--------------|-----------|----------------------|
| <i>Méthanoliques</i><br>( <i>G.numidica</i> ) | <b>LC-1</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-fleur-lg-st1   |
|                                               | <b>LC-2</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st1 |
|                                               | <b>LC-3</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-Lg-St1    |
|                                               | <b>LC-4</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st2   |
|                                               | <b>LC-5</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st2 |
|                                               | <b>LC-6</b>  | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-Lg-St2    |
|                                               | <b>LC-7</b>  | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-Cg-st2     |
|                                               | <b>LC-8</b>  | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St2   |
|                                               | <b>LC-9</b>  | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-Cg-St2      |
|                                               | <b>LC-10</b> | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-St3        |
|                                               | <b>LC-11</b> | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-St3      |
|                                               | <b>LC-12</b> | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-St3         |
|                                               | <b>LC-13</b> | Annaba | Cap de Garde | Fleur     | Ann-fleur-St4        |
|                                               | <b>LC-14</b> | Annaba | Cap de Garde | Feuille   | Ann-feuille-St4      |
|                                               | <b>LC-15</b> | Annaba | Cap de Garde | Tige      | Ann-tige-St4         |
| <i>Alcaloïdique</i><br>( <i>G.numidica</i> )  | <b>LC-16</b> | Jijel  | Laghrifet    | Fleur     | Jijel-Fleur-St1      |
|                                               | <b>LC-17</b> | Jijel  | Laghrifet    | Feuille   | Jijel-Feuille-St1    |
|                                               | <b>LC-18</b> | Jijel  | Laghrifet    | Tige      | Jijel-tige-St1       |

Le traitement des données issues de l'analyse HPLC-MS/MS a été réalisé à l'aide du logiciel Mz-Mine 2.53. Parmi les échantillons injectés, les données des échantillons LC-1, 2,3 et LC-16, 17,18 n'ont malheureusement pas pu être exploitées. Seuls les résultats obtenus pour 12 des 18 extraits sont donc présentés ici. Pour chaque pic, le relevé des temps de rétention, des valeurs de m/z des ions parents et les valeurs des fragments obtenus à l'issus de la MS<sup>2</sup> sont présentés dans le tableau ci-dessous :

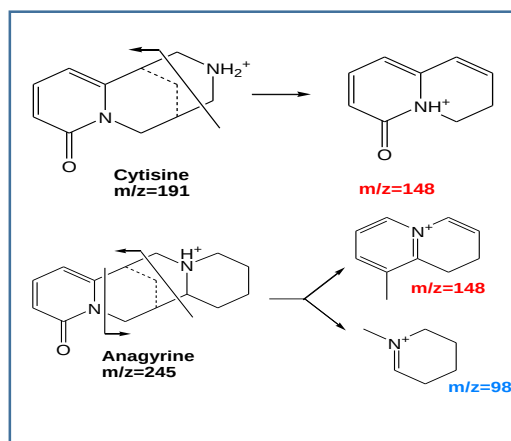
### Troisième partie : Résultats et discussion

#### Chapitre I : Investigation phytochimique du *Genista numidica* Spach.

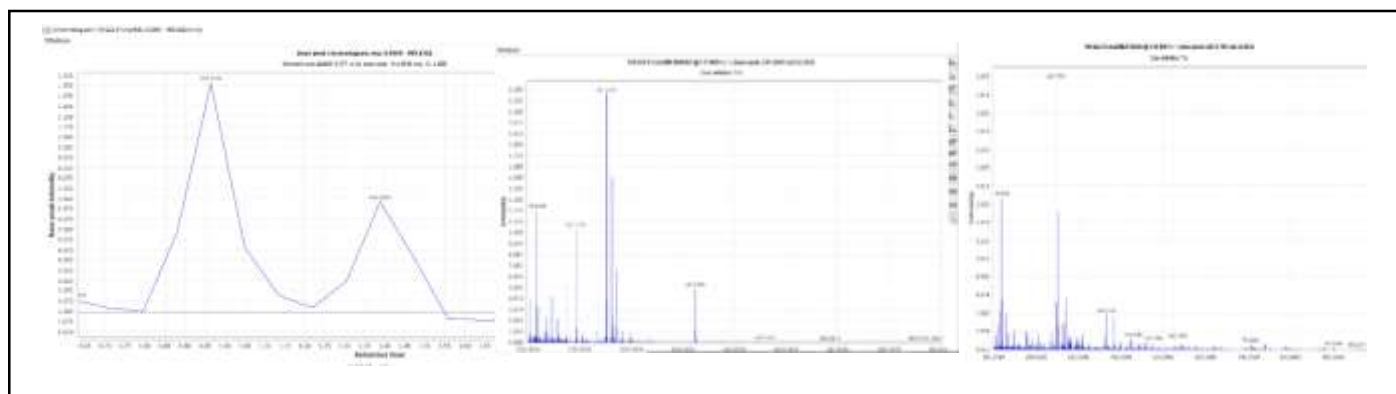
**Tableau 15 :** Temps de rétention, valeurs de m/z des ions parents et fragments des standards et des pics présents sur les chromatogrammes de *Genista numidica*.

| Composés                   | Tr (min)    | m/z             | Fragments                                                             |
|----------------------------|-------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Standards                  |             |                 |                                                                       |
| <b>Ammodendrine</b>        | <b>2,91</b> | <b>209,1668</b> | <b>133,1011 ; 91,0544 ; 77,0389 ; 51,023</b>                          |
| <b>Tyramine</b>            | <b>1,30</b> | <b>138,0913</b> | <b>121,0645 ; 77, 0388 ; 51,0240</b>                                  |
| <b>Cytisine</b>            | <b>1,21</b> | <b>191,1091</b> | <b>148,0759 ; 82,0653 ; 77,0389</b>                                   |
| <b>Anagryne</b>            | <b>1,38</b> | <b>245,1557</b> | <b>216,1301 ; 186,0988 ; 148,1062 ; 98,0932 ; 70,0628</b>             |
| <b>Sparteine</b>           | <b>1,39</b> | <b>235,2169</b> | <b>134,0958 ; 98,0964 ; 70,0658 ; 55,0552</b>                         |
| <b>(+) et (-) Lupanine</b> | <b>1,46</b> | <b>249,1915</b> | <b>204,1365 ; 136,1122 ; 150,1278 ; 84,0812 ; 70,0660</b>             |
| <b>Cinévrine</b>           | <b>7,82</b> | <b>429,2318</b> | <b>385,2069 ; 316,1534 ; 247,1800 ; 193,1336 ; 112,0756 ; 55,0188</b> |
| Extraits                   |             |                 |                                                                       |
| <b>A</b>                   | <b>0,96</b> | <b>251,2-</b>   | <b>148,1221 ; 98,1045 ; 70,0713</b>                                   |
| <b>B (Cytisine)</b>        | <b>1,05</b> | <b>191,1-</b>   | <b>148,0876 ; 82,0687</b>                                             |
| <b>C (Anagryne)</b>        | <b>1,30</b> | <b>245,1-</b>   | <b>148,1133 ; 98,0985 ; 70,0676</b>                                   |
| <b>D (Sparteine)</b>       | <b>1,39</b> | <b>235,2-</b>   | <b>205,0225 ; 149,0117 ; 98,0912</b>                                  |
| <b>E</b>                   | <b>1,90</b> | <b>267,1-</b>   | <b>208,1865 ; 134,0967 ; 98, 0987 ; 70,0649</b>                       |
| <b>F</b>                   | <b>2,06</b> | <b>279,2-</b>   | <b>247,1846 ; 188,1364 ; 134,0976 ; 98,0978</b>                       |

Parmi les 7 composés utilisés comme standards, 3 composés ont été identifiés dans les 12 extraits de *Genista numidica*. Il s'agit de 3 alcaloïdes quinolizidiniques, la cytisine (B), l'anagryne (C), et sparteine (D). Des fragments caractéristiques d'alcaloïdes quinolizidiniques ont été identifiés, notamment m/z 148,1 ; 98,09 ; 70,06. Le fragment 148,1 est typique de la fragmentation du motif  $\alpha$ -pyridone.

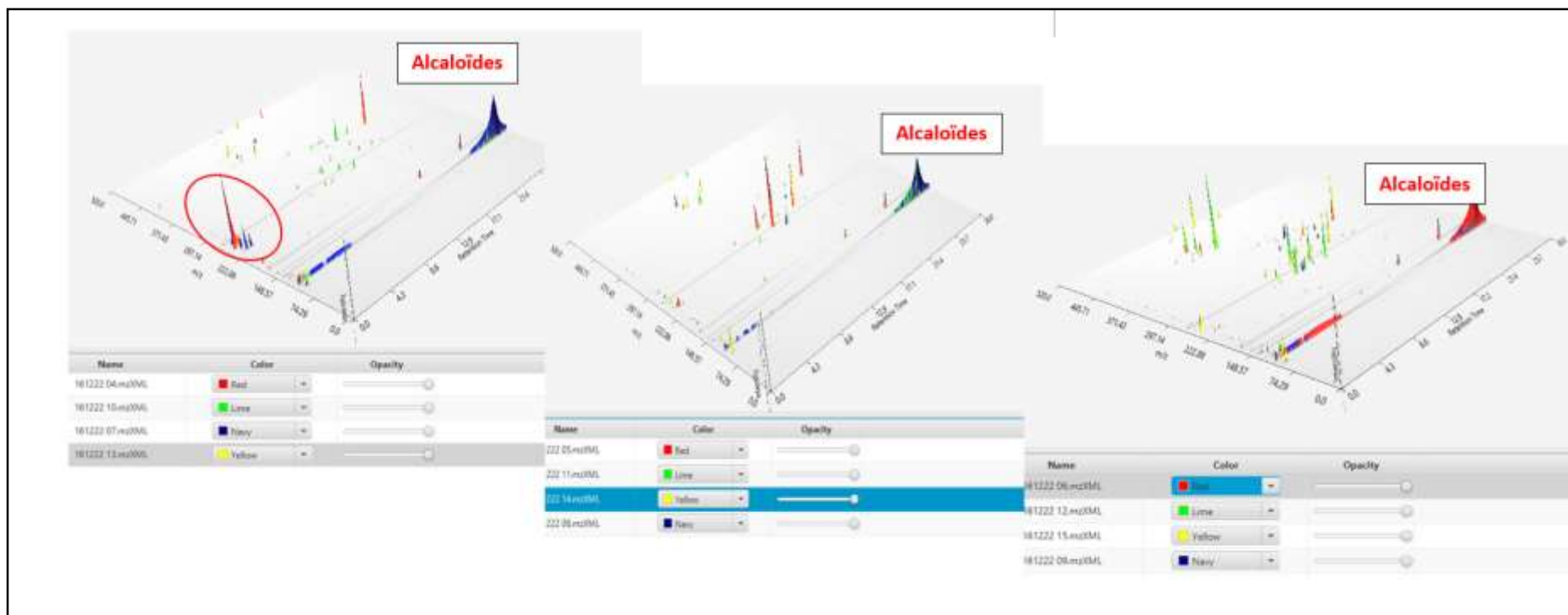


**Figure 36 :** Schéma de fragmentation des alcaloïdes quinolizidiniques.



**Figure 37 :** Pic A+B (Tr=0,96, m/z=251,2125 et m/z 191,1149), pic C et D (Tr=1,39, m/z 245,1700 et m/z=235,2225), issus du chromatogramme de l'échantillon 7 (Logiciel Mz-Mine. 2.53)

Nous observons qu'en plus des 3 alcaloïdes identifiés au niveau des pics B et C et D, les pics A, E et F correspondent également à des alcaloïdes quinolizidiniques compte-tenu de la présence des mêmes fragments caractéristiques ( $m/z$  : 148 et 98). On note que le fragment à 148 ne s'observe que pour les alcaloïdes porteurs du motif  $\alpha$ -pyridone, alors que le fragment à  $m/z$  98 s'observe également pour les autres alcaloïdes quinolizidiniques. La Figure 38 montre la visualisation en 3D des chromatogrammes pour les 3 groupes fleurs feuilles et tiges des différentes zones de collectes. On observe que les fleurs contiennent une proportion plus importante d'alcaloïdes (zone entourée en rouge : Tr 0,9 à 1,4) par rapport aux autres constituants (composés phénoliques dans la zone de temps de rétention >12 minutes).



**Figure 38 :** Visualisation 3D des chromatogrammes d'extraits de fleurs (4,7,10,13), feuilles (5,8,11,14) et tiges (6,9,12,15) - **Jijel Station 2**, **Annaba station 2** ,**Annaba station 3**, **Annaba station 4** - (Logiciel Mz-mine 2.5)



## 1.2 Identification des alcaloïdes de *Genista numidica* Spach par déréplication GC-MS

L'identification par HPLC-MS/MS a permis d'identifier certains alcaloïdes, cependant plusieurs pics restent non identifiés. Nous avons donc opté pour la déréplication par GC-MS compte-tenu de la possibilité de rechercher la similarité des composés détectés dans une base de données relativement large pour les composés volatils (base NIST).

La préparation des extraits alcaloïdiques des parties aériennes (pas de séparation fleur/feuille/tige) a été réalisée sur les deux spécimens pour lesquels une quantité importante de matériel végétal était disponible : Jijel Laghrifet – Grand Phare – Station 1 et Annaba Cap de Garde – Station 1 (échantillons GC-1 et GC-2), en vue de purification ultérieure des alcaloïdes. Pour ces échantillons, une extraction méthanolique par macération a été effectuée. Les extraits obtenus ont pu être analysés directement par GC-MS (pas de dérivation car suffisamment volatils). Par ailleurs, l'analyse de 4 extraits alcaloïdiques d'échantillons similaires mais obtenus par extraction alcaloïdique classique (imprégnation d'ammoniaque concentrée et extraction par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ont également été analysés (échantillons GC-3 à GC-6).

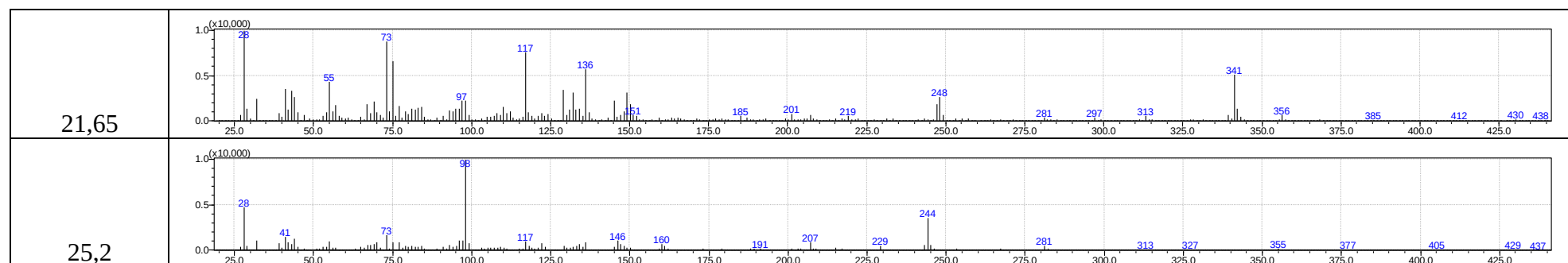
**Tableau 16 :** Echantillons analysés par GC-MS.

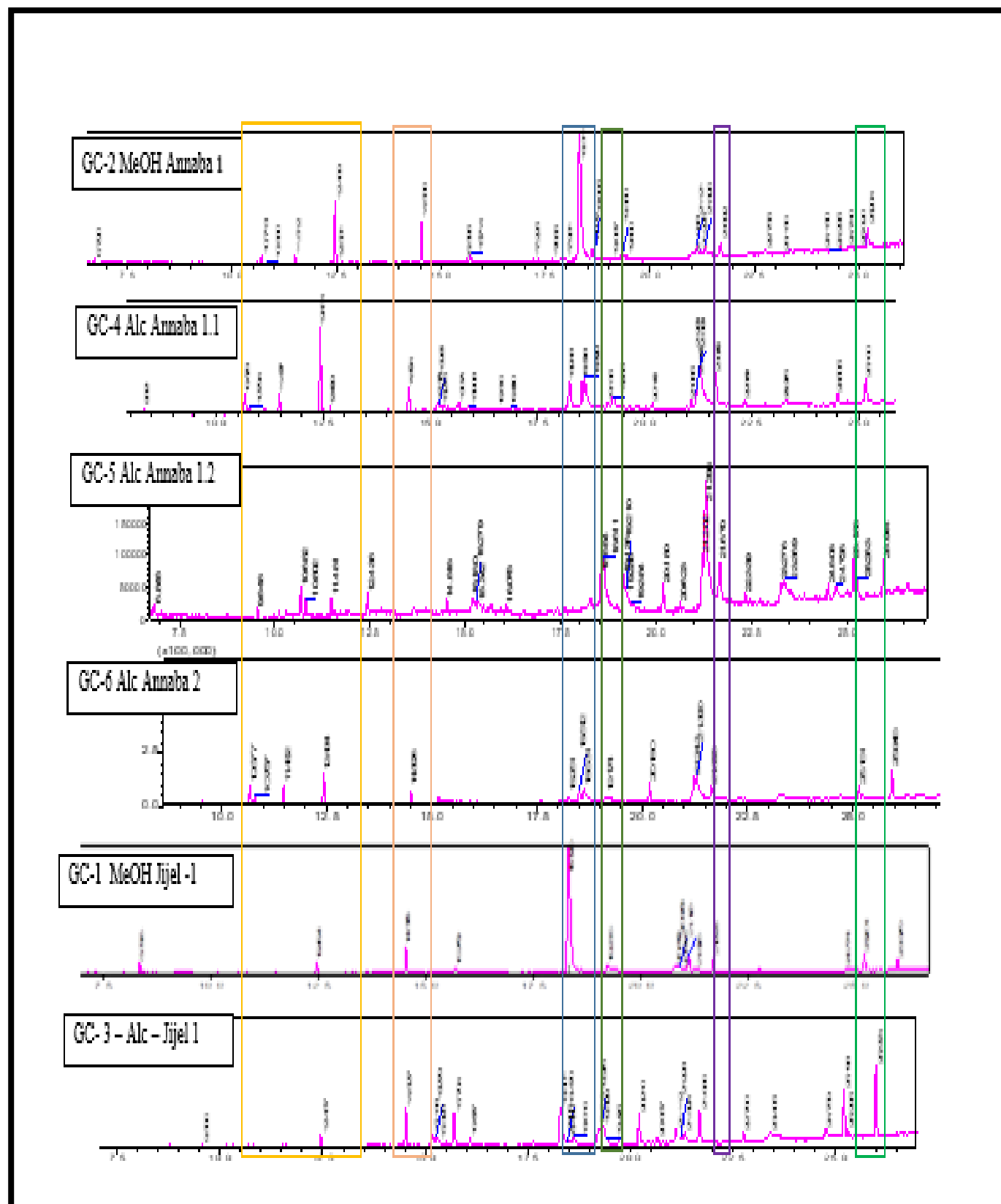
| Nom de la région       | Nom de la station       |   | Partie de la plante                    |                         | Echantillons | Rendement d'extraction |
|------------------------|-------------------------|---|----------------------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|
| Extraits méthanoliques |                         |   |                                        |                         |              |                        |
| Jijel                  | Laghrifet – Grand Phare | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) |                         | GC-1         | 14,24%                 |
| Annaba                 | Cap de Garde            | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) |                         | GC-2         | 13,81 %                |
| Extraits alcaloïdiques |                         |   |                                        |                         |              |                        |
| Jijel                  | Laghrifet – Grand Phare | 1 | Partie aérienne                        |                         | GC-3         | 1,3%                   |
| Annaba                 | Cap de Garde            | 1 |                                        | Partie aérienne, pied 1 | GC-4         | 1,4%                   |
|                        |                         | 1 |                                        | Partie aérienne, pied 2 | GC-5         | 1,2%                   |
|                        |                         | 2 | Partie aérienne                        |                         | GC-6         | 1,7%                   |

**Tableau 17 :** Alcaloïdes identifiés par analyse GC-MS (base NIST) et interprétation des résultats.

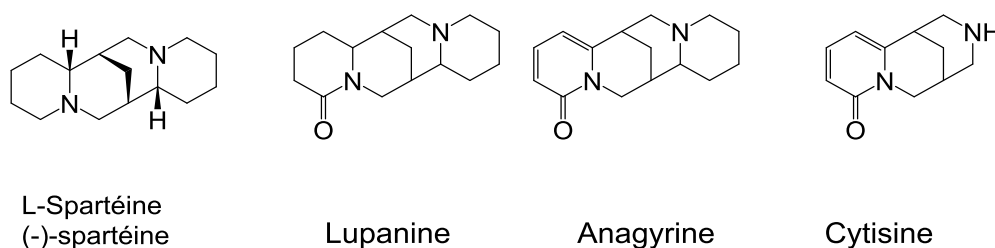
| Tr<br>(min) | Identification NIST            | m/z                                   | Interprétation                      |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 10,69       | 1H-hexahydro-pyrrolizine       | 167, 139, 124, <b>83</b> , 55, 28     | Présence d'un noyau Pyrrolizidine   |
| 11,49       | 1H-hexahydro-pyrrolizine       | 167, 139, 124, <b>83</b> , 55, 28     | Présence d'un noyau Pyrrolizidine - |
| 12,45       | 1H-hexahydro-pyrrolizine       | 167, 139, 124, <b>83</b> , 55, 28     | Présence d'un noyau Pyrrolizidine - |
| 14,52       | Retamine<br>(hydroxyspartéine) | <b>234</b> , 193, 137, 110, <b>98</b> | Spartéine                           |
| 18,24       | Retamine<br>(hydroxyspartéine) | 232, 207, 134, 122, <b>98</b>         | Présence du noyau spartéine         |
| 19,26       | Cytisine                       | <b>97</b> , 73                        | Cytisine                            |
| 21,65       | Lupanine                       | <b>248</b> , 136, 117, <b>97</b> , 73 | Lupanine                            |
| 25,2        | Thermopsine                    | 244, <b>98</b> , 73                   | Anagyrine                           |

| Tr (min) | Spectre de masse |
|----------|------------------|
| 10,69    |                  |
| 11,49    |                  |
| 12,45    |                  |
| 14,52    |                  |
| 18,24    |                  |
| 19,26    |                  |





L'analyse des différents échantillons montrent qu'il y a plusieurs alcaloïdes présents dans les différents extraits. Les 3 alcaloïdes identifiés suite à l'analyse HPLC-MS/MS ont également été identifiés (cytisine, anagyrine et spartéine). Ces composés ont été identifiés dans la base NIST, amis avec d'autres dénominations : rétamine pour la spartéine, thermopsine pour l'anagyrine. La rétamine est le dérivé hydroxylé de la spartéine, et l'identification à partir de la base de données NIST est donnée pour plusieurs pics comportant les mêmes fragments (98 notamment). Pour le pic à 14,52 min, la présence d'un pic à  $m/z$  234 nous permet de confirmer la présence de spartéine (précédemment identifiée en LC-MS/MS avec un  $[MH^+]$  à 235,2169).



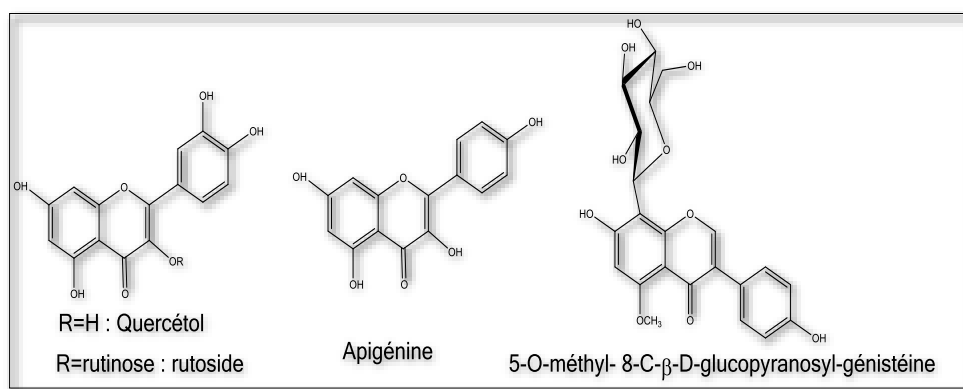
**Figure 39 :** Structure des alcaloïdes identifiés.

Parallèlement à ces composés, l'analyse GC-MS a permis d'identifier d'autres composés alcaloïdiques : des analogues pyrrolizidiniques et un dérivé de la spartéine. Leur identification n'est permise que par la présence de fragments caractéristiques :  $m/z=83$  pour les pyrrolizidines et  $m/z = 98$  pour le dérivé de spartéine, identifiée comme étant la rétamine dans la base de données NIST. Enfin, la présence d'anagyrine a été confirmée ( $Tr = 25,2$  minutes), identifiée comme étant la thermopsine par la base de donnée NIST.

Par ailleurs, la comparaison des extraits méthanoliques et des extraits alcaloïdiques « classiques » montre qu'il existe des différences notables entre les deux types d'extraits. En effet, le profil de l'extrait méthanolique d'Annaba GC-2 présente les pics des alcaloïdes identifiés (pyrrolizidines, spartéine, cytisine, lupanine, anagyrine), cependant, l'extraction alcaloïdiques a permis d'obtenir des pics supplémentaires autour de celui du composé apparenté à la spartéine à 18 minutes.

## 2 Identification des composés phénoliques présents chez les spécimens de *Genista numidica* étudiés

Les flavonoïdes sont très largement représentés dans le règne végétal, il n'y a pas de données sur une spécificité chez les Genisteeae. Inversement, des études chimiotaxonomiques ont montré que parmi les isoflavones, l'association daidzéine/formononétine/génistéine/5-O-Methyl- 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-genistéine était fréquente (Harborne, 1969). Ainsi, les standards choisis sont trois flavonoïdes courants, le rutoside, la quercétine et l'apigénine ainsi que la 5-O-méthylgénistéine.



**Figure 40** : Standard des flavonoïdes et isoflavonoïdes utilisés pour la déréplication HPLC-UV-MS/MS.

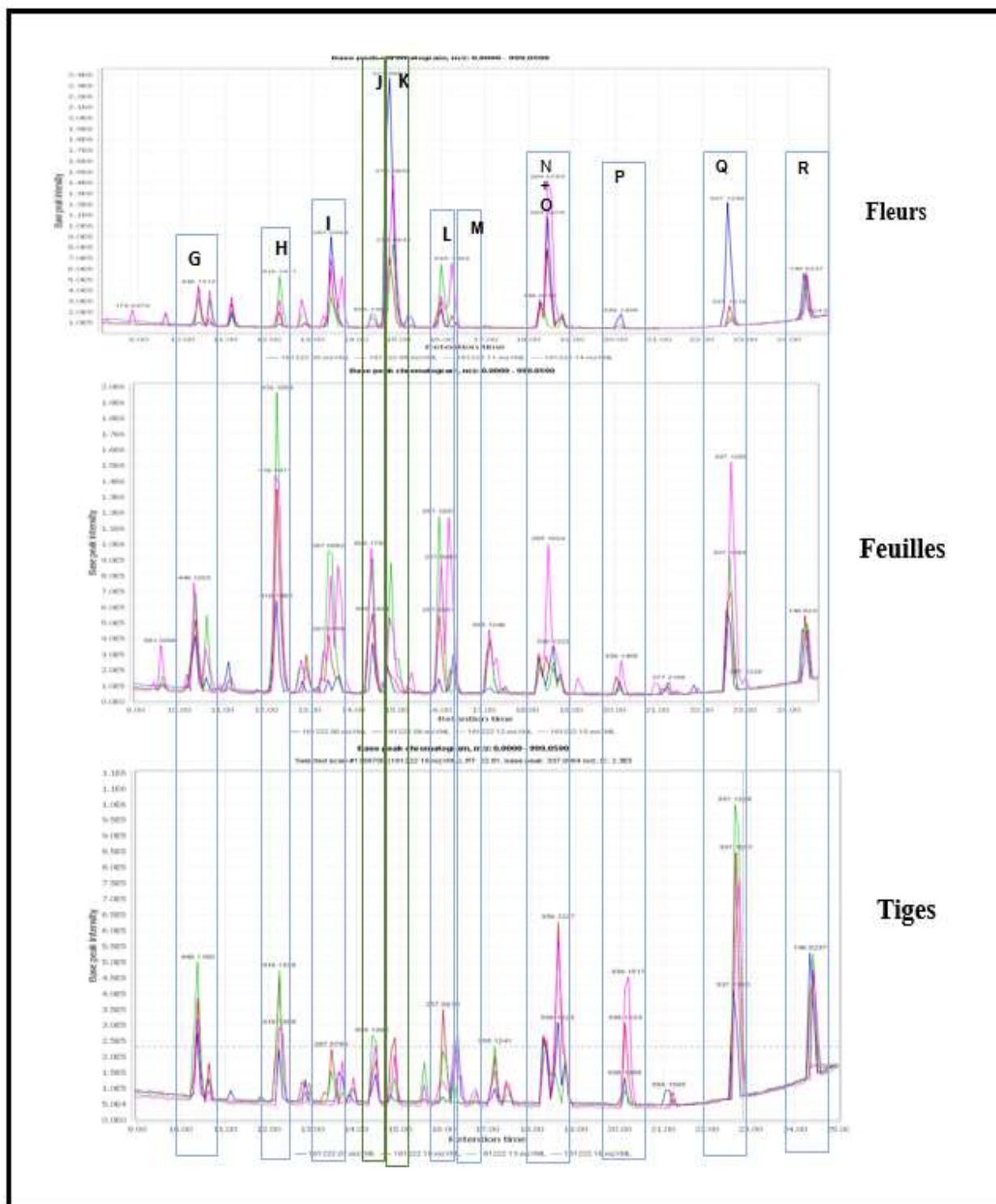
### 2.1 Identification des flavonoïdes et isoflavonoïdes de *Genista numidica* Spach par déréplication HPLC-UV-MS/MS

Le tableau ci-dessous présente les temps de rétention, les valeurs de m/z des ions parents, et les fragments relevés pour les 4 composés phénoliques de référence et pour les pics G à Q relevés sur les chromatogrammes des extraits de *Genista numidica* analysés.

**Tableau 18 :** Temps de rétention, masse et fragment observés pour les témoins et les extraits.

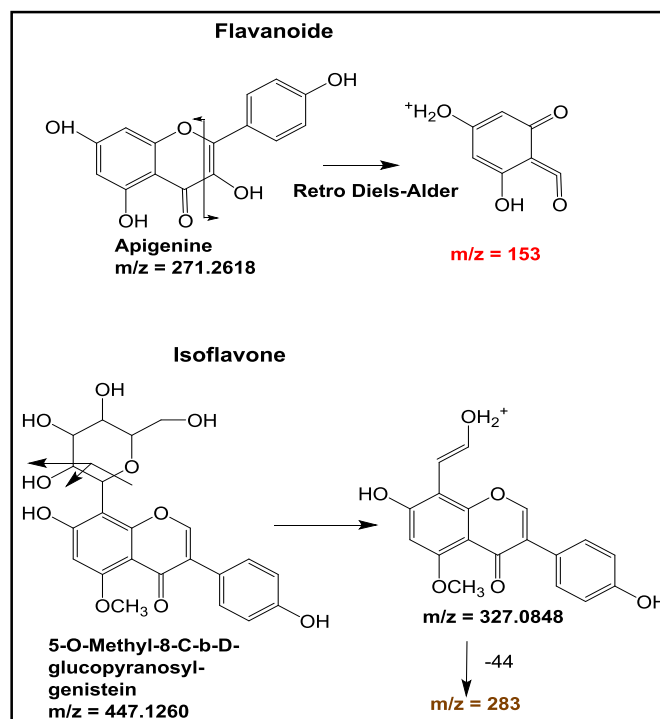
| Composés   | Tr (min) | m/z      | Fragments observés (20,45 et 70eV)                                       |
|------------|----------|----------|--------------------------------------------------------------------------|
| Rutoside   | 9,95     | 611,1722 | 465,1010 ; 303,0171 ; 229,0553 ; <b>153,0178</b> ; 85,0287               |
| Quercétine | 13,48    | 303,0485 | 229,0553 ; <b>153,0178</b> ; <b>68,9974</b>                              |
| Apigénine  | 14,71    | 271,2618 | <b>153,0177</b> ; <b>91,0540</b>                                         |
| 5-O-MGG    | 8,17     | 447,1260 | 381,0946 ; 327,0848 ; <b>283,0591</b> ; 165,0183 ;<br>118,0404 ; 55,0185 |
| G          | 10,37    | 449,1 -  | 287,0810 ; <b>153,0322</b> ; 69,004                                      |
| H          | 12,24    | 419,1 -  | 271,0624 ; <b>215,0762</b> ; <b>153,0218</b> ; <b>91,0568</b>            |
| I          | 13,43    | 287,0 -  | <b>213,0571</b> ; <b>153,0204</b> ; <b>68,9984</b>                       |
| J          | 14,45    | 505,14   |                                                                          |
| K          | 14,79    | 271,0 -  | <b>215,0890</b> ; <b>153,0312</b> ; <b>91,0620</b> ; <b>65,0446</b>      |
| L          | 15,97    | 257,1 -  | 137,0266 ; 81,0346                                                       |
| M          | 16,22    | 533,1 -  | 285,0811 ; <b>213,0587</b> ; 152,0133                                    |
| N          | 18,43    | 285,0 -  | <b>213,0540</b> ; 185,0599 ; 124,0146 ; <b>68,9976</b>                   |
| O          | 18,76    | 311,2-   | 209,1274 ; <b>153,0603</b> ; 111,0527                                    |
| P          | 20,13    | 339,1 -  | <b>283,0688</b> ; 165,0170 ; 121,0279 ; 68,9972                          |
| Q          | 22,58    | 337,1 -  | <b>283,0696</b> ; 219,0907 ; 165,0243 ; 121,0369 ; <b>65,0418</b>        |
| R          | 24,10    | 149,0 -  | <b>65,0394</b>                                                           |





**Figure 41 :** Chromatogrammes comparatifs des extraits analysés.

Parmi les pics identifiés, il est possible d'identifier 5 flavonoïdes (pics G, H, I K et O) et 2 isoflavones (pics P et Q) sur la base de fragments caractéristiques, respectivement  $m/z=153$  pour les flavonoïdes et  $m/z=283$  pour les isoflavones, d'après le schéma de fragmentation décrit ci-dessous.



**Figure 42** : Schéma de fragmentation des flavonoïdes et isoflavones témoins.

Parmi les témoins utilisés, seule l'apigénine a pu être identifiée dans les extraits (pic K). Malgré une grande complexité des extraits, il ressort que le pic H ( $m/z=419,1$ ) est présent majoritairement dans les feuilles, l'apigénine, pic K ( $m/z = 271$ ) dans les fleurs, et le pic Q dans les tiges ( $m/z 337,1$ ).

## 2.2 Analyse par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)

L'opportunité d'analyser les extraits obtenus par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) nous a mené à envisager une élution spécifique des flavonoïdes (acétate d'éthyle /acide formique /acide acétique /eau, (100 /11/11/26, v/v/v/v)) afin de mieux visualiser la complexité des composés identifiés par HPLC-MS/MS. Pour cela, nous avons analysé les extraits issus des différentes stations d'étude présentés dans le tableau ci-dessous. Nous avons également ajouté pour comparaison 3 extraits issus de *Calobota saharae*, travaillés antérieurement au laboratoire (Thèse de MERIANE Djamila), avec l'isoflavone 5-O-Méthyl-8-C-β-D-glucopyranosyl-génistéine isolée comme standard. Après dépôt et migration, la

plaque HPTLC a été visualisée en lumière visible (VIS), sous UV à 254 nm (UV254) et sous UV à 366 nm pour visualiser les émissions de fluorescence (UV366).

**Tableau 19 :** Liste des échantillons analysés par HPTLC.

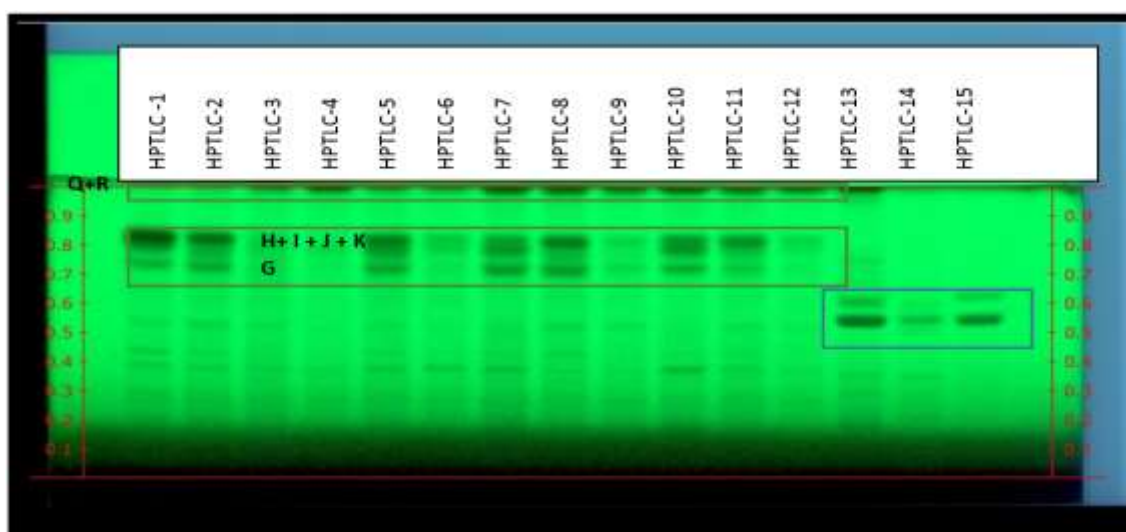
| Echantillon | Région | Station      | Specimen | Code                              | V (µL) |
|-------------|--------|--------------|----------|-----------------------------------|--------|
| HPTLC-1     | Jijel  | Laghrifet    | Fleur    | Fleur-Jij-Lg-st <sub>1</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-2     | Jijel  | Laghrifet    | Feuille  | Feuille –Jij-Lg-st <sub>1</sub>   | 10,0   |
| HPTLC-3     | Jijel  | Laghrifet    | Tige     | Tige-Jij-Lg-st <sub>1</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-4     | Jijel  | Grand Phare  | Fleur    | Fleur-Jij-Gp-st <sub>2</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-5     | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | Feuille-Jij-Gp-st <sub>2</sub>    | 10,0   |
| HPTLC-6     | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | Tige-Jij-Gp-st <sub>2</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-7     | Annaba | Cap de Garde | Fleur    | Fleur-Ann-Cg-st <sub>2</sub>      | 10,0   |
| HPTLC-8     | Annaba | Cap de Garde | Feuille  | Feuille-Ann-Cg-st <sub>2</sub>    | 10,0   |
| HPTLC-9     | Annaba | Cap de Garde | Tige     | Tige-Ann-Cg-st <sub>2</sub>       | 10,0   |
| HPTLC-10    | Annaba | Serraidi     | Fleur    | Fleur-Ann-Ser-st <sub>4</sub>     | 10,0   |
| HPTLC-11    | Annaba | Sarraidi     | Feuille  | Feuille-Ann-Ser-st <sub>4</sub>   | 10,0   |
| HPTLC-12    | Annaba | Serraidi     | Tige     | tige-Ann-Serr-st <sub>4</sub>     | 10,0   |
| HPTLC-13    | M'sila | Bousaada     | Racine   | Racine de <i>Calobota saharea</i> | 10,0   |
| HPTLC-14    | M'sila | Bousaada     | Fleur    | Fleur de <i>Calobota saharea</i>  | 10,0   |
| HPTLC-15    | M'sila | Bousaada     | -        | Isoflavone (molécule pure)        | 10,0   |

L'analyse de la plaque HPTLC permet de bien visualiser la variation de composition en flavonoïdes des différents échantillons et des différentes parties de plantes. Les composés des pics Q et R, J et K, et H sont identifiés sur les plaques HPTLC avec des R<sub>f</sub> de 1, 0,82 et 0,72 respectivement. Leur couleur jaune dans le visible associée à une fluorescence orange observée pour ces pics confirme leur nature flavonoïdiques.

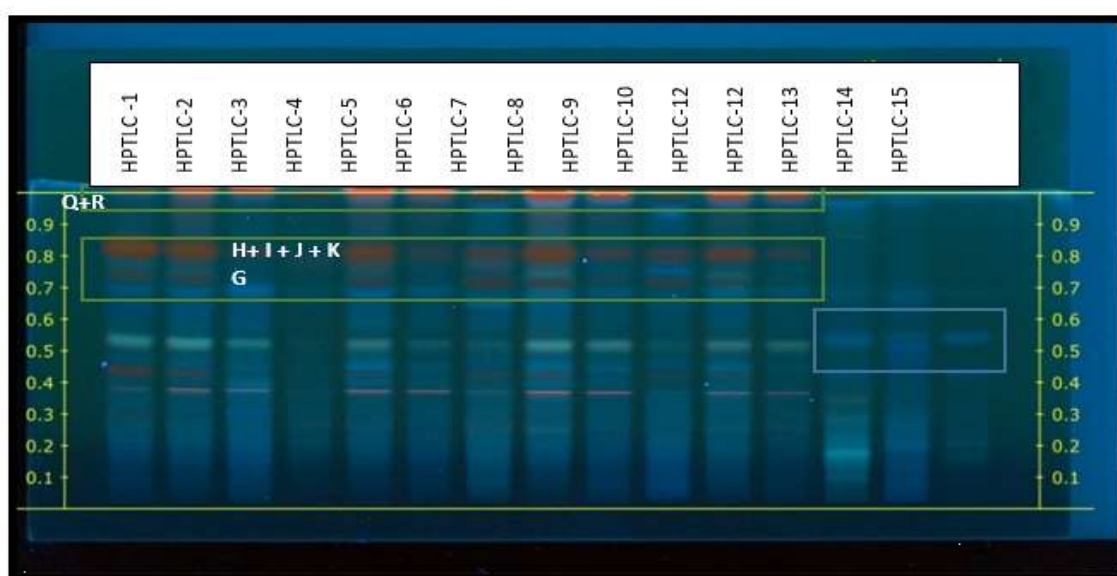
L'isoflavone glycosylée isolée de *Calobota saharae* est quant à elle présente au R<sub>f</sub> 0,53. La présence de pics émettant une fluorescence jaune pâle dans cette zone de R<sub>f</sub> 0,5 pour les extraits de *Genista numidica* est le signe de la présence de flavonoïdes ou d'isoflavones.



**Figure 43** : Plaque HPTLC des extraits de *Genista numidica* dans le visible.



**Figure 44** : Plaque HPTLC des extraits de *Genista numidica* sous UV à 254 nm.

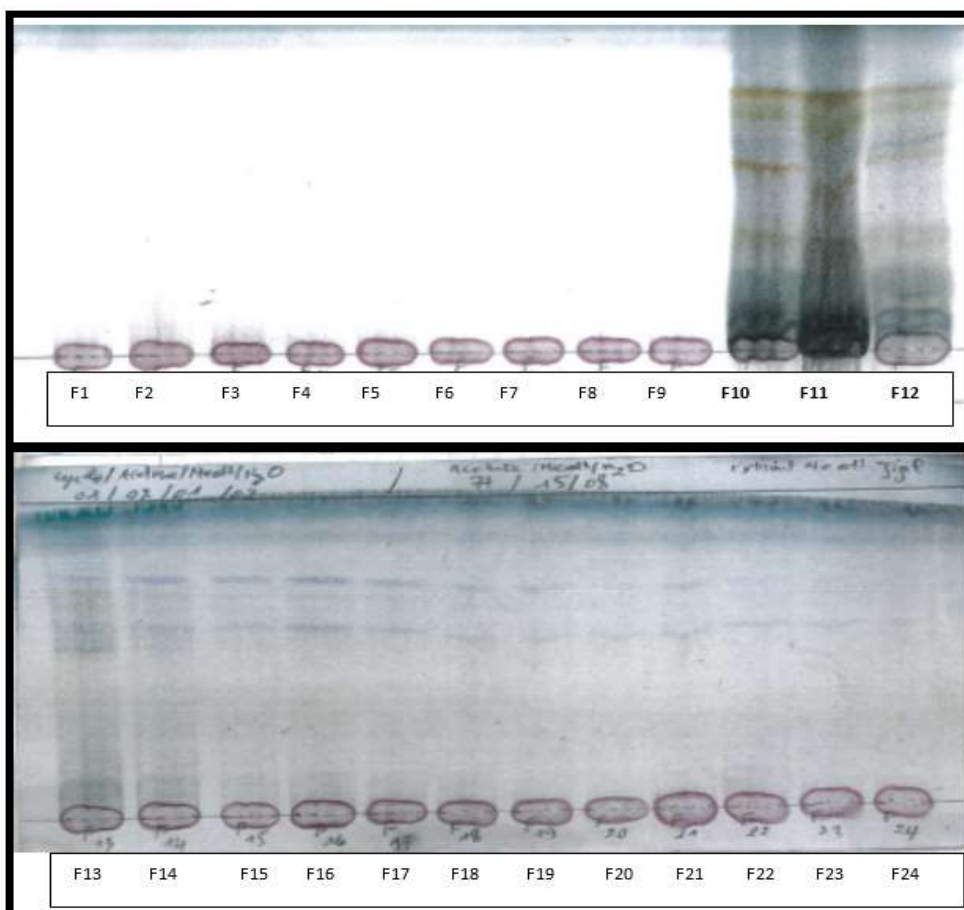


**Figure 45** : Plaque HPTLC des extraits sous UV à 366 nm.

### 3 Fractionnement de l'extrait MeOH de *G. numidica* par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

L'extrait méthanolique des parties aériennes de *Genista numidica* de la région de Jijel a été sélectionné pour isoler les composés d'intérêt en vue d'une analyse structurale et d'évaluations biologiques ultérieures. Le système biphasique de solvant sélectionné pour ce fractionnement, est un mélange quaternaire (Cyclohexane/Acétone/MeOH/H<sub>2</sub>O), (1/2/1/2, v/v/v/v), variante du système Arizona K (Heptane/Acétate d'éthyle/MeOH/H<sub>2</sub>O) (1/2/1/2, v/v/v/v), ciblant des composés de polarité intermédiaire (Berthod et al., 2005).

Après injection de 0,5g de l'extrait méthanolique de *G. numidica* provenant de la région de Jijel, on a récupéré au total 24 fractions de 30 mL. On a ensuite procédé à l'extrusion en pompant la phase inférieure à 30 mL/min et 600 tr/min, et on a récupéré 20 fractions de 30 mL. Toutes les fractions ont été séchées sous pression réduites et pesées, après réalisation d'une analyse CCM.

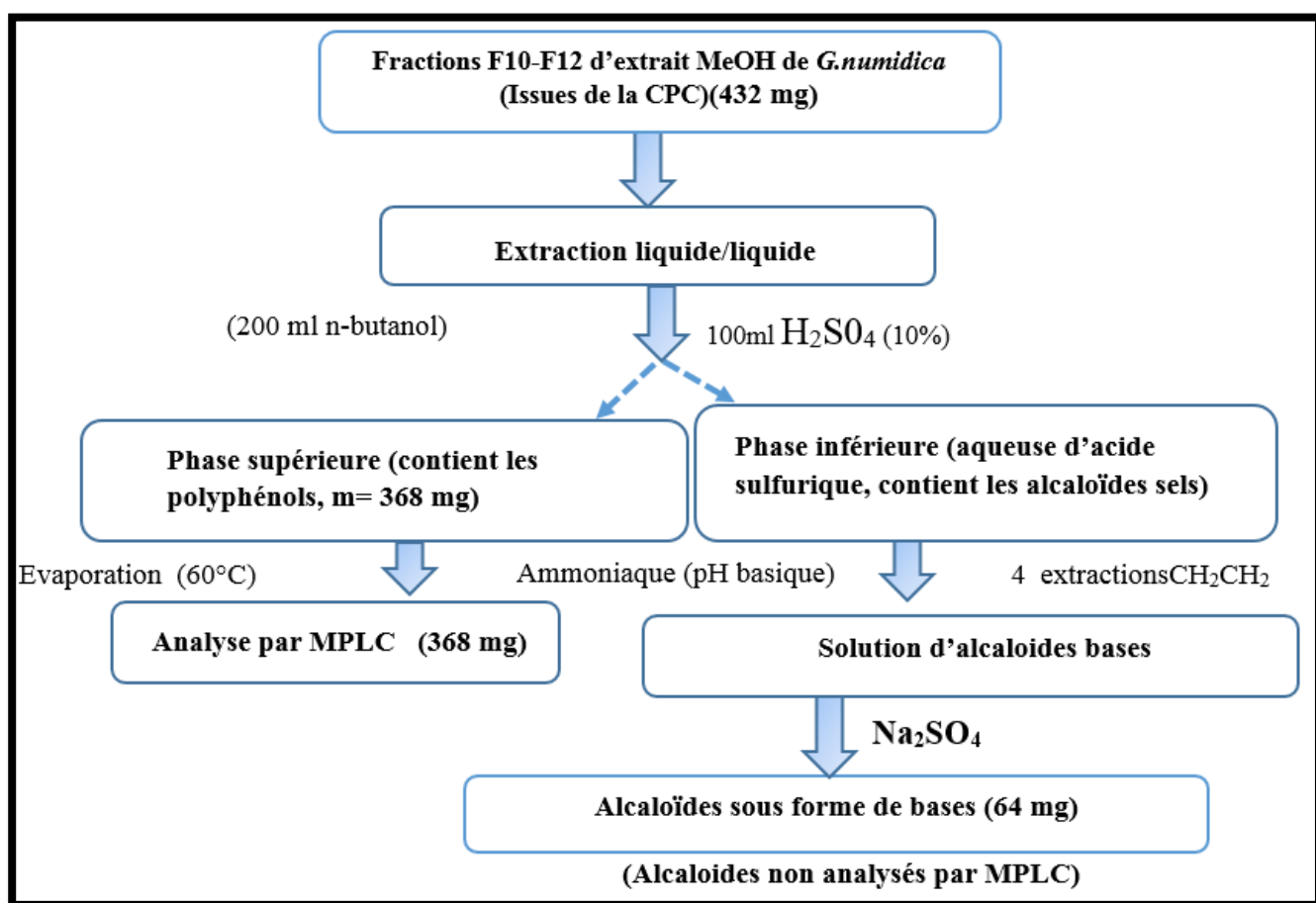


**Figure 46 :** Fractions issues de la CPC.

La séparation n'a malheureusement pas été efficace. L'ensemble des composés flavonoïdiques (jaunes, orangés sur la CCM) s'est retrouvé en mélange dans les 3 fractions 10, 11 et 12. Les fractions F10-F12 contenant les flavonoïdes ont donc été rassemblées et soumises à une extraction liquide afin de séparer les flavonoïdes des composés plus polaires et subir une deuxième étape de purification par Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (MPLC).

#### 4 Purification par colonne de chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) des fractions F10 à F12

L'extraction liquide/liquide a été mise en œuvre sur les 432 mg correspondant aux fractions F10-F12. L'ajout d'une solution aqueuse de  $H_2SO_4$  (10%) a été envisagé pour ioniser les alcaloïdes sous forme de sels afin de les maintenir ionisés dans la phase aqueuse. Le solvant organique sélectionné est le *n*-butanol, suffisamment polaire pour extraire les flavonoïdes mais permettant de former un système biphasique avec la phase aqueuse. La fraction butanolique a donc été récupérée et évaporée à sec pour fournir 368 mg de résidu sec.

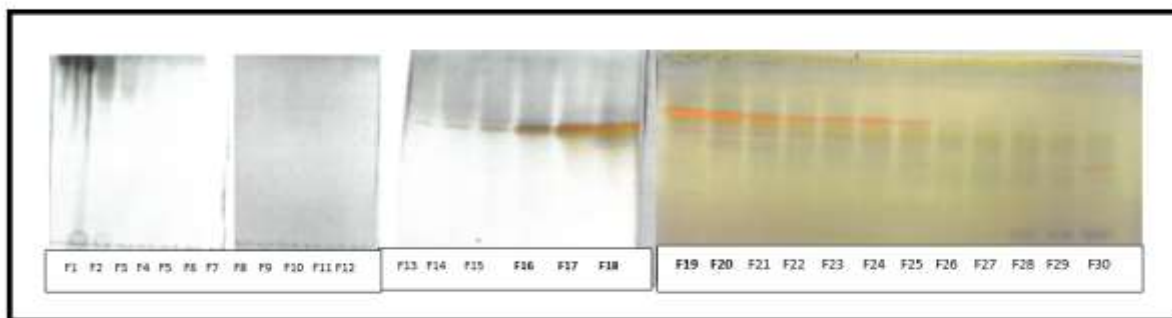


**Figure 47 :** Protocole d'extraction liquide liquide des fractions F10-F12 d'extrait méthanolique de *G. numidica*.



La phase aqueuse acide contenant les alcaloïdes sels est rendu basique par ajout d'ammoniaque concentrée et extraite par du dichlorométhane. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium puis évaporée à sec. Cet extrait alcaloïdique est conservé pour des purifications ultérieures.

Les 368 mg sont récupérés et mélangés à de la silice pour le dépôt solide en vue de la chromatographie liquide à moyenne pression. L'élution est réalisée avec un gradient de cyclohexane et acétate d'éthyle et mené à l'obtention de 30 fractions (Figure 48).

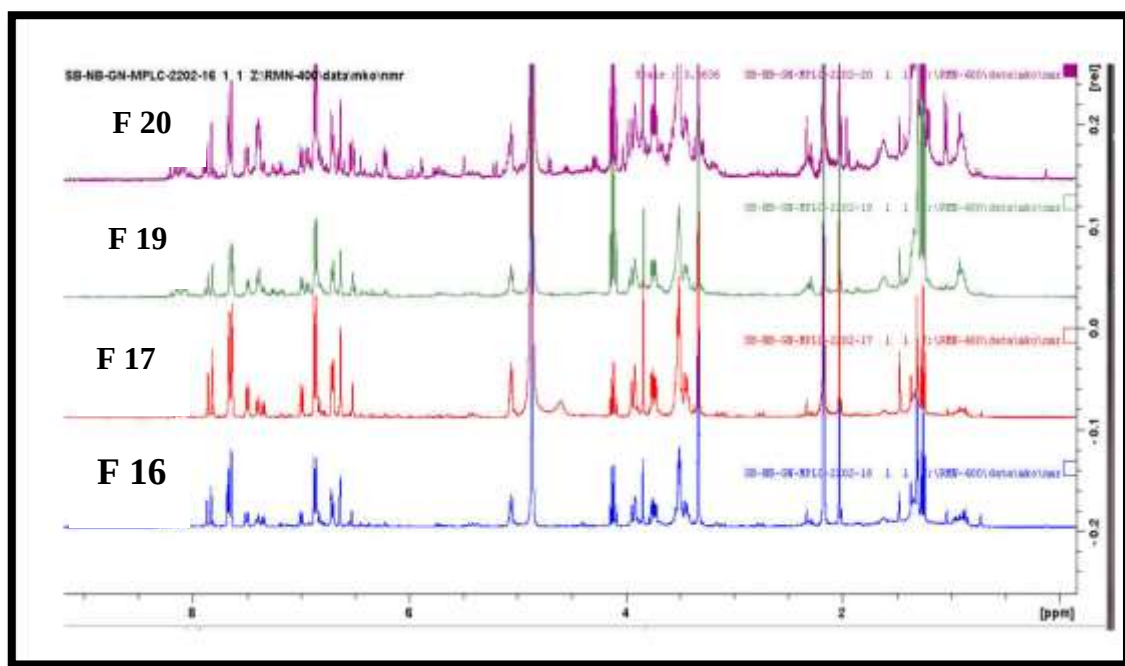


**Figure 48** : Chromatographie couche mince des fractions issues de la MPLC (éluant acétate d'éthyle, méthanol, eau, 77/15/8 : v/v/v) – visible.

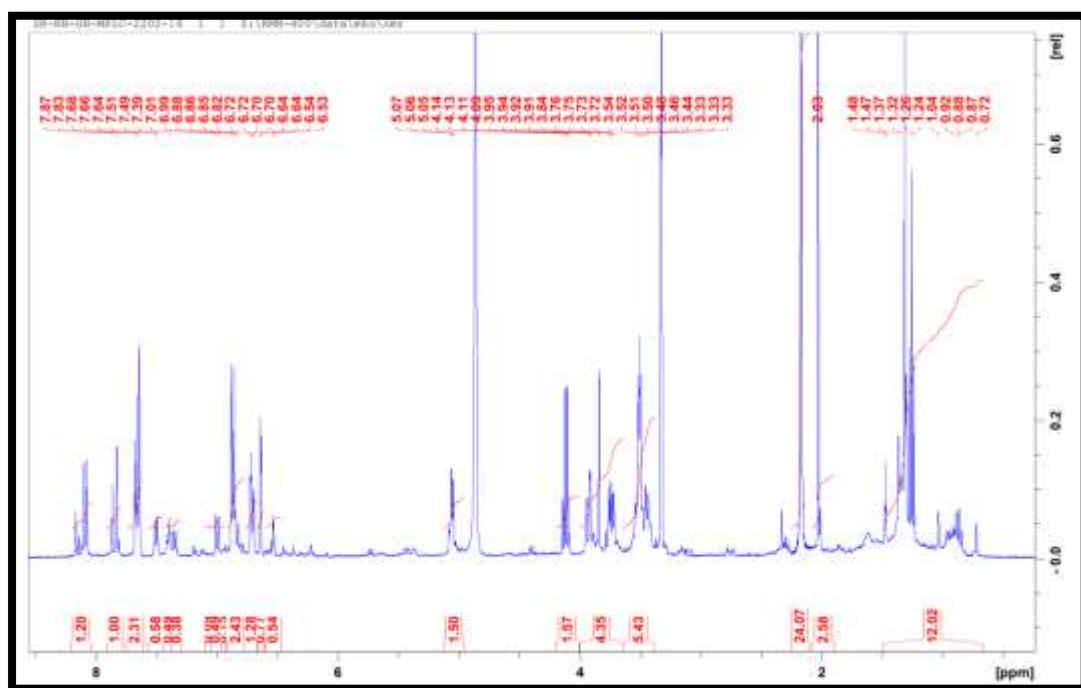
Un composé majoritaire de couleur orange vif est présent dans les fractions 16 à 20, il est ensuite en mélange avec d'autres composés dans les fractions suivantes. Nous avons donc envisagé une analyse structurale des fractions contenant ce composé majoritaire par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

## 5 Elucidation de la structure des composés par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les fractions 16 à 20 ont donc été analysées par RMN. La comparaison des spectres RMN du proton de ces fractions montre que les fractions 16 et 17 contiennent un composé majoritaire. Des analyses complémentaires en RMN à 2D et RMN du carbone ont donc été envisagées.

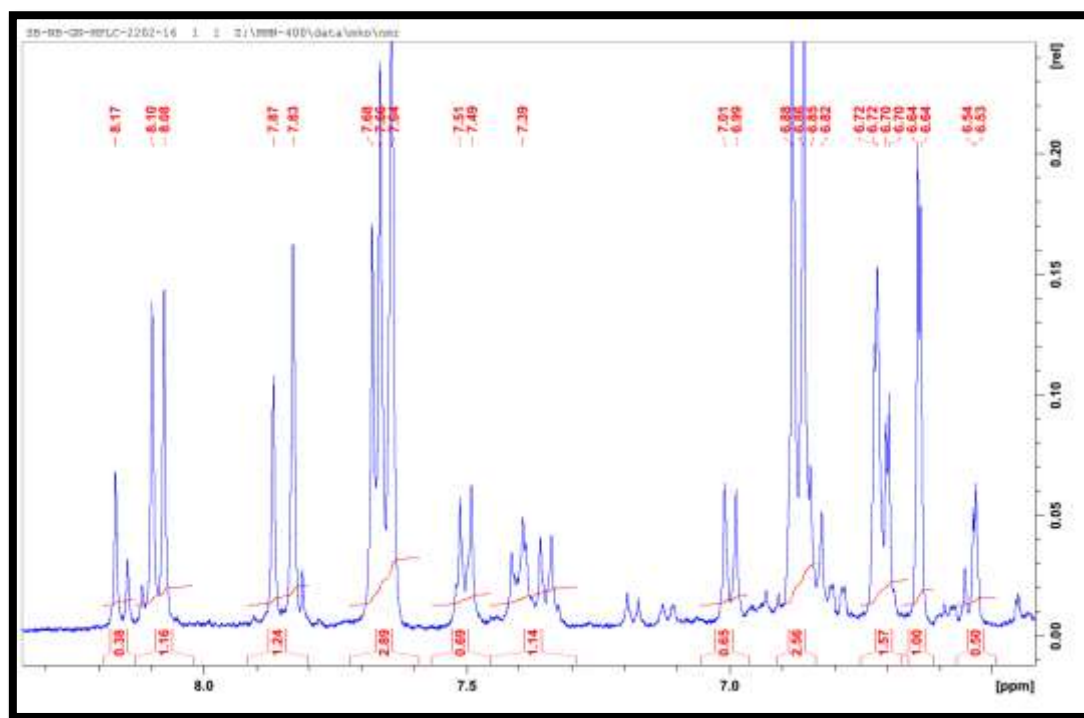


**Figure 49 :** Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  des fractions 16 à 20.



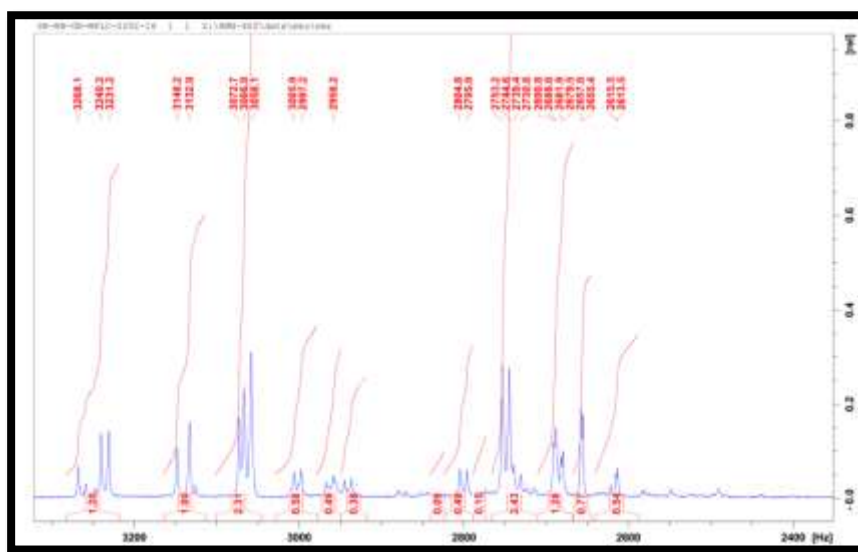
**Figure 50 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction 16.





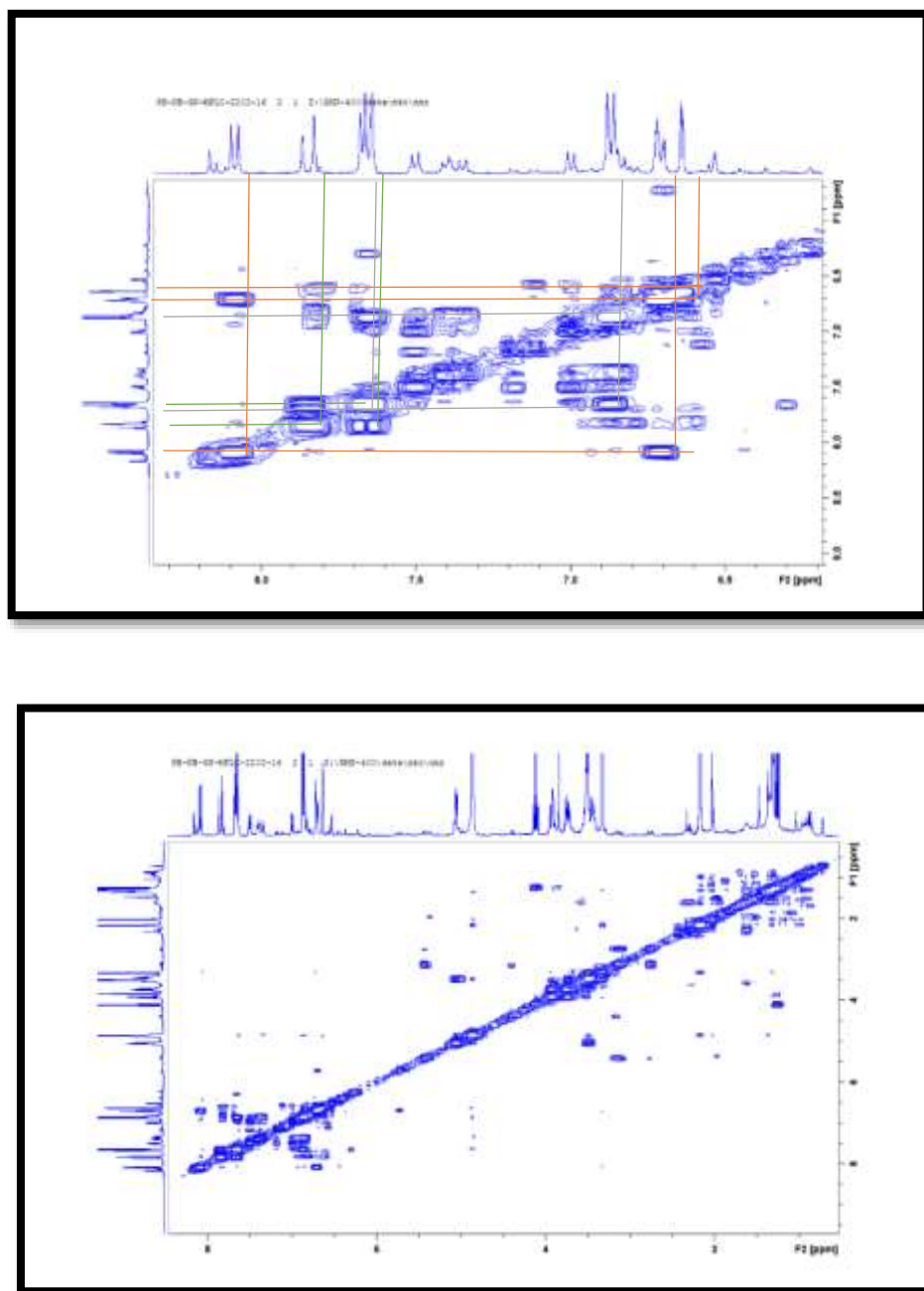
**Figure 51 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction 16, déplacements en ppm.

On peut observer au niveau des protons aromatiques la présence d'un composé majoritaire et de produits minoritaires avec un ratio d'environ 75/25. Le composé majoritaire présente 9 protons aromatiques et/ou éthyléniques à 8,10 (1H), 7,87 (1H), 7,67 (3H) et 6,86 (2H) et 6,70 ppm (1H) et 6,64 (1H). Les autres pics de la zone aromatiques appartenant au(x) composé(s) minoritaire(s).



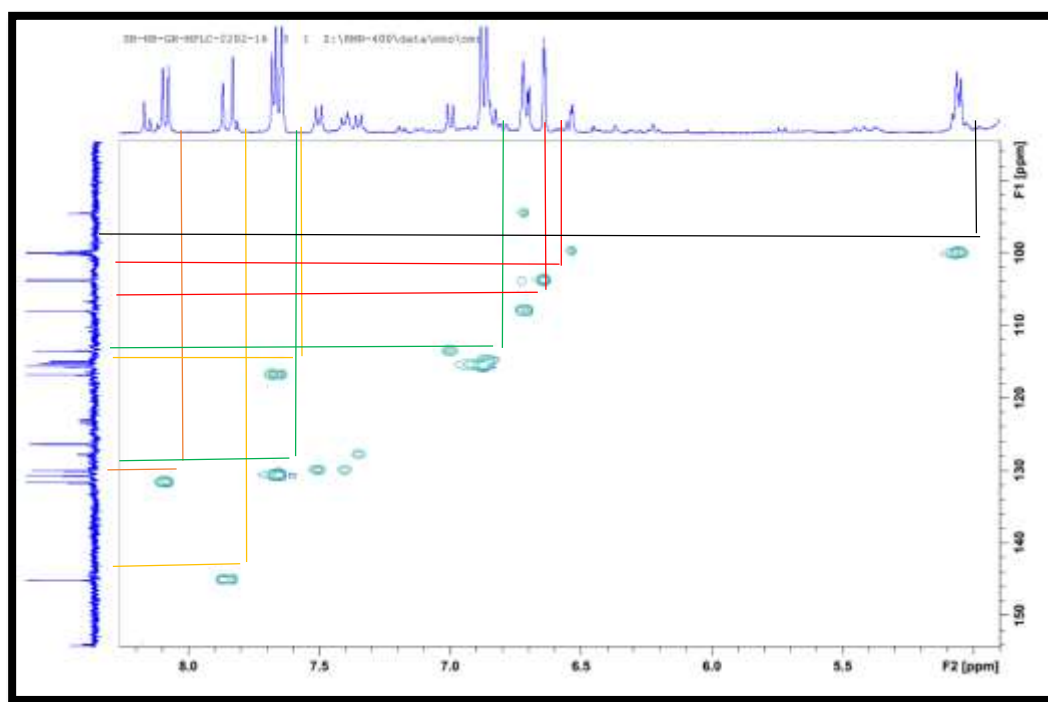
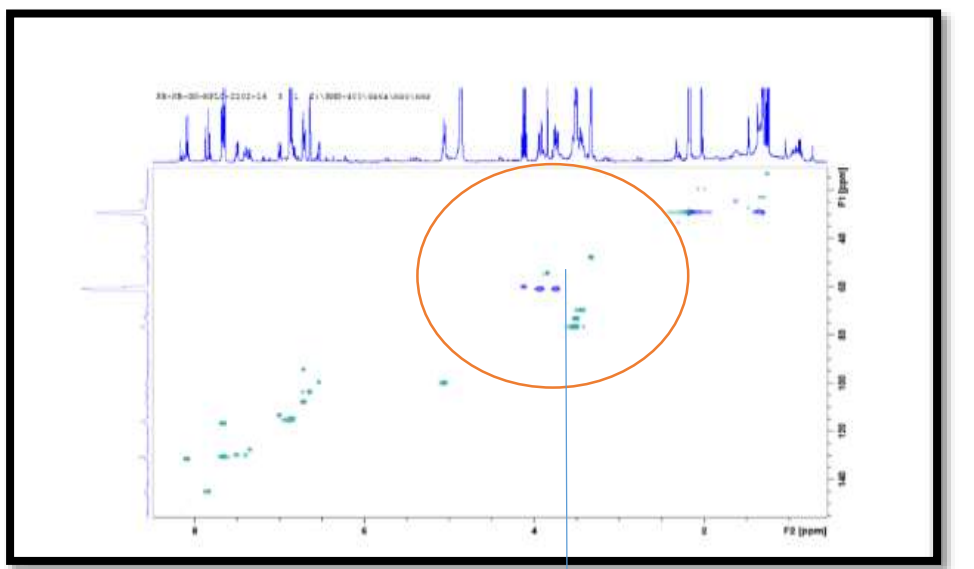
**Figure 52 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction 16, déplacements en hertz.

L'analyse des couplages entre protons montre que 2 protons à 7,87 et 7,67 ppm présentent une constante de couplage de 15 Hz qui correspond à un couplage entre deux protons éthyléniques en position *trans*. L'analyse des spectres RMN 2D COSY confirme ce couplage (*en orange*) et montre qu'il existe un système de 3 protons aromatiques d'un côté (*en rouge* : à 8,10, 6,70 et 6,64ppm) et un système de 4 protons aromatiques de l'autre, équivalents 2 à 2 (*en vert* à 7,67 et 6,86 ppm).



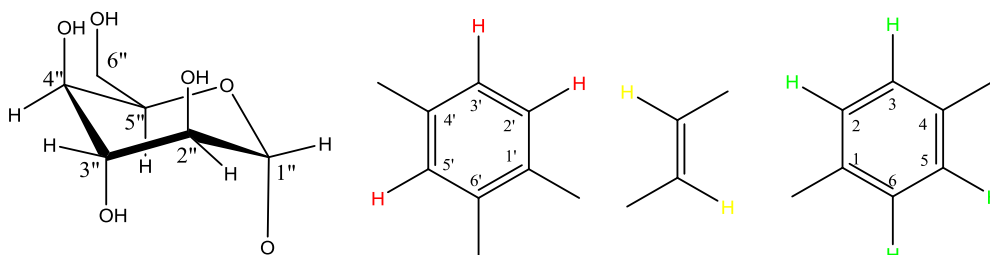
**Figure 53 :** Spectres COSY de la fraction 16.

La zone de 3 à 5 ppm correspond aux signaux d'un sucre, le signal à 5,06 ppm correspondant au proton anomérique de ce sucre. Le spectre HSQC 2d permet de voir les corrélations proton-carbone des signaux correspondant au sucre dans la zone 3 à 5 ppm. Les signaux vert pale correspondant aux signaux des protons -CH du sucre et les signaux en bleu foncé au signal du CH<sub>2</sub> à 61,1 ppm. Le signal du proton anomérique est porté par un carbone déblindé à 100 ppm.



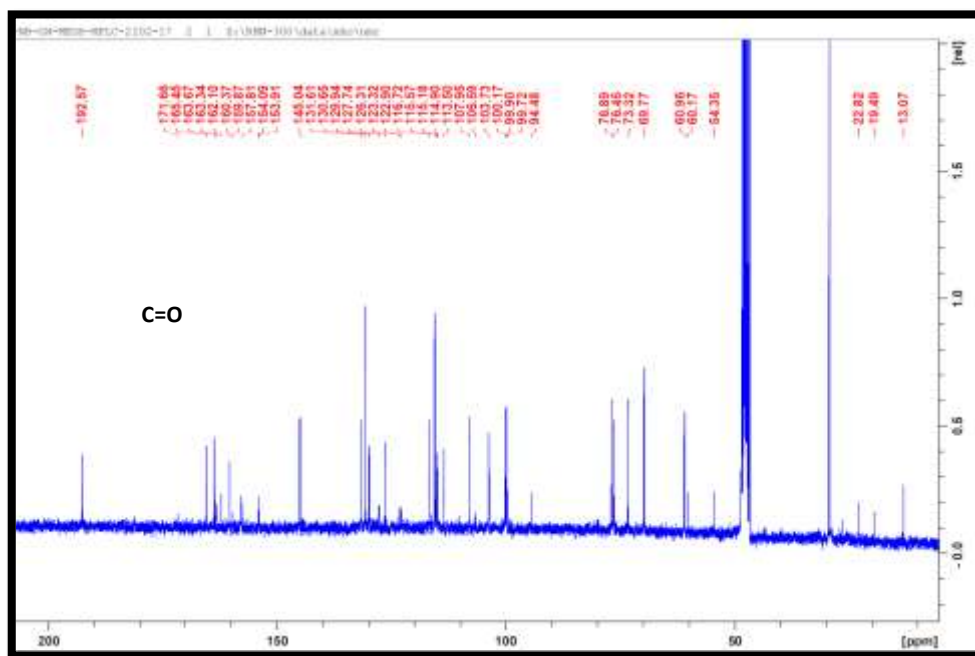
**Figure 54 :** Spectres HSQC 2d de la fraction 16.

L'analyse du spectre HSQC 2d montre que les deux protons éthyléniques en position *trans* (7,87 et 7,67 ppm ) sont portés par des carbones respectivement à 144,5 et 116,8 ppm (corrélations en orange), que les 3 protons aromatiques du premier cycle aromatique (à 8,10, 6,70 et 6,64 ppm en rouge) sont portés par des carbones respectivement à 131,5 ; 107,9 et 103,7 et que les 4 protons du second cycle aromatique (en vert à 7,67 et 6,86 ppm) sont portés par des carbones respectivement à 115,5 et 130,4 ppm, équivalents deux à deux. Ceci nous mène à l'identification des fragments suivant :



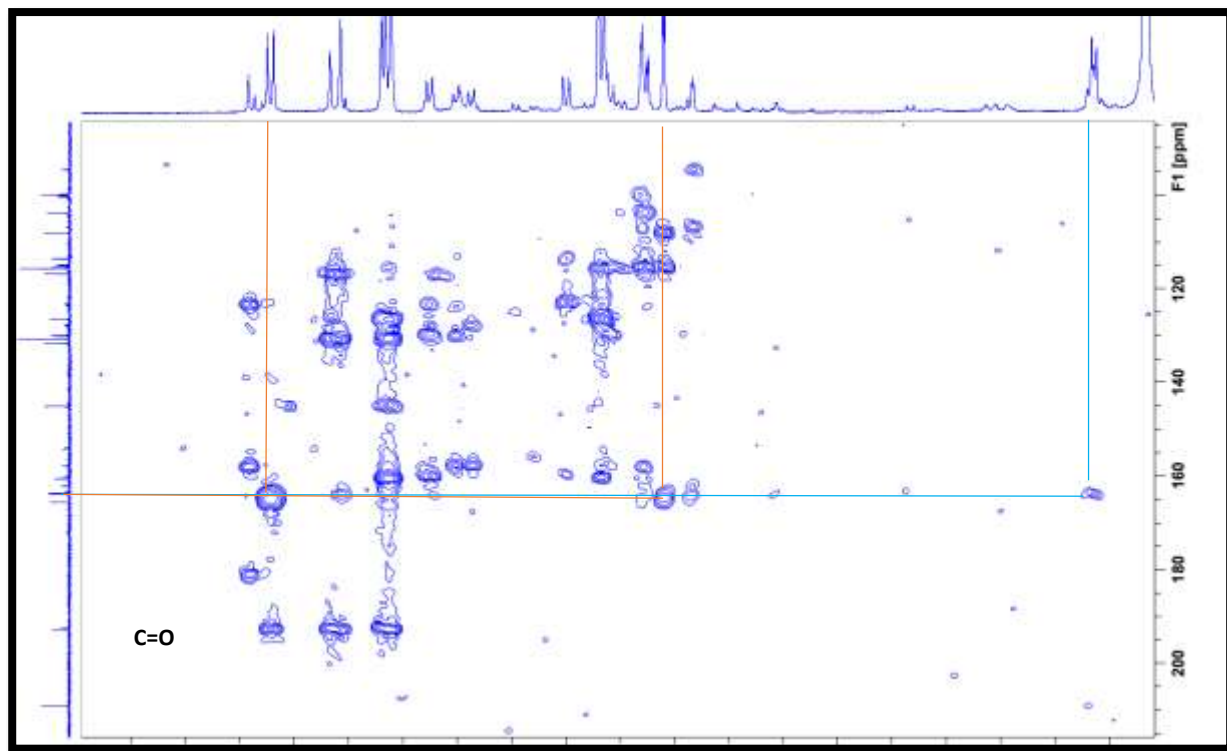
**Figure 55 :** Fragments du composé 16.

Il existe donc deux cycles aromatiques, l'un porteur de 3 protons aromatiques et donc de 3 positions substituées, le second porteur de 4 protons aromatiques équivalents deux à deux et donc de 2 positions substituées. Il existe également une double liaison avec deux protons en configuration *trans*.



**Figure 56 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction 16.

Le spectre carbone montre également la présence d'un signal très déblindé à 192,5 ppm correspondant à un carbonyle.



**Figure 57 :** Spectre HMBC de la fraction 16.

Afin de déterminer la position du sucre, nous avons réalisé une analyse du spectre HMBC. Elle montre que le proton anomérique du sucre (5,06 ppm) corrèle avec le carbone à 163,4 ppm, et donc que le sucre est porté par ce carbone via une liaison *O*-hétérosidique. L'étude des autres corrélations de ce carbone peut nous informer sur les autres carbones à proximité de celui-ci et ainsi déterminer sur quelle position est le groupement *O*-hétérosidique. On peut observer que le carbone à 163,4 corrèle avec le proton à 8,10 ppm présentant une constante de couplage *Jortho* et le proton à 6,64 ppm présentant une constante de couplage en *Jmeta*. Ces deux protons sont ceux du premier système aromatique trisubstitué (fragment en rouge). On peut également remarquer que parmi les 3 protons aromatiques de ce système, le proton à 8,10 ppm, qui a un voisin en position *ortho*, corrèle avec le carbonyle à 192,5. Donc le proton à 8,10 ppm est à la fois à proximité du carbone porteur du groupement *O*-hétérosidique et d'un groupement carbonyle. Le second proton de ce système aromatique, à 6,64 ppm, ne possède qu'un voisin en position *meta*. Il corrèle bien avec le carbone à 163,4 ppm portant le groupement *O*-hétérosidique, mais ne corrèle pas avec le carbonyle, il en est donc plus éloigné.

Enfin, le troisième proton de ce système, à 6,70 ppm, ne corrèle ni avec le carbone à 163,4 ppm porteur du groupement *O*-hétérosidique, ni avec le carbonyle. Il est donc éloigné de ces deux

groupements. Ces observations nous permettent donc de déterminer les substituants sur ce fragment aromatique et nous à mène à proposer la structure de chalcone glycosylée suivante :

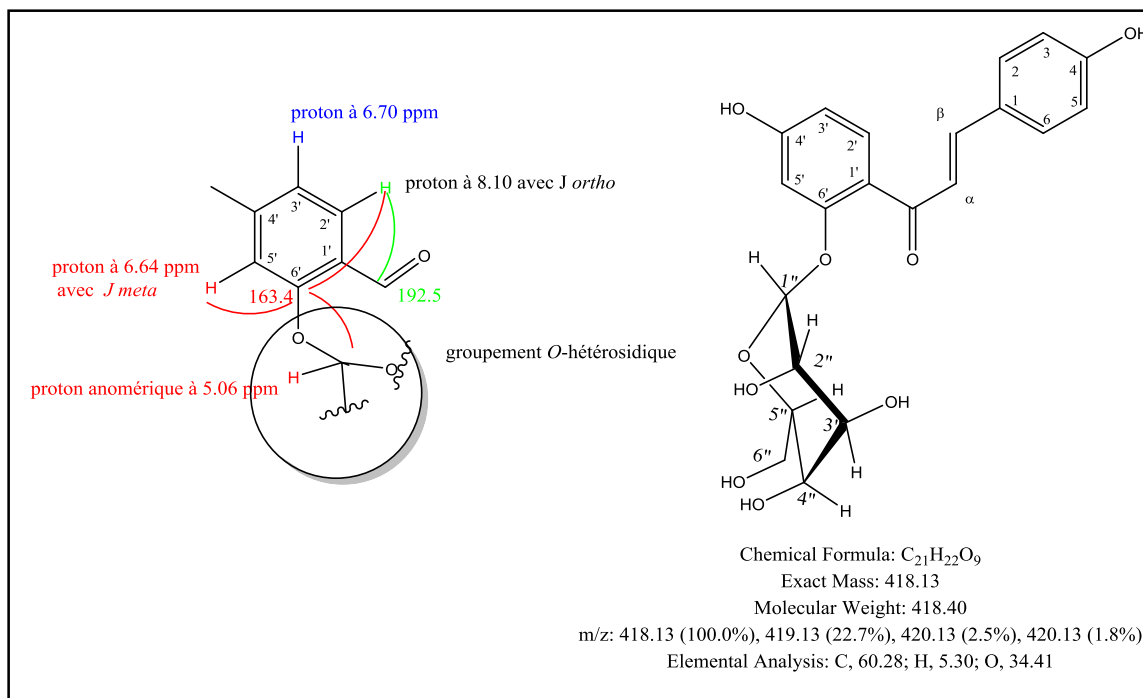


Figure 58 : Structure proposée pour le composé 16.

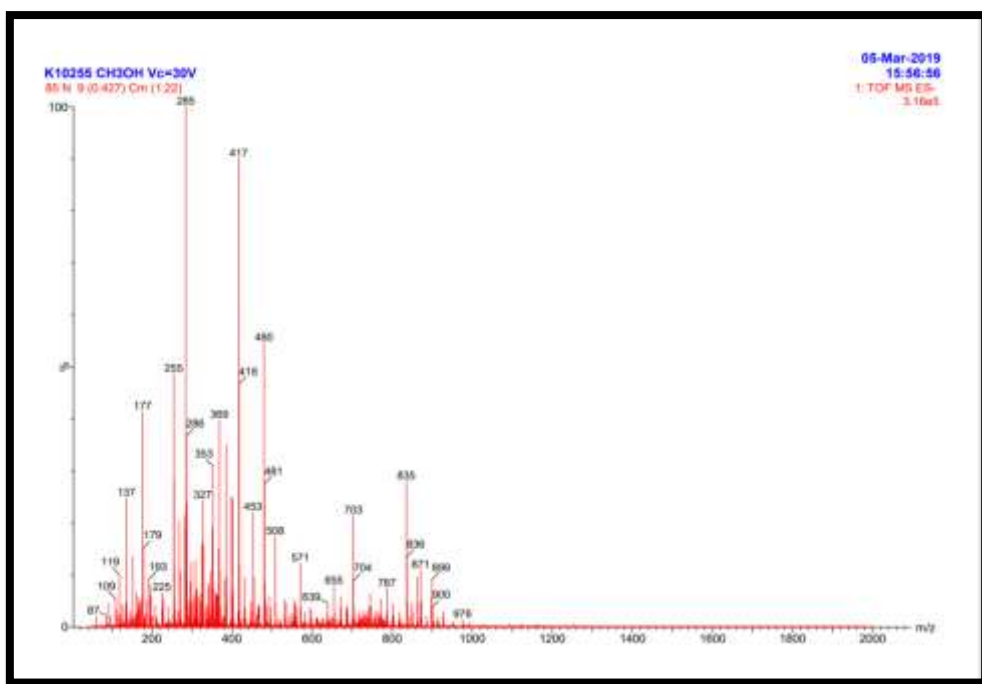
Tableau 20 : déplacements chimiques des protons et carbones (ppm) pour le composé 16

| Position                 | Proton                                           | Carbone           |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
| 1'                       | -                                                |                   |
| 2'                       | 8,10 ( $J_{ortho}$ = 9 Hz)                       | 131,5             |
| 3'                       | 6,70 ( $J_{ortho}$ = 9 Hz + $J_{meta}$ = 2,4 Hz) | 107,9             |
| 4'                       | -                                                |                   |
| 5'                       | 6,64 ( $J_{meta}$ = 2.4 Hz)                      |                   |
| 6'                       | -                                                | 163,4             |
| A                        | 7,67 ( $J_{trans}$ = 15 Hz)                      | 116,8             |
| B                        | 7,87 ( $J_{trans}$ = 15 Hz)                      | 144,5             |
| 1                        | -                                                |                   |
| 2 + 6                    | 7,67 ( $J$ = 5,2 Hz)                             | 130,4             |
| 3 + 5                    | 6,86 ( $J$ =5,2 Hz)                              | 115,5             |
| 4                        | -                                                |                   |
| C=O                      | -                                                | 192,5             |
| C anomérique             | 5,06                                             | 100               |
| CH <sub>2</sub> du sucre |                                                  | 61,1              |
| CH du sucre              |                                                  | 73,4 ; 77,0, 70,0 |

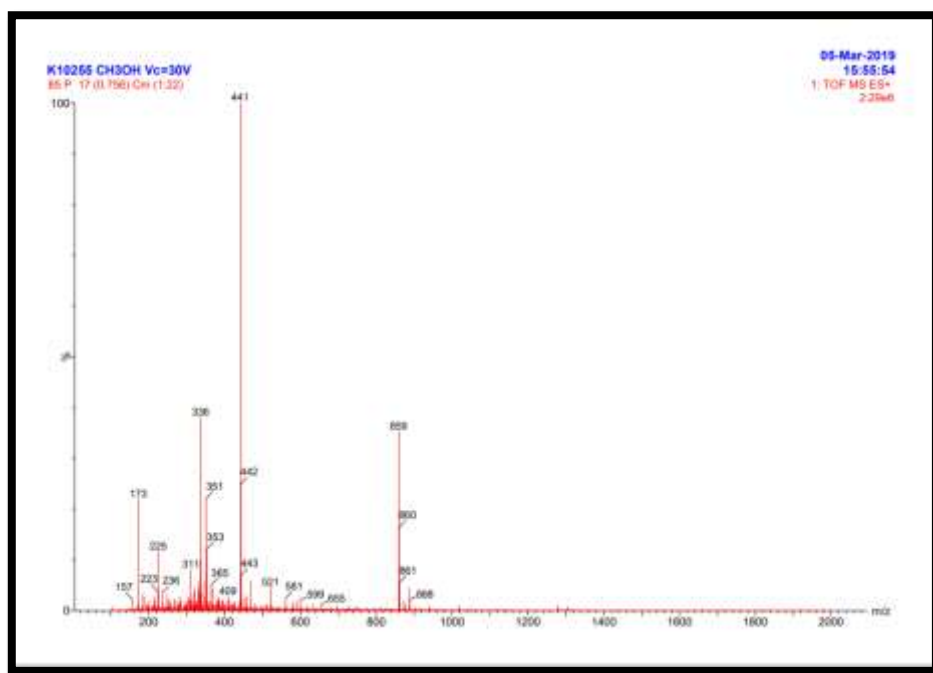
## 6. Analyse par spectrométrie de masse (MS)

L'analyse des spectres de masse des fractions MPLC 16 et 17 confirment la présence d'un composé de masse 418. En effet, le spectre enregistré en mode négatif donne un pic à  $m/z = 417$  correspondant à l'ion  $[MH]^-$ . Le spectre enregistré en mode positif donne un pic à  $m/z = 441$  correspondant à l'ion  $[MNa]^+$ .

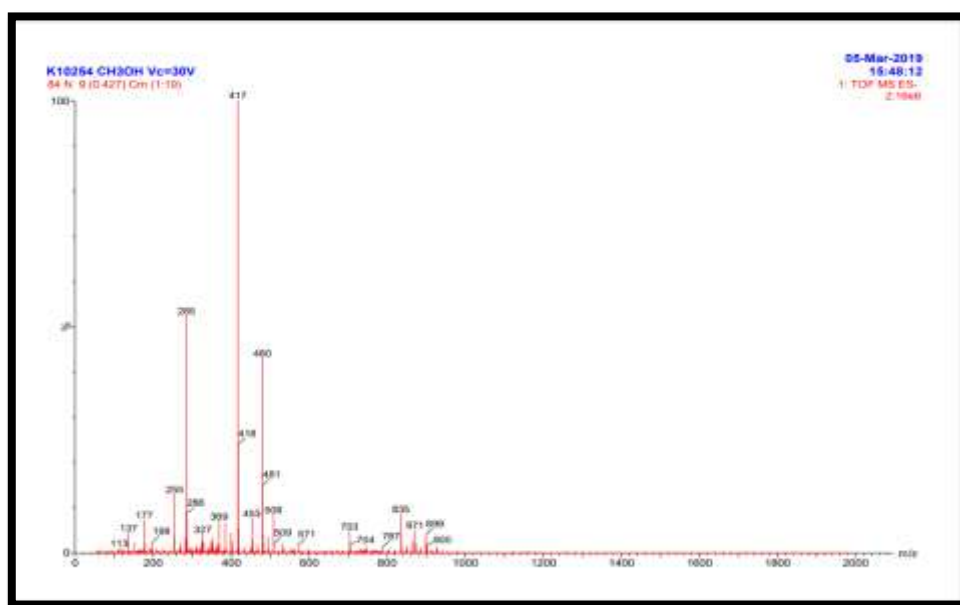
Ces données confirment donc la structure proposée à l'issue de l'analyse RMN, qui correspond au pic **H** des chromatogrammes HPLC, majoritaire dans les feuilles.



**Figure 59 :** Spectre MS de la fraction 16 mode négatif  $[MH]^-$  :  $m/z = 417$ .

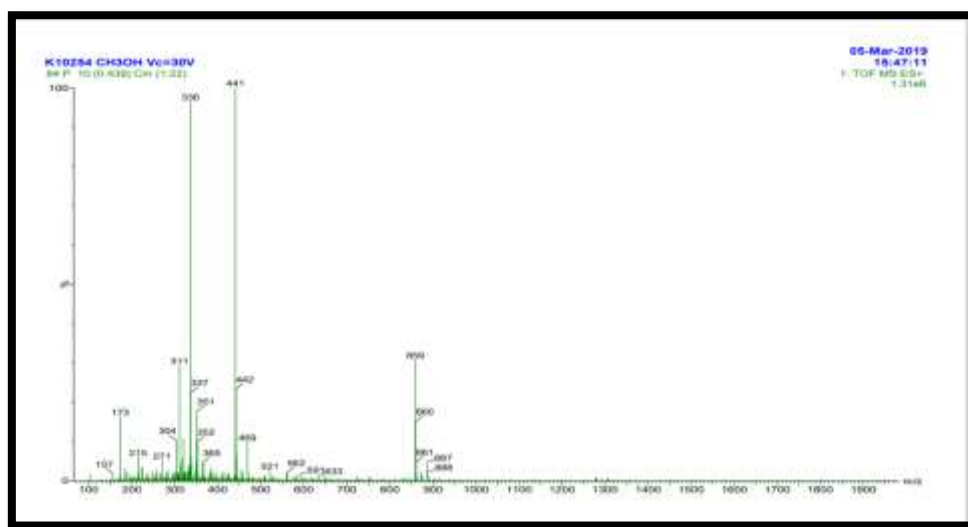


**Figure 60 :** Spectre de masse de la fraction 16 mode positif  $[MNa]^+$  :  $m/z = 441$ .



**Figure 61 :** Spectre MS de la fraction 17 mode négatif  $[MH]^-$  :  $m/z = 417$ .



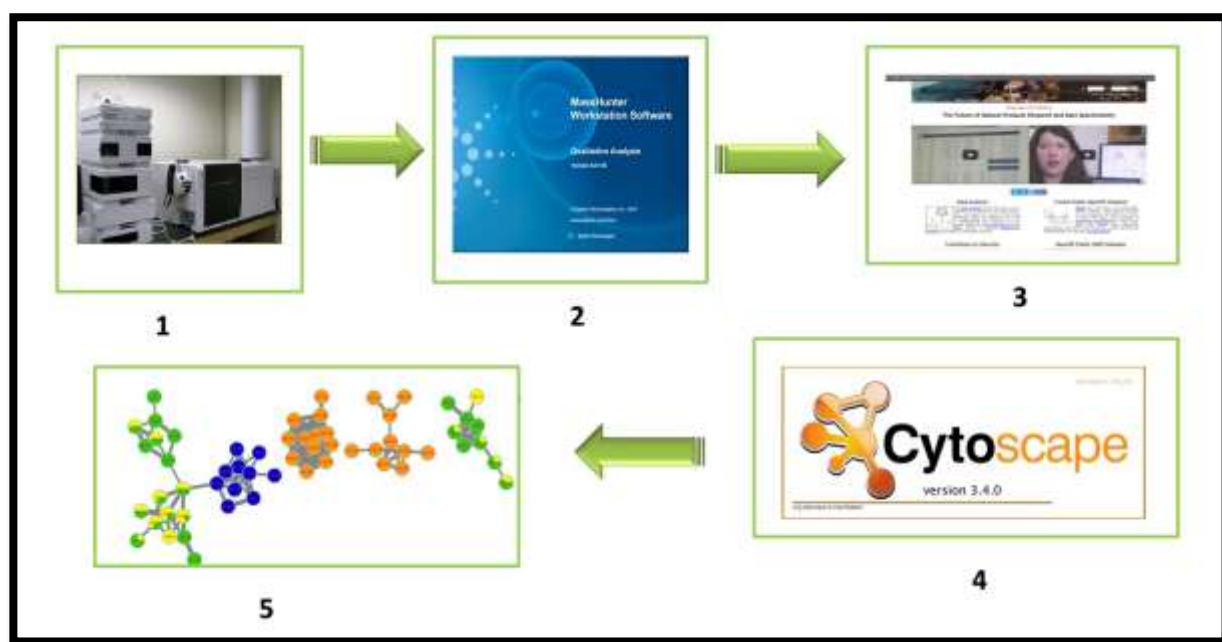


**Figure 62 :** Spectre de masse de la fraction 17 mode positif  $[MNa]^+$  :  $m/z = 441$ .

## 6 Analyse par réseaux moléculaire des extraits de *G.numidica*

Comme présenté dans partie matériel et méthode, il est possible d'annoter les réseaux par des couleurs correspondant aux régions ou aux parties de plantes. Les données sont enregistrées sur la chaîne HPLC-MS/MS (1), traitées sur le logiciel Mass-Hunter afin de générer des fichiers .mgf (2) qui sont envoyés dans la plateforme en ligne GNPS (3). Les données issues de l'analyse par GNPS sont renvoyées et analysées via le logiciel Cytoscape (4) afin de visualiser des réseaux moléculaires (5) en regroupant les molécules apparentées structuralement (selon le degré de similitude des données de fragmentation MS).

L'analyse des données de LC-MS<sup>2</sup> sous forme de réseaux moléculaires permet ainsi de visualiser la complexité des composés présents dans les extraits, de tenter ainsi d'identifier les composés présents et les composés apparentés. Cette analyse permet aussi de comparer des extraits issus de différentes régions et/ou de différentes parties de plante, en utilisant des annotations pertinentes (couleur selon l'origine, valeurs de  $m/z$ , temps de rétention...).



**Figure 63** : Méthode d'obtention des réseaux moléculaires.

Les fichiers mgf sont téléchargés sur la plateforme GNPS (Spectral Library). Les paramètres de création des réseaux sont ensuite précisés.

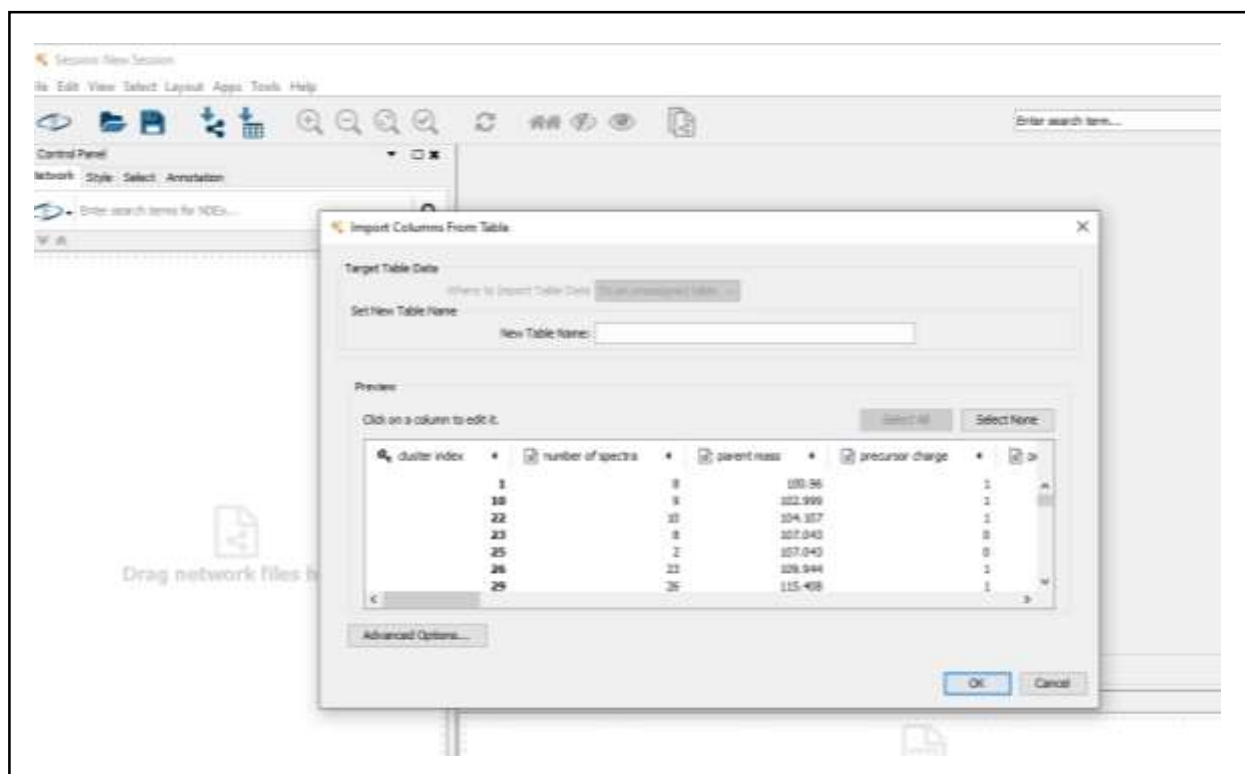
Une fois les liens entre ions du fichier mgf créés et valeur de cosine définies, un ensemble de fichiers issus de GNPS sont disponibles :

| Paramètre sur GNPS                                                       | Valeur  |
|--------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tolérance de masse pour l'ion précurseur (Précurseur Ion Mass Tolérance) | 0,02 Da |
| Tolérance de masse pour l'ion fragment (Fragment Ion Mass Tolérance)     | 0,02    |
| Cosinus (Cosine)                                                         | 0,7     |
| Nombre minimal d'ions de fragments appariés (Min Matched Fragment ions)  | 06      |

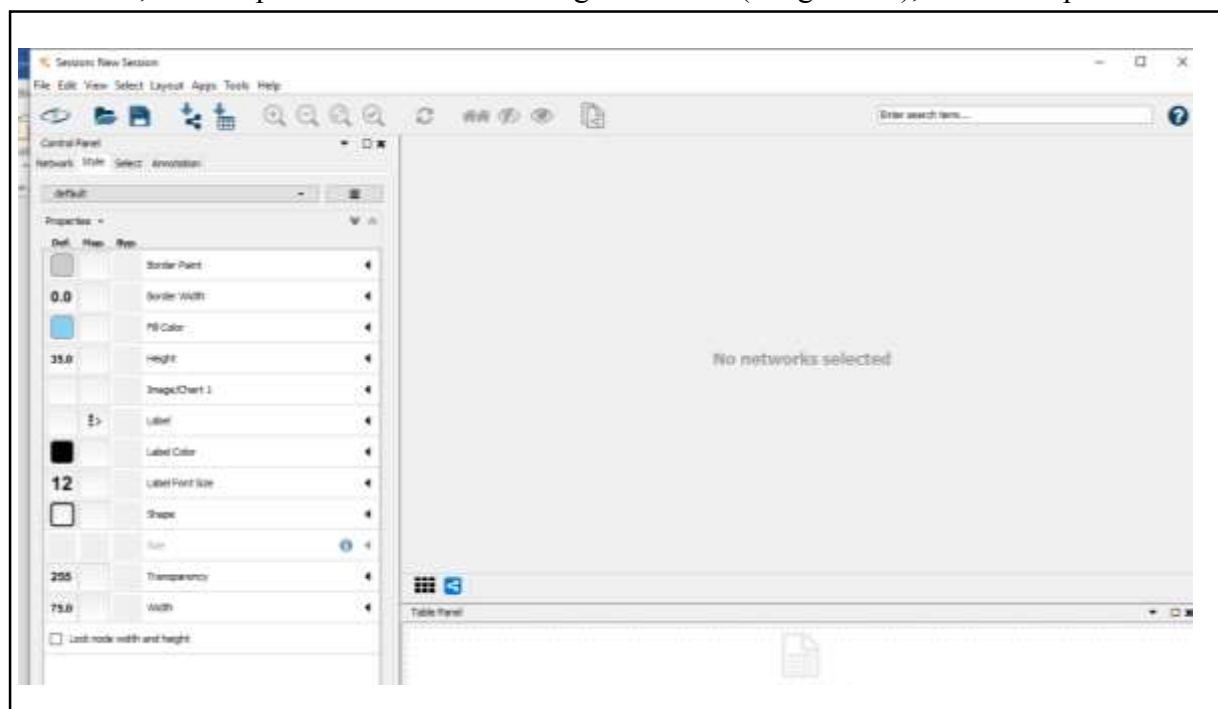
The screenshot displays the GNPS web interface. At the top, there are three tabs: 'Small Data Preset', 'Medium Data Preset', and 'Big Data Preset'. Below these, the 'Basic Options' section includes fields for 'Spectral Library' (with a link to import libraries), 'Spectrum Files (Required)' (with a link for documentation), and several 'Spectrum Files G2' through 'G6' (each with a 'Select Input Files' button). There are also fields for 'Precursor Ion Mass Tolerance' and 'Fragment Ion Mass Tolerance', both set to 0.02 Da. The 'Advanced Network Options' section includes fields for 'Min Pairs Cos' (0.7), 'Network TopK' (10), 'Maximum Connected Component Size (Beta)' (100), 'Minimum Matched Fragment Ions' (6), 'Minimum Cluster Size' (2), and a 'Run MSCluster' dropdown set to 'yes'. There are also fields for 'Group Mapping', 'Attribute Mapping', and 'Metadata File', each with a 'Select Input Files' button.

| Nom                                 |                                                                  |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>            | result_specnets_DB                                               |
| <input type="checkbox"/>            | networkedges_selfloop                                            |
| <input type="checkbox"/>            | networkedges                                                     |
| <input type="checkbox"/>            | groupmapping_converted                                           |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummarygroup_attributes_withIDs_withcomponentID       |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummarygroup_attributes_withIDs_arbitraryattribute    |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummarygroup_attributes_withIDs                       |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummarygroup_attributes                               |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummarygroup                                          |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfosummary                                               |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfogroup                                                 |
| <input type="checkbox"/>            | clusterinfo                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> | params.xml                                                       |
| <input type="checkbox"/>            | METABOLOMICS-SNETS-1351b731-download_cytoscape_data-main.graphml |

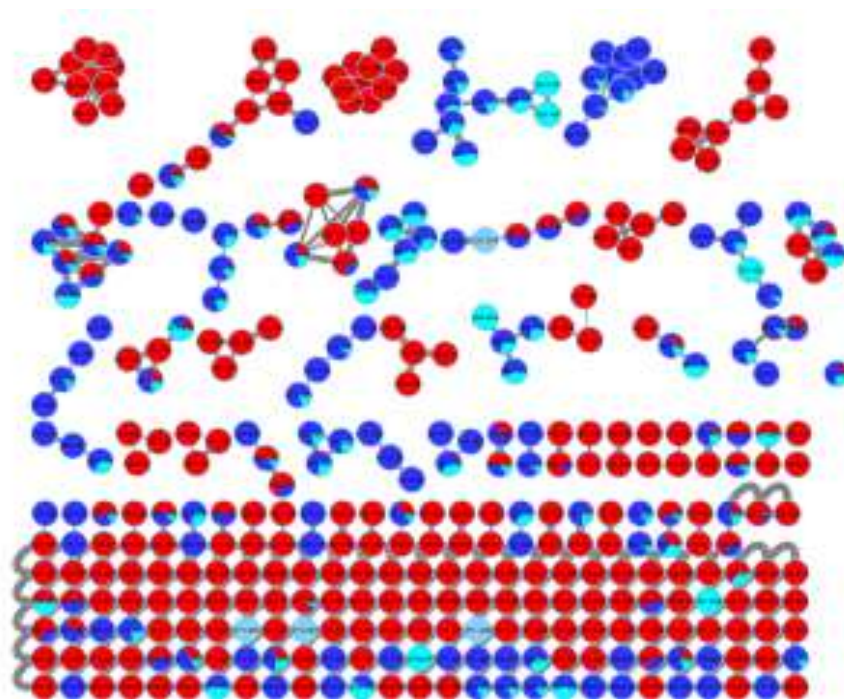
Ces derniers peuvent alors être ouverts dans Cytoscape. L'interface Cytoscape permet d'ouvrir les fichiers envoyés par GNPS. La table de donnée téléchargée se présente ainsi. Les ions parents sont classés par masse.



La table de données peut alors être transformée en réseau. On fixe alors les paramètres de forme des nœuds, couleur pouvant être reliée à l'origine de l'ion (image/chart), taille de la police etc...



Le réseau peut ensuite être visualisé dans Cytoscape :



Les données de LC-MS<sup>2</sup> traitées pour obtenir les différents réseaux correspondent aux extraits suivants :

| Extrait                                       | Echantillon | Région | Station              | Spécimens | Code                 |
|-----------------------------------------------|-------------|--------|----------------------|-----------|----------------------|
| <b>Méthanoliques</b><br>( <i>G.numidica</i> ) | LC-1        | Jijel  | Laghrifet            | Fleur     | Jijel-fleur-lg-st1   |
|                                               | LC-2        | Jijel  | Laghrifet            | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st1 |
|                                               | LC-3        | Jijel  | Laghrifet            | Tige      | Jijel-tige-Lg-St1    |
|                                               | LC-4        | Jijel  | Laghrifet            | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st2   |
|                                               | LC-5        | Jijel  | Laghrifet            | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st2 |
|                                               | LC-6        | Jijel  | Laghrifet            | Tige      | Jijel-tige-Lg-St2    |
|                                               | LC-7        | Annaba | Cap de Garde         | Fleur     | Ann-fleur-Cg-st2     |
|                                               | LC-8        | Annaba | Cap de Garde         | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St2   |
|                                               | LC-9        | Annaba | Cap de Garde         | Tige      | Ann-tige-Cg-St2      |
|                                               | LC-10       | Annaba | Cap de Garde         | Fleur     | Ann-fleur-St3        |
|                                               | LC-11       | Annaba | Cap de Garde         | Feuille   | Ann-feuille-St3      |
|                                               | LC-12       | Annaba | Cap de Garde         | Tige      | Ann-tige-St3         |
|                                               | LC-13       | Annaba | Boukhalfa (Serraidi) | Fleur     | Ann-fleur-St4        |
|                                               | LC-14       | Annaba | Boukhalfa (Serraidi) | Feuille   | Ann-feuille-St4      |
|                                               | LC-15       | Annaba | Boukhalfa (Serraidi) | Tige      | Ann-tige-St4         |
| <b>Alcaloïdique</b><br>( <i>G.numidica</i> )  | LC-16       | Jijel  | Laghrifet            | Fleur     | Jijel-Fleur-St1      |
|                                               | LC-17       | Jijel  | Laghrifet            | Feuille   | Jijel-Feuille-St1    |
|                                               | LC-18       | Jijel  | Laghrifet            | Tige      | Jijel-tige-St1       |

Les principaux constituants identifiés par déréplication des données de LC-MS<sup>2</sup> et de GC-MS sont rappelés ici :

**Tableau 21** : Rappel des identifications issues de la LC-MS<sup>2</sup>

| Extraits       |      |        |                                          |
|----------------|------|--------|------------------------------------------|
| A              | 0,96 | 251,2- | 148,1221 ; 98,1045 ; 70,0713             |
| B (Cytisine)   | 1,05 | 191,1- | 148,0876 ; 82,0687                       |
| C (Anangyrine) | 1,30 | 245,1- | 148,1133 ; 98,0985 ; 70,0676             |
| D (Sparteine)  | 1,39 | 235,2- | 205,0225 ; 149,0117 ; 98,0912            |
| E              | 1,90 | 267,1- | 208,1865 ; 134,0967 ; 98,0987 ; 70,0649  |
| F              | 2,06 | 279,2- | 247,1846 ; 188,1364 ; 134,0976 ; 98,0978 |

| Composés   | Tr (min) | m/z      | Fragments observés (20,45 et 70eV)                             |
|------------|----------|----------|----------------------------------------------------------------|
| Rutoside   | 9,95     | 611,1722 | 465,1010 ; 303,0171 ; 229,0553 ; 153,0178 ; 85,0287            |
| Quercetine | 13,48    | 303,0485 | 229,0553 ; 153,0178 ; 68,9974                                  |
| Apigénine  | 14,71    | 271,2618 | 153,0177 ; 91,0540                                             |
| 5-O-MGG    | 8,17     | 447,1260 | 381,0946 ; 327,0848 ; 283,0591 ; 165,0183 ; 118,0404 ; 55,0185 |
| G          | 10,37    | 449,1 -  | 287,0810 ; 153,0322 ; 69,004                                   |
| H          | 12,24    | 419,1 -  | 271,0624 ; 215,0762 ; 53,0218 ; 91,0568                        |
| I          | 13,43    | 287,0 -  | 213,0571 ; 153,0204 ; 68,9984                                  |
| J          | 14,45    | 505,14   |                                                                |
| K          | 14,79    | 271,0 -  | 215,0890 ; 153,0312 ; 91,0620 ; 65,0446                        |
| L          | 15,97    | 257,1 -  | 137,0266 ; 81,0346                                             |
| M          | 16,22    | 533,1 -  | 285,0811 ; 213,0587 ; 152,0133                                 |
| N          | 18,43    | 285,0 -  | 213,0540 ; 185,0599 ; 124,0146 ; 68,9976                       |
| O          | 18,76    | 311,2-   | 209,1274 ; 153,0603 ; 111,0527                                 |
| P          | 20,13    | 339,1 -  | 283,0688 ; 165,0170 ; 121,0279 ; 68,9972                       |
| Q          | 22,58    | 337,1 -  | 283,0696 ; 219,0907 ; 165,0243 ; 121,0369 ; 65,0418            |
| R          | 24,10    | 149,0 -  | 65,0394                                                        |

**Tableau 22** : Rappel des identifications issues de la GC-MS

| Tr (min) | m/z                       | Interprétation                      |
|----------|---------------------------|-------------------------------------|
| 10,69    | 167, 139, 124, 83, 55, 28 | Présence d'un noyau Pyrrolizidine   |
| 11,49    | 167, 139, 124, 83, 55, 28 | Présence d'un noyau Pyrrolizidine - |
| 12,45    | 167, 139, 124, 83, 55, 28 | Présence d'un noyau Pyrrolizidine - |
| 14,52    | 234, 193, 137, 110, 98    | Sparteine                           |
| 18,24    | 232, 207, 134, 122, 98    | Présence du noyau sparteine         |
| 19,26    | 97, 73                    | Cytisine                            |
| 21,65    | 248, 136, 117, 97, 73     | Lupanine                            |
| 25,2     | 244, 98, 73               | Anangyrine                          |

### 6.1 Annotation des réseaux moléculaires selon la région d'origine.

#### ➤ Extraits analysés

Un réseau moléculaire a été établi entre deux groupes d'extraits méthanoliques de *G.numidica*. Le premier groupe concerne les spécimens de la deuxième station de la zone Laghrifet appartenant à la région de Jijel, le deuxième groupe a été présenté par les spécimens de trois stations différentes de la région d'Annaba (voir tableau).

**Couleurs des nœuds : Les extraits de Jijel en rouge, les extraits d'Annaba en bleu.**

| Extrait                                             | Echantillon | Station                 | Spécimens | Code                 | Couleur |
|-----------------------------------------------------|-------------|-------------------------|-----------|----------------------|---------|
| Extrait<br>MeOH de<br><i>G.numidica</i><br>(Jijel)  | LC-4        | Laghrifet               | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st2   | Rouge   |
|                                                     | LC-5        | Laghrifet               | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st2 | Rouge   |
|                                                     | LC-6        | Laghrifet               | Tige      | Jijel-tige-Lg-St2    | Rouge   |
| Extrait<br>MeOH de<br><i>G.numidica</i><br>(Annaba) | LC-7        | Cap de Garde            | Fleur     | Ann-fleur-Cg-st2     | Bleu    |
|                                                     | LC-8        | Cap de Garde            | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St2   | Bleu    |
|                                                     | LC-9        | Cap de Garde            | Tige      | Ann-tige-Cg-St2      | Bleu    |
|                                                     | LC-10       | Cap de Garde            | Fleur     | Ann-fleur-Cg-St3     | Bleu    |
|                                                     | LC-11       | Cap de Garde            | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St3   | Bleu    |
|                                                     | LC-12       | Cap de Garde            | Tige      | Ann-tige-Cg-St3      | Bleu    |
|                                                     | LC-13       | Boukhalfa<br>(Serraidi) | Fleur     | Ann-fleur-Sr-St4     | Bleu    |
|                                                     | LC-14       | Boukhalfa<br>(Serraidi) | Feuille   | Ann-feuille-Sr-St4   | Bleu    |
|                                                     | LC-15       | Boukhalfa<br>(Serraidi) | Tige      | Ann-tige-Sr-St4      | Bleu    |

● Extraits de jijel  
● Extraits d'Annaba

110



Le réseau obtenu montre qu'on retrouve bien l'apigénine ( $m/z = 271,261$ ) dans les extraits issus des deux régions en proportion variable. Cependant le nœud observé avec l'ion  $m/z$  271 montre que les ions correspondant à priori à un seul et même composé ont été considérés comme plusieurs composés et forme un nœud complexe. Il est donc impossible de conclure que la prédominance de ce composé dans l'une ou l'autre des régions. On peut voir cependant que pour d'autres nœuds, des ions ayant des  $m/z$  très différents sont bien reliés entre eux du fait d'une parenté structurale. On note également que l'ion à  $m/z$  335,1 se retrouve inclus dans plusieurs réseaux. Il est difficile de savoir s'il s'agit de plusieurs composés isomères ayant la même masse ou s'il s'agit du même composé.

Il doit donc être nécessaire de modifier les paramètres de création du réseau pour éviter d'observer la redondance d'ions identiques.

## 6.2 Annotation des réseaux moléculaires selon la partie de la plante

### 6.2.1 Réseau comparant les parties de plantes pour la région Annaba

#### ➤ Extraits analysés

Pour ce réseau, nous avons opté de comparer entre les trois parties des extraits méthanoliques de *G.numidica* (fleur, feuille et tige) provenant de trois stations différentes de la région d'Annaba (voir tableau).

**Tableau 24 :** Identification des extraits de spécimens de *G.numidica* de la région d'Annaba.

| Extrait                                    | Echantillon | Station              | Spécimens | Code               | Couleur |
|--------------------------------------------|-------------|----------------------|-----------|--------------------|---------|
| Extrait MeOH de <i>G.numidica</i> (Annaba) | LC-7        | Cap de Garde         | Fleur     | Ann-fleur-Cg-st2   | Orange  |
|                                            | LC-10       | Cap de Garde         | Fleur     | Ann-fleur-Cg-St3   | Orange  |
|                                            | LC-13       | Boukhalfa (Serraidi) | Fleur     | Ann-fleur-Sr-St4   | Orange  |
|                                            | LC-8        | Cap de Garde         | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St2 | Vert    |
|                                            | LC-11       | Cap de Garde         | Feuille   | Ann-feuille-Cg-St3 | Vert    |
|                                            | LC-14       | Boukhalfa (Serraidi) | Feuille   | Ann-feuille-Sr-St4 | Vert    |
|                                            | LC-9        | Cap de Garde         | Tige      | Ann-tige-Cg-St2    | Marron  |
|                                            | LC-12       | Cap de Garde         | Tige      | Ann-tige-Cg-St3    | Marron  |
|                                            | LC-15       | Boukhalfa (Serraidi) | Tige      | Ann-tige-Sr-St4    | Marron  |



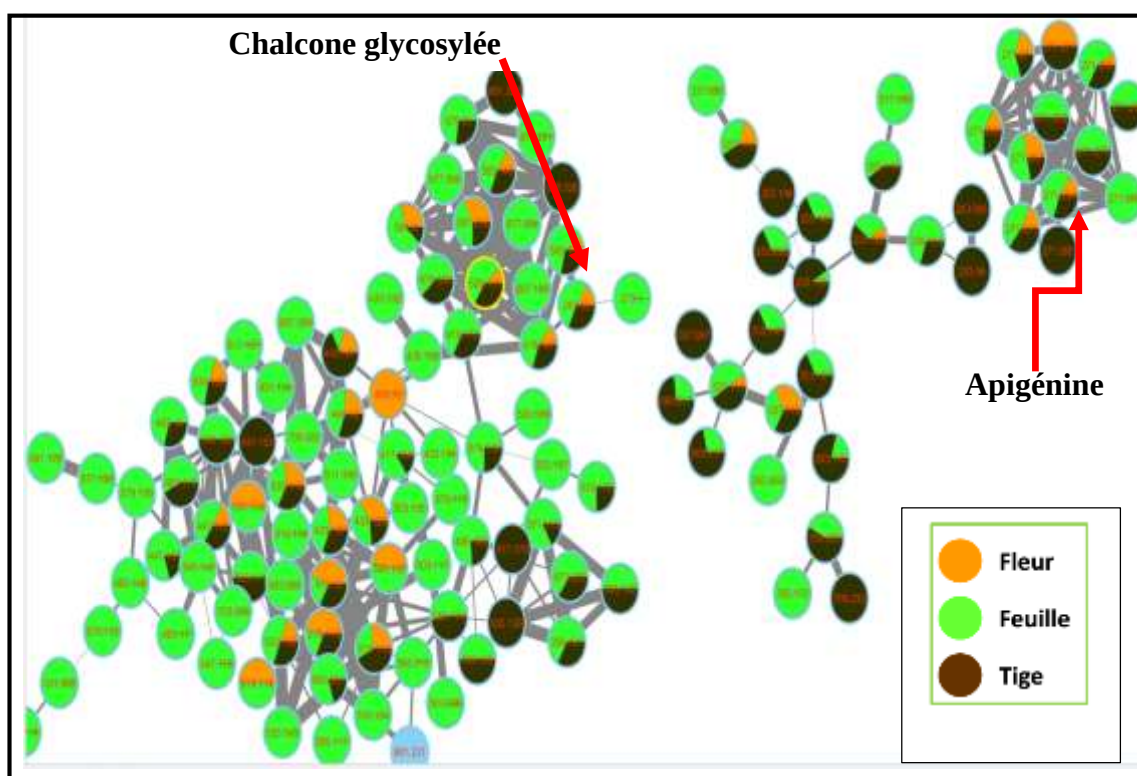
- Graphique de l'image (image chart)

### Couleurs des nœuds :

Les extraits de *G.numidica* de la partie fleur des trois stations différentes en couleur orange, les extraits de *G.numidica* la partie feuille : vert, les extraits de tige : marron.

- Réseau obtenu

On identifie dans ce réseau la chalcone glycosylée (m/z 419,117) et l'apigénine. La chalcone glycosylée est reliée à un réseau de composés de m/z différents pouvant donc correspondre à un groupe de chalcones.



### 6.2.2 Réseau comparant les parties de plantes pour la région Jijel

- Extraits analysés

Une comparaison a été effectuée uniquement entre les trois spécimens (fleur, feuille et tige) de l'extrait méthanolique de *G.numidica* appartenant à la deuxième station Laghrifet (Jijel).

**Tableau 25 :** Identification des extraits de spécimens de *G.numidica* de la station Laghrifet de la région de Jijel.

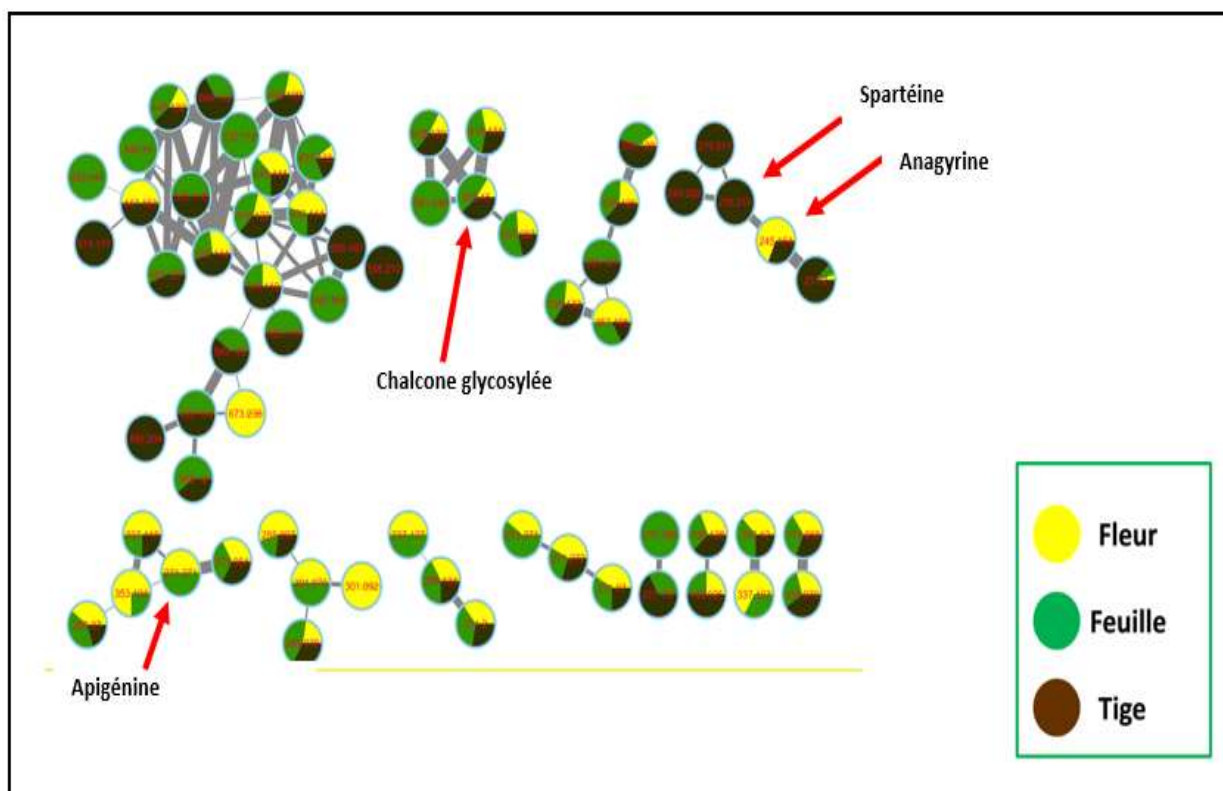
| Extrait                                   | Echantillon | Station   | Spécimens | Code                 | Couleur |
|-------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|----------------------|---------|
| Extrait MeOH de <i>G.numidica</i> (Jijel) | LC-4        | Laghrifet | Fleur     | Jijel-fleur-Lg-st2   | Jaune   |
|                                           | LC-5        | Laghrifet | Feuille   | Jijel-feuille-Lg-st2 | Vert    |
|                                           | LC-6        | Laghrifet | Tige      | Jijel-tige-Lg-St2    | Marron  |

- Graphique de l'image (image chart)

**Couleurs des nœuds : Les extraits de *G.numidica* provenant de la station 2 de Laghrifet (Jijel) ; fleur : jaune, feuille : vert, les extraits de tige : marron.**

- Réseau obtenu

Ce réseau permet une meilleure visualisation des composés connus et permet donc de visualiser des groupes de composés apparentés : alcaloïdes quinolizidiniques, flavonoïdes, chalcones. Dans ce cas, l'apigénine forme un réseau avec d'autres composés ( $m/z = 353$  et  $337$ ) pouvant donc être des flavonoïdes proches de l'apigénine. De même, on identifie dans le nœud des alcaloïdes avec la spartéine et l'anagrine, deux ions ( $m/z 279,211$  et  $m/z 251,2$ ) de composés apparentés (déjà identifiés comme apparentés en LC-MS).



- Conclusion réseaux moléculaires

L'analyse des données de LC-MS<sup>2</sup> par la création de réseaux moléculaires est intéressante et permet d'obtenir des résultats très visuels. On a pu identifier des groupes de composés apparentés dans des nœuds bien distincts les uns des autres. Cependant des nœuds comportent plusieurs fois le même ion et ne sont pas très informatifs. Il est donc nécessaire de bien maîtriser les paramètres de création de réseau afin d'obtenir suffisamment de liens pertinents pour les groupes de composés apparentés sans polluer les réseaux avec des réseaux inutiles formés avec le même ion.

**Conclusion chapitre étude phytochimique :**

L'approche déréplicative a permis d'identifier des alcaloïdes et des composés phénoliques dans les échantillons de *Genista numidica* collectés.

Parmi les composés phénolique identifiés, par déréplication ; il a été possible d'identifier 5 flavonoïdes (pics G, H, I K et O) et 2 isoflavones (pics P et Q) sur la base de fragments caractéristiques, respectivement  $m/z=153$  pour les flavonoïdes et  $m/z=283$  pour les isoflavones. Parmi les flavonoïdes identifiés par déréplication, seule l'apigénine, utilisée comme standard peut être identifiée précisément. Pour les autres flavonoïdes et isoflavones, seul le rattachement au groupe phytochimique est possible sur la base de sa fragmentation, sans identification plus précise des composés.

Le fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *G. numidica* issu de la région de Jijel a permis d'isoler une chalcone glycosylée correspondant au pic H des chromatogrammes HPLC. Cette chalcone a pu être identifiée sur les plaques HPTLC ainsi que dans les réseaux moléculaires.

Concernant les alcaloïdes, parmi les 7 composés utilisés comme standards, 3 composés ont été identifiés dans les 12 extraits de *Genista numidica* de notre étude. Il s'agit de 3 alcaloïdes quinolizidiniques, la cytisine (B), l'anagyrine (C), et spartéine (D). Des fragments caractéristiques d'alcaloïdes quinolizidiniques ont été identifiés, notamment  $m/z$  148,1 ; 98,09 ; 70,06. Le fragment 148,1 est typiques de la fragmentation du motif  $\alpha$ -pyridone. Suite à l'analyse par déréplication GC-MS la présence d'anagyrine a été confirmée. Ces analyses ont permis d'identifier d'autres composés alcaloïdiques : des analogues pyrrolizidiniques et un dérivé de la spartéine. Leur identification n'est permise que par la présence de fragments caractéristiques :  $m/z=83$  pour les pyrrolizidines et  $m/z = 98$  pour le dérivé de spartéine, identifiée comme étant la rétamine dans la base de données NIST.

La visualisation de la complexité chimique des extraits *via* la technique des réseaux moléculaires a été l'occasion de comparer région d'origine et parties de plantes. Cette comparaison visuelle ne permet d'identifier précisément les composés présents dans le réseau, cependant, la présence de composés identifiés tels que l'apigénine, la chalcone glycosylée et les alcaloïdes spartéine et anagyrine, nous permet d'extrapoler la présence de composés proches structuralement au niveau des nœuds créés dans ces réseaux.

Ces résultats préliminaires sont intéressants, cependant, il est nécessaire d'affiner les réglages des paramètres de création des réseaux afin d'assurer une bonne discrimination entre les différents groupes phytochimiques.

## Chapitre II : Dosages et analyses biologiques

## 1 Dosage des composés phénoliques

Les valeurs présentées dans le tableau représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SD. On peut remarquer que dans de nombreux cas, la teneur en polyphénols totaux est inférieure à la teneur en flavonoïdes totaux, ce qui met en lumière la non validité de ces dosages. Cette erreur peut être liée à des problèmes de pesée ou de prélèvements des volumes d'extraits ou de réactifs utilisés. Ils sont cependant présentés ici à titre indicatif.

**Tableau 26** : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques de *G.numidica*.

| N  | Région | Station      | Spécimen | Teneur en polyphénols totaux (mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait) | Teneur en flavonoïdes totaux (mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait) |
|----|--------|--------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Jijel  | El Gherifet  | Fleur    | 65,6 $\pm$ 2,7                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,00                                                                  |
| 2  | Jijel  | El Gherifet  | Feuille  | 57,5 $\pm$ 1,0                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,0                                                                   |
| 3  | Jijel  | El Gherifet  | Tige     | 70,5 $\pm$ 0,2                                                                       | 42,2 $\pm$ 1,9                                                                    |
| 4  | Jijel  | El Gherifet  | Fleur    | 58,1 $\pm$ 4,7                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,0                                                                   |
| 5  | Jijel  | El Gherifet  | Feuille  | 84,5 $\pm$ 3,1                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,0                                                                   |
| 6  | Jijel  | El Gherifet  | Tige     | 73,8 $\pm$ 1,7                                                                       | 70,3 $\pm$ 4,0                                                                    |
| 7  | Jijel  | El Gherifet  | Fleur    | 45,3 $\pm$ 3,6                                                                       | 49,8 $\pm$ 3,1                                                                    |
| 8  | Jijel  | El Gherifet  | Feuille  | 49,4 $\pm$ 1,4                                                                       | 75,4 $\pm$ 5,3                                                                    |
| 9  | Jijel  | El Gherifet  | Tige     | 21,7 $\pm$ 1,4                                                                       | 9,2 $\pm$ 0,1                                                                     |
| 10 | Jijel  | El Gherifet  | Fleur    | 35,4 $\pm$ 4,6                                                                       | 104,9 $\pm$ 2,6                                                                   |
| 11 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 41,4 $\pm$ 2,4                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,0                                                                   |
| 12 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 55,8 $\pm$ 0,2                                                                       | 44,5 $\pm$ 2,2                                                                    |
| 13 | Jijel  | Grand Phare  | Fleur    | 41,0 $\pm$ 1,0                                                                       | 106,6 $\pm$ 0,0                                                                   |
| 14 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 59,2 $\pm$ 1,0                                                                       | 79,8 $\pm$ 2,9                                                                    |
| 15 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 61,7 $\pm$ 0,3                                                                       | 21,0 $\pm$ 2,9                                                                    |
| 16 | Jijel  | Grand Phare  | Fleur    | 61,3 $\pm$ 2,9                                                                       | 54,2 $\pm$ 0,5                                                                    |
| 17 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 45,5 $\pm$ 0,3                                                                       | 42,4 $\pm$ 2,7                                                                    |
| 18 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 77,5 $\pm$ 1,2                                                                       | 07,2 $\pm$ 1,2                                                                    |
| 19 | Jijel  | Grand Phare  | Fleur    | 65,7 $\pm$ 1,5                                                                       | 34,4 $\pm$ 0,8                                                                    |
| 20 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 32,2 $\pm$ 0,2                                                                       | 54,8 $\pm$ 2,4                                                                    |
| 21 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 57,8 $\pm$ 0,6                                                                       | 4,2 $\pm$ 0,7                                                                     |
| 22 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 58,0 $\pm$ 3,1                                                                       | 61,8 $\pm$ 2,4                                                                    |
| 23 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 35,6 $\pm$ 0,5                                                                       | 19,2 $\pm$ 2,6                                                                    |
| 24 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 67,7 $\pm$ 1,2                                                                       | 61,8 $\pm$ 0,0                                                                    |
| 25 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 56,8 $\pm$ 0,9                                                                       | 21,5 $\pm$ 4,2                                                                    |
| 26 | Jijel  | Grand Phare  | Feuille  | 46,5 $\pm$ 1,2                                                                       | 66,0 $\pm$ 2,1                                                                    |
| 27 | Jijel  | Grand Phare  | Tige     | 18,3 $\pm$ 0,1                                                                       | 38,7 $\pm$ 1,3                                                                    |
| 28 | Annaba | Cap de Garde | Fleur    | 59,3 $\pm$ 0,4                                                                       | 66,4 $\pm$ 3,6                                                                    |

|    |        |              |         |          |            |
|----|--------|--------------|---------|----------|------------|
| 29 | Annaba | Cap de Garde | Feuille | 42,2±0,9 | 35,4 ±1,6  |
| 30 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 80,0±1,8 | 2,5 ±1,0   |
| 31 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 56,1±1,0 | 60,1 ±7,0  |
| 32 | Annaba | Cap de Garde | Feuille | 58,5±1,8 | 48,5 ±0,0  |
| 33 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 50,0±0,6 | 36,2 ±1,9  |
| 34 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 38,6±0,9 | 48,4 ±1,0  |
| 35 | Annaba | Cap de Garde | Feuille | 3,6±0,0  | 64,5 ±4,9  |
| 36 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 24,9±0,7 | 45,9 ±2,1  |
| 37 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 30,7±0,5 | 39,7 ±2,9  |
| 38 | Annaba | Cap de Garde | Feuille | 44,9±1,2 | -0,7 ±0,1  |
| 39 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 53,0±1,9 | 11,4 ±1,5  |
| 40 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 96,5±2,5 | 92,4 ±0,0  |
| 41 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 74,2±5,6 | 56,5 ±5,1  |
| 42 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 8,2±0,1  | 48,5 ±3,3  |
| 43 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 35,3±0,4 | 86,7 ±4,7  |
| 44 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 25,8±1,0 | 2,6 ±0,7   |
| 45 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 52,1±1,8 | 5,4 ±0,2   |
| 46 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 60,9±0,4 | 24,2 ±0,1  |
| 47 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 85,5±8,8 | 48,1 ±16,4 |
| 48 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 73,8±5,7 | 39,1 ±1,1  |
| 49 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 75,0±2,2 | 32,1 ±0,0  |
| 50 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 70,9±7,4 | -02,5 ±0,0 |
| 51 | Annaba | Serraidi     | Tige    | 41,7±0,7 | 63,7 ±7,1  |
| 52 | Annaba | Serraidi     | Fleur   | 35,5±0,8 | 89,6 ±7,0  |
| 53 | Annaba | Serraidi     | Feuille | 50,4±0,9 | 54,5 ±1,8  |
| 54 | Annaba | Serraidi     | Tige    | 82,7±2,1 | 16,8 ±0,3  |
| 55 | Annaba | Serraidi     | Fleur   | 44,5±1,0 | 69,3 ±3,1  |
| 56 | Annaba | Serraidi     | Feuille | 81,9±0,4 | 61,7 ±0,0  |
| 57 | Annaba | Serraidi     | Tige    | 67,0±2,8 | 22,9 ±0,8  |
| 58 | Annaba | Serraidi     | Fleur   | 76,4±1,2 | 37,0 ±5,9  |

|    |        |          |         |           |            |
|----|--------|----------|---------|-----------|------------|
| 59 | Annaba | Serraidi | Feuille | 46,5±0,8  | 106,6 ±1,5 |
| 60 | Annaba | Serraidi | Tige    | 0,9±0,2   | 106,6 ±1,5 |
| 61 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 50,5±2,8  | 42,2 ±3,1  |
| 62 | Annaba | Serraidi | Feuille | 37,7±1,9  | 106,6 ±1,0 |
| 63 | Annaba | Serraidi | Tige    | 55,9±4,5  | 106,6 ±2,4 |
| 64 | Annaba | Serraidi | Feuille | 27,1±1,0  | 70,3 ±2,5  |
| 65 | Annaba | Serraidi | Tige    | 135,5±1,8 | 49,8 ±0,0  |
| 66 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 112,0±2,2 | 75,4 ±0,0  |
| 67 | Annaba | Serraidi | Feuille | 46,4±0,9  | 9,2 ±1,7   |
| 68 | Annaba | Serraidi | Tige    | 53,2±1,5  | 104,9 ±1,1 |
| 69 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 66,1±1,1  | 106,0 ±0,0 |
| 70 | Annaba | Serraidi | Feuille | 62,0±1,2  | 44,5 ±2,2  |
| 71 | Annaba | Serraidi | Tige    | 21,9±1,0  | 106,6 ±0,7 |

## 2 Activité antiradicalaire des extraits de *Genista numidica*

Là encore, les dosages donnent des valeurs peu interprétables compte tenu de l'existence de valeurs négatives dans certains cas. Alors que de nombreux travaux rapportent la corrélation entre teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et activité antiradicalaire, cette corrélation n'a pas pu être observée dans nos travaux.

**Tableau 27:** % d'efficacité du DPPH et des extraits MeOH de *G. numidica*.

| N  | Région | Station     | spécimen | % Efficacité DPPH à 200 µg/mL) | % Efficacité ABTS à 200 µg/mL |
|----|--------|-------------|----------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1  | Jijel  | El Gherifet | Fleur    | 67,9 ± 1,1                     | 51,5±1,8                      |
| 2  | Jijel  | El Gherifet | feuille  | 20,2±5,1                       | 45,8 ±3,5                     |
| 3  | Jijel  | El Gherifet | Tige     | 16,3±3,0                       | 27,9 ±1,8                     |
| 4  | Jijel  | El Gherifet | Fleur    | 34,4±0,7                       | 37,3 ±3,1                     |
| 5  | Jijel  | El Gherifet | feuille  | 28,4±3,1                       | 31,4 ±3,2                     |
| 6  | Jijel  | El Gherifet | Tige     | 21,7±3,1                       | 28,9 ±0,0                     |
| 7  | Jijel  | El Gherifet | Fleur    | 30,9±4,1                       | 36,7±7,8                      |
| 8  | Jijel  | El Gherifet | feuille  | 31,7±3,4                       | 15,9 ±4,2                     |
| 9  | Jijel  | El Gherifet | Tige     | 08,1±3,1                       | 17,3 ±0,6                     |
| 10 | Jijel  | El Gherifet | Fleur    | 09,8±4,1                       | 8,6 ±1,9                      |
| 11 | Jijel  | Grand Phare | feuille  | 14,4±4,6                       | 25,8 ±2,7                     |
| 12 | Jijel  | Grand Phare | Tige     | 22,0±3,8                       | 28,2 ±1,2                     |
| 13 | Jijel  | Grand Phare | Fleur    | 05,7±4,2                       | 26,9±5,9                      |
| 14 | Jijel  | Grand Phare | feuille  | 67,2±0,5                       | 38,8 ±2,4                     |
| 15 | Jijel  | Grand Phare | Tige     | 18,6±1,7                       | -0,9 ±3,3                     |
| 16 | Jijel  | Grand Phare | Fleur    | 10,4±1,4                       | 23,9 ±1,8                     |
| 17 | Jijel  | Grand Phare | feuille  | 37,8±2,0                       | 39,2 ±1,7                     |
| 18 | Jijel  | Grand Phare | Tige     | 38,3±1,0                       | 25,2 ±0,6                     |
| 19 | Jijel  | Grand Phare | Fleur    | 9,1±2,2                        | 20,3±0,5                      |
| 20 | Jijel  | Grand Phare | feuille  | 18,7±1,8                       | 34,0 ±3,7                     |
| 21 | Jijel  | Grand Phare | Tige     | 16,4±2,5                       | 30,5±0,2                      |



|    |        |              |         |           |           |
|----|--------|--------------|---------|-----------|-----------|
| 22 | Jijel  | Grand Phare  | feuille | -05,3±3,1 | 09,6 ±2,6 |
| 23 | Jijel  | Grand Phare  | Tige    | 20,9±1,3  | 26,5 ±0,3 |
| 24 | Jijel  | Grand Phare  | feuille | 10,6±4,5  | 13,2 ±1,1 |
| 25 | Jijel  | Grand Phare  | Tige    | 28,0±1,9  | 14,0 ±3,3 |
| 26 | Jijel  | Grand Phare  | feuille | 13,2±0,9  | 18,1 ±0,6 |
| 27 | Jijel  | Grand Phare  | Tige    | 17,1±1,8  | 19,3±1,0  |
| 28 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 11,3±2,2  | 16,9±4,4  |
| 29 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 28,9±3,8  | 33,5 ±1,0 |
| 30 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 13,8±1,3  | 11,0±0,5  |
| 31 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | -08,3±6,0 | 7,4 ±1,0  |
| 32 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 20,7±3,7  | 13,3 ±1,4 |
| 33 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 31,8±3,9  | 32,4 ±2,7 |
| 34 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 8,0±3,6   | 21,2 ±0,7 |
| 35 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 9,2±2,0   | 16,0 ±0,5 |
| 36 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 17,2±1,1  | 08,2 ±0,7 |
| 37 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | -14,7±1,4 | -04,5±0,5 |
| 38 | Annaba | Cap de Garde | feuille | -01,0±2,7 | 5,1 ±0,3  |
| 39 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 65,0±3,5  | 35,3 ±1,7 |
| 40 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 17,3±2,7  | 16,3±1,6  |
| 41 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 34,0±4,3  | 56,2 ±1,0 |
| 42 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 58,4±10,0 | 18,0 ±0,3 |
| 43 | Annaba | Cap de Garde | feuille | -09,8±3,6 | -0,3 ±1,3 |
| 44 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | -10,2±1,2 | -0,6 ±0,6 |
| 45 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 60,4±0,4  | 87,8±8,3  |
| 46 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 2,2±1,8   | 13,3 ±1,3 |
| 47 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 15,2±1,7  | 5,1 ±1,3  |
| 48 | Annaba | Cap de Garde | Tige    | 25,5±1,4  | 29,4 ±0,6 |
| 49 | Annaba | Cap de Garde | Fleur   | 25,5±4,3  | 20,1±0,7  |
| 50 | Annaba | Cap de Garde | feuille | 98,6±0,2  | 51,8 ±2,8 |

|    |        |          |         |           |            |
|----|--------|----------|---------|-----------|------------|
| 51 | Annaba | Serraidi | Tige    | 97,1±2,1  | 85,8 ±0,9  |
| 52 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 32,3±2,5  | 26,8±1,1   |
| 53 | Annaba | Serraidi | feuille | 65,0±1,2  | 34,8±8,3   |
| 54 | Annaba | Serraidi | Tige    | 32,8±2,5  | 12,7 1±1,3 |
| 55 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 9,5±1,8   | 14,9 ±0,6  |
| 56 | Annaba | Serraidi | Feuille | 21,1±1,3  | 20,4 ±2,5  |
| 57 | Annaba | Serraidi | Tige    | 58,4±2,5  | 62,3 ±0,9  |
| 58 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 57,7±3,2  | 62,0 ±0,8  |
| 59 | Annaba | Serraidi | Feuille | 28,1±4,3  | 41,7±18,8  |
| 60 | Annaba | Serraidi | Tige    | 47,6±3,5  | 30,3 ±5,4  |
| 61 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 35,3±2,8  | 38,0 ±5,1  |
| 62 | Annaba | Serraidi | Feuille | 39,9±1,9  | 14,1±2,6   |
| 63 | Annaba | Serraidi | Tige    | 26,4±2,4  | 25,5 ±3,2  |
| 64 | Annaba | Serraidi | Feuille | 27,0±1,3  | 23,9 ±1,3  |
| 65 | Annaba | Serraidi | Tige    | 27,0±3,7  | 42,1 ±5,0  |
| 66 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 1,0±3,1   | 16,2 ±5,3  |
| 67 | Annaba | Serraidi | Feuille | 81,2±0,9  | 84,7 ±8,7  |
| 68 | Annaba | Serraidi | Tige    | -11,3±0,4 | -6,1 ±0,8  |
| 69 | Annaba | Serraidi | Fleur   | 57,2±2,1  | 44,8 ±1,1  |
| 70 | Annaba | Serraidi | Feuille | 74,0±2,2  | 68,4 ±0,5  |
| 71 | Annaba | Serraidi | Tige    | 67,9±1,1  | 22,7±0,7   |

**NB :** Voir avec le tableau des spécimens.

### 3 Activité antibactérienne

Les extraits évalués pour leur activité antibactérienne sont les extraits ayant également fait l'objet d'une analyse GC-MS.

| Nom de La région | Nom de la station       |   | Partie de la plante                    | Echantillons      |
|------------------|-------------------------|---|----------------------------------------|-------------------|
| Jijel            | Laghrifet – Grand Phare | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) | GC-1<br>Extrait 5 |
| Annaba           | Cap de Garde            | 1 | Partie aérienne (fleurs+feuilles+tige) | GC-2<br>Extrait 6 |
| Jijel            | Laghrifet – Grand Phare | 1 | Partie aérienne                        | GC-3<br>Extrait 1 |
| Annaba           | Cap de Garde            | 1 | Partie aérienne, pied 1                | GC-4<br>Extrait 2 |
|                  |                         | 1 | Partie aérienne, pied 2                | GC-5<br>Extrait 3 |
|                  |                         | 2 | Partie aérienne                        | GC-6<br>Extrait 4 |

Les extraits sont testés à une concentration de 200 µg/mL. L'absence de croissance après 24h d'incubation des boîtes de Pétri est le signe d'une activité antibactérienne (+).



**Tableau 28 :** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques et méthanoliques de *G. numidica* (200µg/mL) testés sur les bactéries anaérobie.

|    | Référence                   | Espèce                            | GC-1 | GC-2 | GC-3 | GC-4 | GC-5 | GC-6 |
|----|-----------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | IP56.1                      | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      | +    |      |      |      |      |
| 2  | SA061<br>15001              | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      | +    |      |      |      |      |
| 3  | 1402063306                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | +    | +    |      |      |      |      |
| 4  | 1403028901                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | +    | +    |      |      |      |      |
| 5  | 1403026670                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | +    | +    | +    |      |      | +    |
| 6  | 1405029394                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      | +    |      |      |      |      |
| 7  | 1406032731                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      | +    |      |      |      |      |
| 8  | CIP<br>102914T              | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      | +    |      |      |      |      |
| 9  | CIP 107086                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      | +    |      |      |      |      |
| 10 | 1506004788                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      | +    |      |      |      |      |
| 11 | 1603033400                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      | +    |      |      |      |      |
| 12 | 1611018383                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      | +    |      |      |      |      |
| 13 | 1607071059                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      | +    |      |      |      |      |
| 14 | 1610100575                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      |      |      |      |      |      |
| 15 | 1611014813                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> |      |      |      |      |      |      |
| 16 | 1612036981                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   |      |      |      |      |      |      |
| 17 | ATCC<br>49619/CIP<br>104340 | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   |      |      |      |      |      |      |
| 18 | 1703050320                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      | +    |      |      |      |      |
| 19 | 1703044361                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      |      |      |      |      |      |
| 20 | 1705075622                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |      |      |      |      |      |      |
| 21 | 1709081199                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   |      |      |      |      |      |      |
| 22 | CIP<br>103.227              | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      |      |      |      |      |      |
| 23 | SA 1108<br>4768             | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      |      |      |      |      | +    |
| 24 | UR 1201<br>2651             | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      |      |      |      |      |      |
| 25 | 1308024250                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 26 | 1308025066                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 27 | 1308033490                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 28 | 1308033077                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 29 | 1308049949                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 30 | 1308050230                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 31 | CIP 53 117                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    |      |      |      |      |      |      |
| 32 | 1402025741                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |      |      |      |      |      |      |

Les extraits méthanoliques des deux régions sont actifs sur quelques souches de *Streptococcus*. L'extrait méthanolique issu de la région d'Annaba est cependant actif sur plus de souches que l'extrait issu de la région de Jijel. Les extraits alcaloïdiques sont quant à eux inactifs.

### Conclusion chapitre évaluations biologiques :

Ces résultats se sont montré décevants compte-tenu des résultats non interprétables. Seule l'évaluation de l'activité antibactérienne permet d'envisager de poursuivre dans l'évaluation des composés actifs porteurs de cette activité.

## Chapitre III : Analyse du sol des zones d'études

Pour mieux connaître les principaux facteurs abiotiques (édaphiques) de développement du *Genista numidica*, il a été jugé utile de réaliser une analyse pédologique portant sur les variables suivantes :

- pH
- Granulométrie
- Matière organique
- Conductivité Électrique (CE)
- Calcaire total
- Phosphore assimilable

### 1 Analyses physicochimiques du sol

#### 1.1 Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique a été réalisée sur la partie dite terre fine (diamètre inférieur à 2 mm) des sols séchés à l'air libre et provenant de deux régions d'études (Annaba et Jijel) selon la méthode internationale décrite par Aubert (1978).



**Figure 65 :** Séparation de la suspension limono-argileuse par la pipette de robinson (BNEDER).

La projection des résultats de l'analyse granulométrique du sol de la station d'Annaba sur le triangle texturale (Duchaufour, 1980) montre que le sol analysé présente une texture sableuse. Quant au sol du Jijel, l'analyse granulométrique présente une texture argileuse. D'après ces résultats, on peut déduire que l'espèce *G.numidica* préfère des textures argileuses et sableuse (Voir tableau 27).

**Tableau 29 :** Classes texturales des sols de deux régions d'études (Annaba et Jijel).

| Désignation       | %Argile | % Limon fin | % Limon grossier | %Sable fin | %Sable grossier |
|-------------------|---------|-------------|------------------|------------|-----------------|
| <b>Sol Annaba</b> | 15,73   | 11,00       | 10,20            | 42,53      | 20,53           |
| <b>Sol Jijel</b>  | 29,93   | 11,90       | 11,03            | 23,93      | 23,20           |

## 1.2 Autres paramètres physicochimiques du sol

Les résultats des autres analyses physicochimiques des sols étudiés (Annaba et Jijel), sont portés dans le tableau 28.

**Tableau 30 :** Paramètres d'analyses physico chimiques du sol de deux régions Annaba et Jijel de *Genista numidica* Spach.

| Désignation       | pH (1/5) | CE (mmhos/cm) (1/5) | MO(%) | C(%) | CT (%) | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm) |
|-------------------|----------|---------------------|-------|------|--------|-------------------------------------|
| <b>Sol Annaba</b> | 6,25     | 0,09                | 1,11  | 0,65 | 3,38   | 80,91                               |
| <b>Sol Jijel</b>  | 6,79     | 0,07                | 0,75  | 0,44 | 3,75   | 74,04                               |

### 1.2.1 pH

Selon les normes données par le mémento de l'agronome (1974), le sol d'Annaba est classé comme peu acide (6,25), alors que le sol de Jijel est classé comme neutre (6,79). De tels pH sont dus au manque du calcaire dans les sols. En effet, selon Baize et Jabiol (1995), les sols non calcaires ont des pH inférieur à 7,3.

### 1.2.2 Conductivité électrique (CE)

La mesure de la conductivité permet d'obtenir rapidement une estimation de la teneur en sels dissous. D'après les résultats consignés dans le tableau, la conductivité électrique CE (1/5) à 25°C est inférieure à 0,1mmohS/cm. Selon l'échelle du mémento de l'agronome (1974), les sols de deux régions (Annaba et Jijel) ont une conductivité électrique très faible et est classé comme étant non salin.

### 1.2.3 Matière organique (MO)

Les sols de Jijel et Annaba présentent des teneurs en matière organique considérée comme faible selon Duthil (1970). Cela classe les sols comme étant des sols pauvres en matière organique (0,7et 1,5).

### 1.2.4 Calcaire total ( $\text{CaCO}_3$ )

L'analyse du calcaire total est nécessaire pour affiner la caractérisation des constituants du sol. Le taux en calcaire du sol des deux stations (Annaba et Jijel) sont présentés sous forme de traces (<5%) selon les normes de A.F.E.S(1992). Donc ce sont des sols peu calcaires.

### 1.2.5 Phosphore assimilable ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )

La teneur du phosphore assimilable est considérée comme moyenne selon la méthode d'Olsen si elle varie entre 23-71ppm (Duchaufour, 1979). En effet, les deux sols d'Annaba et Jijel, dépassent ces valeurs, elles varient entre 74.04 et 80.91ppm. Donc, les deux sols étudiés (Annaba et Jijel) sont considérés comme riches en phosphore assimilable.

## 2 Dosage de l'azote total dans le sol et dans les spécimens de *Genista numidica*

Dans le sol, la plus grande partie de l'azote est présente dans la matière organique. Cet azote devient disponible pour les végétaux par le processus de minéralisation, par lequel la décomposition microbienne des matières organiques libère l'azote sous forme minérale. À l'origine, l'azote libéré est sous la forme d'ammonium, rapidement converti en nitrates par les bactéries du sol. C'est la nitrification.

Le dosage de l'azote total du sol des deux stations (Annaba et Jijel) et des spécimens de *Genista numidica* a été envisagé pour identifier la corrélation entre teneur en azote du sol et teneur dans la plante.

Le dosage a été effectué au niveau du laboratoire d'analyse et de contrôle de qualité PILAB à Blida par minéralisation de l'azote de la matière organique en azote ammoniacal (méthode de KJELDAHL).

**Tableau 31 :** Taux d'azote et de protéines du sol des deux stations d'étude.

| Station                    | Taux d'azote | Taux de protéine |
|----------------------------|--------------|------------------|
| Sol Annaba                 | 0,02%        | 0,125%           |
| Sol Jijel                  | 0,05%        | 0,312%           |
| <i>G.numidica</i> (Annaba) | 1,56%        | 9,75%            |
| <i>G.numidica</i> (Jijel)  | 1,38%        | 8,625%           |

**%N = Pourcentage d'azote, %P = pourcentage de Protéine totale**

%P= %N 6,25, avec : 6,25 = Facteur de Conversion

Le sol de la région de Jijel est plus riche que celui de la région d'Annaba. Cette différence de taux d'azote dans le sol ne semble pas affecter la teneur en azote dans la plante puisque les deux échantillons présentent des taux d'azote assez proches. Les Fabaceae sont capables de fixer l'azote du sol grâce à des bactéries du sol (*Rhizobium*) avec lesquelles elles forment une symbiose (nodosités).

### 3 Dosage des métaux lourds dans le sol et dans la poudre de *G.numidica* par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Les résultats de la composition métallique sont exprimés en µg/g et résumés dans le tableau en dessous, à partir d'une dose d'essai de 0,5 g, pour les deux échantillons de sol et de *Genista numidica* Spach. Il est à noter que chaque essai est répété deux fois et une moyenne a été calculée.

**Tableau 32 :** Dosage des métaux lourds du sol par SAA des deux stations d'études (Annaba et Jijel).

| Sol                   | Ni * | Cu*  | Pb* | Cd*    | Cr   | Zn   |
|-----------------------|------|------|-----|--------|------|------|
| Annaba                | 0,7  | 7,4  | 2   | ≤0,023 | 5,25 | 44,2 |
| Jijel                 | 4,5  | 13,5 | 12  | ≤0,023 | 8,75 | 5,3  |
| Norme AFNOR NFU44-041 | 50   | 100  | 100 | 2      | -    | -    |

Limite de détection (mg/Kg) : Ni : 0.005, Cd : 0.023, Pb : 0.001, Cu : 0.03, Cr, Zn.

D'après l'analyse des résultats du tableau, on remarque que les teneurs moyennes des métaux lourds des sols de deux stations d'études sont nettement inférieures aux normes AFNOR.

**Tableau 33:** Dosage des métaux lourds par SAA de la poudre de *Genista numidica* Spach de deux stations d'études (Annaba et Jijel).

| <i>G. numidica</i> | Ni *   | Cu*  | Pb* | Cd*    | Cr            | Zn   |
|--------------------|--------|------|-----|--------|---------------|------|
| Annaba             | 0,7    | 3,8  | 9   | ≤0,023 | Indéetectable | 16,3 |
| Jijel              | ≤0,005 | 9,65 | 1   | ≤0,023 | Indéetectable | 17,6 |

Limite de détection (mg/Kg) : Ni : 0,005, Cd : 0,023, Pb : 0,001, Cu : 0,03,

En conclusion selon les normes données par AFNOR, les sols de deux stations étudiées ne sont pas contaminés par les métaux lourds (Ni, Cu, Pb, Cd, Cr et Zn).

#### 4 Analyse des micro-organismes du sol par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

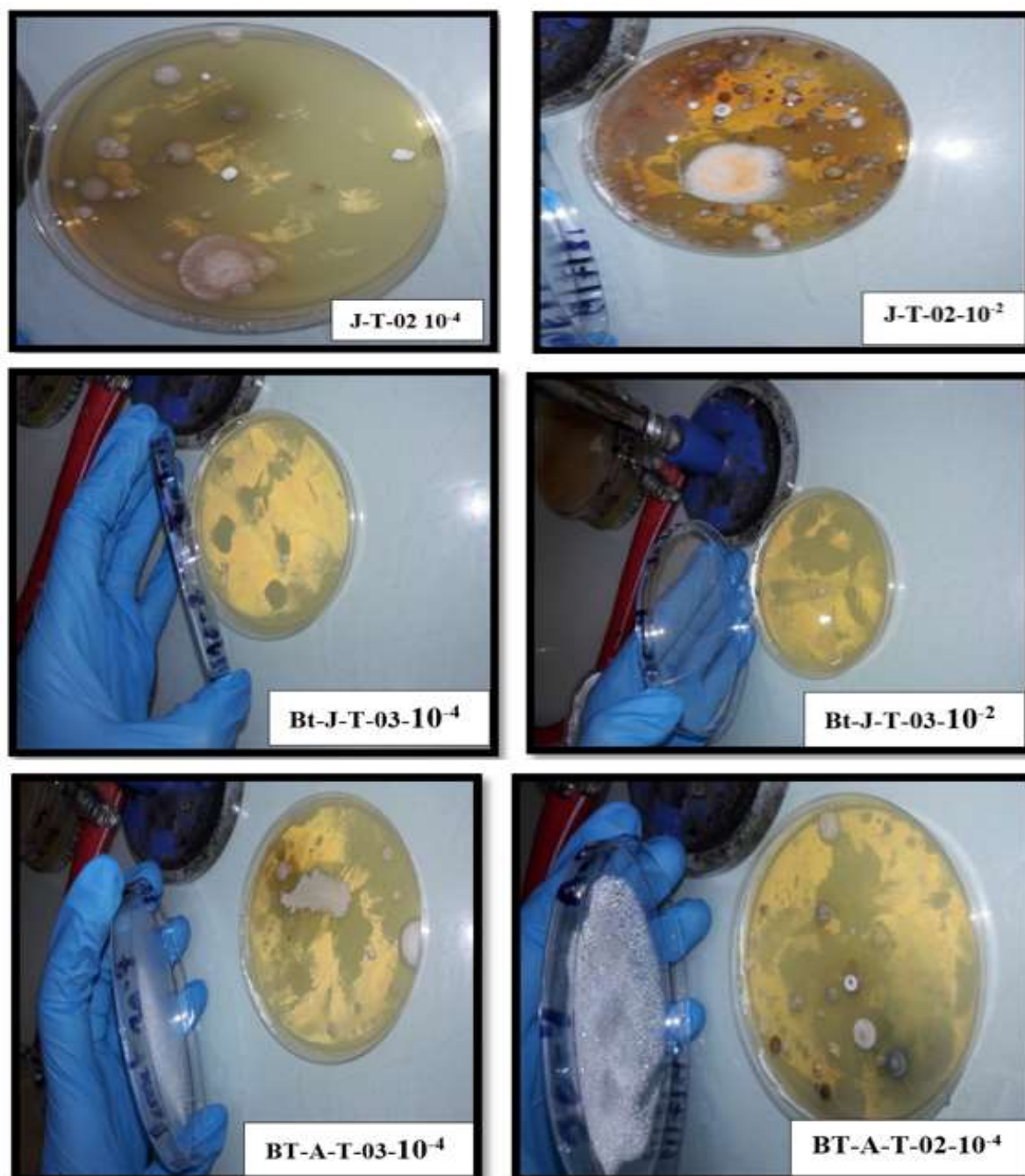
L'analyse réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Biotyper-Burker) d'échantillons de sol des deux régions d'études (Annaba et Jijel), nous a permis d'identifier des microorganismes associés aux spécimens collectés de *G. numidica* Spach.

**Tableau 34 :** Echantillons du sol traité et non traité à analyser par Maldi-Tof.

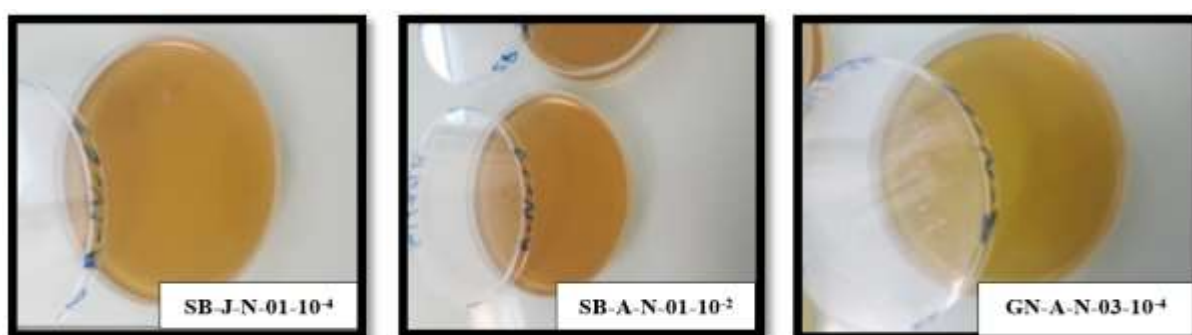
| Nom d'échantillon           | Code d'échantillon | Nom d'échantillon        | Code d'échantillon |
|-----------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>Sol traité</b>           |                    | <b>Sol non traité</b>    |                    |
| <b>Sol-Annaba-traité-01</b> | A-T-01             | Sol-Annaba-non traité-01 | A-N-01             |
| <b>Sol-Annaba-traité-02</b> | A-T-02             | Sol-Annaba-traité-02     | A-N-02             |
| <b>Sol-Annaba-traité-03</b> | A-T-03             | Sol-Annaba-traité-03     | A-N-03             |
| <b>Sol-jijel-traité-01</b>  | J-T-01             | Sol-Jijel- non traité-01 | J-N--01            |
| <b>Sol-jijel-traité-02</b>  | J-T-02             | Sol-Jijel-non traité-02  | J-N-02             |
| <b>Sol-jijel-traité-03</b>  | J-T-03             | Sol-Jijel--non traité-03 | J-N-03             |

**Tableau 35 :** Résultats positifs des échantillons du sol testés après incubation.

| Nature du micro-organisme | Milieu de culture | Nom de l'échantillon | Code   | Dilution  |
|---------------------------|-------------------|----------------------|--------|-----------|
| Bactéries                 | Gélose nutritive  | Sol Annaba           | A-N-01 | $10^{-4}$ |
|                           |                   |                      | A-N-03 | $10^{-2}$ |
|                           |                   | Sol Jijel            | J-N-01 | $10^{-2}$ |
|                           |                   |                      | J-N-01 | $10^{-4}$ |
|                           |                   |                      | J-N-03 | $10^{-2}$ |
|                           |                   |                      | J-N-03 | $10^{-4}$ |
| Champignons               | Gélose sabouraud  | Sol Jijel            | J-N-01 | $10^{-2}$ |
|                           |                   | Sol Annaba           | A-N-01 | $10^{-2}$ |
|                           |                   |                      | A-N-01 | $10^{-4}$ |
|                           |                   |                      | A-N-03 | $10^{-2}$ |
| Streptomycètes            | Bennett           | Sol Jijel            | J-T-02 | $10^{-2}$ |
|                           |                   |                      | J-T-02 | $10^{-4}$ |
|                           |                   |                      | J-T-03 | $10^{-2}$ |
|                           |                   |                      | J-T-03 | $10^{-4}$ |
|                           |                   | Sol Annaba           | A-T-02 | $10^{-4}$ |
|                           |                   |                      | A-T-03 | $10^{-4}$ |



**Figure 66** : Résultats positifs du milieu BENNETT.



**Figure 67** : Résultats négatif du milieu sabouraud et gélose nutritive.



#### 4.1 Identification des microorganismes des sols analysés par Maldi-Tof

La biologie moléculaire et la génomique ont permis des progrès considérables dans la connaissance de la biodiversité microbienne environnementale, principalement pour les bactéries, mais aussi pour les champignons microscopiques, dans les eaux et les sols. Néanmoins, la variabilité du génome d'un isolat à l'autre et l'obtention d'une identification à partir de fragments "non viables" questionnent sur les résultats de la métagénomique. La culturomique, est une autre approche complémentaire émergente de caractérisation des communautés microbiennes cultivables, qui consiste, après une mise en culture des échantillons de sol dans des conditions diversifiées, à identifier les microorganismes ainsi isolés par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou par séquençage de l'ADN.

L'identification par MALDI-TOF est basée sur les découvertes suivantes :

- L'empreinte spectrale varie entre les microorganismes,
- Parmi les composés détectés dans le spectre de masse, certains pics sont spécifiques du genre, de l'espèce et même dans certains cas de la sous espèce,
- Les spectres obtenus sont reproductibles pour autant que la croissance des microorganismes se fasse dans les mêmes conditions. Cependant, même si les conditions de culture varient, de nombreux pics sont conservés : ce sont ceux-ci qui sont potentiellement les plus aptes à être utilisés comme biomarqueurs spécifiques, permettant l'identification microbienne.

Après acquisition des spectres, deux méthodes sont possibles pour les analyser et obtenir une Identification :

- La première approche consiste à comparer le spectre obtenu à une base de données spectrale pour obtenir une identification. Cette solution est rapide, simple et facile à implémenter en routine, pour peu qu'une base de données suffisamment complète et robuste soit disponible.
- La deuxième approche consiste à estimer la masse moléculaire des pics obtenus et à la comparer avec des masses moléculaires protéiques théoriques obtenues à partir de génomes séquencés. Cependant, pour les bactéries comme pour les champignons filamenteux, cette méthode est limitée par le nombre de génomes séquencés et également par l'avancée limitée du développement des bases de données protéiques.

Les systèmes commerciaux d'identification microbienne par spectrométrie de masse reposent donc sur la première approche.

Dans notre cas, le traitement de données a été réalisé par le logiciel MALDI BioTyper TM 2.0 (Bruker Daltonics) au centre de recherche CRAPC. Le résultat est exprimé via un score logarithmique allant de 0,000 à 3,000. Il s'agit d'un score de corrélation entre le spectre obtenu avec le microorganisme inconnue et le spectre de référence le plus proche identifié dans la base



de données qui correspond à une probabilité d'identification. En fonction de ce dernier, une représentation par code couleur (vert, jaune ou rouge) et une valeur allant de (-) à (+++) est proposée (tableau 34).

**Tableau 36:** Score de concordance des spectres obtenus à partir du microorganisme d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.

| Score       | Description de l'identification                                                         | Degré d'identification | Couleur |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------|
| 2,300-3,000 | Forte probabilité d'identification à l'espèce (Identification avec une haute confiance) | (+ + +)                | Vert    |
| 2,00-2,299  | Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable                   | (+ +)                  | Vert    |
| 1,700-1,999 | Identification au genre probable (Identification avec une faible confiance)             | (+)                    | Jaune   |
| 0,000-1,699 | Degré de confiance insuffisant pour l'identification (Aucune identification possible)   | (-)                    | rouge   |

Un "matching score" ou score d'appariement et de fiabilité d'identification, basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Un score supérieur à 2,000 (ou compris entre 2,000 et 3,000) indique une bonne fiabilité et une forte probabilité de d'identification l'espèce (tableau 36). Le rang du genre, à ce score étant totalement sécurisé.

Un indice de confiance (ou de cohérence) est attribué à un résultat d'identification (tableau 35) et peut être consulté secondairement au score d'identification :

- A : haute cohérence
- B : faible cohérence
- C : aucune cohérence

**Tableau 37** : Description des indices de confiance.

| Catégorie | Description                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (A)       | <b>Haute cohérence</b> : Le meilleur résultat correspond à une identification avec une haute confiance. Le deuxième meilleur résultat est (1) une identification avec une haute confiance, dans laquelle l'espèce est identique au meilleur résultat, (2) une identification avec une faible confiance, dans laquelle le genre est identique au meilleur résultat, ou (3) une absence d'identification. |
| (B)       | <b>Faible cohérence</b> : Les exigences pour un indice de cohérence élevé ne sont pas atteintes. Le meilleur résultat correspond à une identification avec une confiance haute ou faible. Le deuxième meilleur résultat est (1) une identification avec une confiance haute ou faible, dans laquelle le genre est identique au meilleur résultat ou (2) une absence d'identification.                   |
| (C)       | <b>Pas de cohérence</b> : Les exigences pour un indice de cohérence élevé ou faible ne sont pas atteintes.                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

17 souches ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une extraction simple à l'acide formique a été nécessaire pour améliorer l'identification de 17 souches (tableau 35).

- 3 souches sur 17 ont été identifiées au rang d'espèces.
- 7 souches sur 17 ont été identifiées au rang de genre : 3 souches du groupe staphylocoque, 3 souches du groupe bacillus et 1 souche du groupe micrococcus.

**Tableau 38** : Identification des isolats microbiens par MALDI-TOF MS.

| Isolat | Milieu           | Identification selon MALDI Biotyper | Scores                |
|--------|------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| A-T-01 | Bennett          | <i>Staphylococcus warneri</i>       | 1,931                 |
| A-T-02 | Bennett          | <i>Staphylococcus hominis</i>       | 2,133                 |
| A-T-03 | Bennett          | <i>Staphylococcus hominis</i>       | 2,15                  |
| J-T-02 | Bennett          | <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | 1,863                 |
| J-T-03 | Bennett          | <i>Staphylococcus hominis</i>       | 2,175                 |
| A-N-01 | Gélose nutritive | <i>Bacillus cereus</i>              | 1,708                 |
| A-N-02 | Gélose nutritive | <i>Bacillus megaterium</i>          | 1,953                 |
| J-N-01 | Gélose nutritive | <i>Staphylococcus hominis</i>       | 1,714                 |
| J-N-03 | Gélose nutritive | <i>Micrococcus luteus</i>           | 1,866                 |
| A-N-01 | Sabouraud        | <i>Bacillus megaterium</i>          | 1,794                 |
| A-N-03 | Sabouraud        | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 2,043 ; 1,756 et 1,95 |

Il a été constaté des difficultés dans l'identification de certaines espèces en MALDI-TOF. La présence de plusieurs souches de *Staphylococcus* dont *S. epidermidis* et *S. hominis*, ainsi que des souches du genre *Bacillus* et *Micrococcus*. Il est difficile de savoir si la présence de ces souches est liée à une contamination au cours des prélèvements, des manipulations ou bien à une présence tellurique indépendante des manipulations.

Pour l'espèce *Enterobacter cloacae*, trois identifications successives dans les mêmes conditions pour une même souche n'ont pas donné les mêmes scores et indices. Les trois résultats d'identification ont donné un score=2,043 (A++), un score=1,95 (B+) et un score=1,765 (B+). L'indice de confiance attribué n'était donc pas reproductible même si l'espèce était toujours la même.

Selon les données relevées sur les rapports (Annexe), nous déduisons cinq points essentiels :

- Les 2 isolats bactériens du sol de la région d'Annaba ainsi que celui de Jijel ont été identifiés au rang de l'espèce grâce au MALDI TOF (car score > 2,000). L'on peut conclure à ce stade que la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est bien établie comme étant une méthode précise et rentable pour l'identification des espèces bactériennes ;
- L'absence d'identification liée au non détection des pics (score 0) n'est pas Considérée comme un résultat erroné mais une erreur survenue à cause d'un dépôt de mauvaise qualité par l'expérimentateur ;
- Lors d'une analyse MALDI, un prélèvement est mis en suspension dans le mélange d'extraction. Cependant, que la culture soit liquide ou gélosée, cet échantillon contient un extrait de ce milieu de culture. Il est donc important d'en évaluer l'impact pour permettre une identification rigoureuse. Le temps de culture est aussi à optimiser, puisqu'en fonction de l'âge de la culture, les composés cellulaires varient. Ceci peut influencer les données spectrales.
- L'identification de certaines espèces comme les streptocoques, les bactéries anaérobies où les champignons pourraient être améliorés par une mise à jour et un enrichissement de la base de données les concernant. Il n'y a théoriquement aucune limite à la capacité d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour autant que la base de données contienne suffisamment de spectres de référence adéquats contienne suffisamment de spectres de référence.
- L'identification des champignons filamenteux pose de nombreux problèmes. Elle requiert l'intervention de mycologues expérimentés qui, parfois, n'auront d'autre solution que de recourir à une confirmation ou une identification par biologie moléculaire. En fait, les systèmes commercialisés permettant une identification extemporanée des levures et des bactéries par la technologie MALDI-TOF ne proposent pas de bases de spectres de référence suffisamment étoffées pour couvrir la diversité des moisissures.

## Conclusions et perspectives de la section I

Ce travail a permis d'identifier plusieurs métabolites de specimen de *Genista numidica* Spach collectés dans deux régions du nord-est algérien (Numidie). Les approches déréplicatives par LC-MS/MS et GC-MS ont permis d'identifier plusieurs composés, à la fois des composés phénoliques, tels que des flavonoïdes (apigénine), isoflavones et chalcone, et des alcaloïdes quinolizidiniques (cytisine, anagyrine et spartéine). Une chalcone glycosylée a pu être isolée par des méthodes de purification associant chromatographie de partage centrifuge (CPC) et chromatographie moyenne pression (MPLC). La détermination structurale de cette chalcone a été réalisée par étude des spectres de résonance magnétique nucléaire et de spectrométrie de masse.

La visualisation de la complexité chimique des extraits analysés à travers des réseaux moléculaires a permis de mettre en évidence les variations de composition selon la région de collecte et la partie de plante. Parmi l'ensemble des métabolites présents sur les réseaux, les ions des composés identifiés par les approches déréplicatives représentent des standards. Ils permettent ainsi d'extrapoler les composés présents dans les différents nœuds comme étant des composés proches structuralement de ces standards.

Les données issues de ces analyses sous forme de réseaux moléculaires restent préliminaires et doivent être poursuivies afin de mieux cerner la variabilité chimique des échantillons issus des différentes zones de collectes.

L'analyse du sol et de la flore associée a mis en évidence la présence de plusieurs souches du genre *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Micrococcus*. Il n'y a pas eu de mise en évidence de flore spécifique d'une région, ni de présence de bactéries spécifiques des nodosités présentes au niveau du système racinaire des Fabaceae, du genre *Rhizobium* notamment. Une étude plus spécifique des bactéries présentes au niveau des nodosités reste à réaliser, en envisageant des méthodes de prélèvements spécifiques des nodosités.

## Références bibliographiques

- 1- Anonyme., 1997. Analyse du milieu agricole dans la wilaya de Jijel. Bureau National du Développement Rural. p80.
- 2- Application book, Soil total digestion –HRR-EN-13, MilestoneSRL-helpingChemists.05-11. (www.milstonesrl.com/application@milstonesrl.com).
- 3- A.F.E.S., « Référentiel pédologique », 1992. Principaux sols d'Europe, Ed. I.N.R.A, p 222.
- 4- Aubert, G., 1978. Méthodes d'analyses des sols, centre de documentation pédagogique, Marseille, p 191.
- 5- Ati S., 2010. Cartographie de l'aire de répartition de l'espèce *Genista numidica* ssp *numidica* et sa valeur biologique dans l'Est algérien. Thèse de magister en en écologie végétale Université, Badji Mokhtar, Annaba, p 82.
- 6- Bagnouls, F et Gaussen, H., 1953. Saison sèche et indice xérothermique. Bull. Soc. Hist. Nat 8,p 239.
- 7- Bampouli, A., Konstantina, k., Georgios, P., Vasiliki, L., Nektarios, A., Kostis, Ma., Magdalini, K., 2015. Evaluation of total antioxydant potential of Pistacia lentiscus var.chia leaves extraxts using UHPLC-HRMS, journal-engineering 167, part A, 25-31.
- 8- Bakircioglu, D., Bakircioglu, Y.,Yurtsever, S., 2012. Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. Food Chemistry 138,770-775.
- 9- Baize, D., Jabiol, B., 1995. Guide pour la description des sols, Ed. I.N.R.A., Paris, p 375.
- 10- Berthod, A., Hassoun,M., Ruiz-Angel, M.J., 2005. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in counter current chromatography, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383: 327-340.
- 11- Boudreau PD, Monroe EA, Mehrotra S, Desfor S, Korobeynikov A, 2015. Expanding the Described Metabolome of the Marine Cyanobacterium *Moorea producens* JHB through Orthogonal Natural Products Workflows. PLOS ONE 10(7): e0133297.
- 12- Boutaghane, N., Voutquenne-NaKzabadioko, Harakat, L.,Simon, D., Kabouche, Z., 2013. Triterpene saponins of *Genista ulicina* Spach. Phytochemistry 93,176-181.
- 13- Boutaghane N, AlabdulMagid A, Abedini A, Cafolla A, Djeghim H, Gangloff SC, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche Z., 2019. Chemical constituents of *Genista*

- numidica Spach aerial parts and their antimicrobial, antioxidant and antityrosinase activities. Nat Prod Res. 33, 12, 1734-1740.
- 14- Catier, O., Roux, D., 2007. Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, 3<sup>ème</sup> édition, Ed:Wolkers Kluwer, 9 p.
- 15- Cheng, Q., 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. Journal of Integrative Plant Biology 50,786-798.
- 16- Cristina,C.,2012. La spectrométrie de masse Maldi-Tof et le diagnostic microbiologique, ICHV, Laboratoire de microbiologie Sion, p75.
- 17- Descy,J., Meex,C., 2010. Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute, Revue médicale de Liège 65, 29-34.
- 18- Dorrestein, C., Jane, Y., Yang, Laura, M.S., 2013. Molecular networking as a dereplication strategy 76(9), 1686-1699.
- 19- Doyle, J.J, Luckow, M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology 131,900-910
- 20- Duchaufour, P., 1979. Constituants et propriétés du sol précis de pédologie tome II. Edition masson. p 247.
- 21- Duchaufour, P., 1980. Pédologie : Pédogénèse et classification, T1, 2<sup>ed</sup>, Masson, Paris, p477.
- 22- Duthil, J., 1970. Elément d'écologie et d'agronomie, T1, Ed. Ballière et fils, p315.
- 23- Emberger, L., 1955. Une classification biogéographique des climats. Rec. Trav. Lab. Géol. Bot. Zool. Sci. Montpellier 7, 1-47.
- 24- Giachi, I., Manunta, A., Morelli, I., Pistelli, L., 2002. Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. Biochemical Systematic Ecology 30, 801-803.
- 25- Gounot, M., 1969. Méthodes d'étude quantitative de la végétation. Ed Masson et Cie, Paris, p 314.
- 26- Harborne, J.B., 1994.Phytochemical Dictionary of Leguminosae. Chapman & Hall, London, 313-330.
- 27- Harborne, J.B., 1969. Chemosystematics of the leguminosae, flavonoid and patterns in the tribe Genisteae. Phytochemistry, 8:1449-1456.
- 28- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P., 2002. Botanique systématique. Une perspective phyllogénétique. Paris, Bruxelles, De Boek Université, 282.

- 29- Kacem,N., Gossens, J-F.,Duhail, N., Roumy V.,HennebelleT.,Christen, P.,Hostttman, K ., Rhouati S.,2014. Determination of alkaloids in endemic *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae), Biochemical Systematics and Ecology 56,83-87.
- 30- Kacem,N., Roumy, V., Duhal, N., Merouane,F.,Neut,C., Christenf,P., Hostettmannf K,Rhouati,S.,2016.Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities, Industrial Crops and Products 90,87-93
- 31- Kirch, J., Veit, M., Watzig, H., Greinwald, R., Czygan, F., 1995. Alcaloidal variation in *Genista lobeliis*.l. (Fabaceae), Biochemical Systematics and Ecology 23,635-643.
- 32- Lewis, G.P., 2005. Caesalpinieae. In: Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M. (Eds). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK, 127.
- 33- Martins, A., Wink, M., Tei, A., Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., Rauter, A.P., 2005. Phytochemical study of quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas– liquid chromatography/mass spectrometry. Phytochemical Analysis 16, 264.
- 34- Maire,R.,1987. La flore de l'Afrique du Nord. Les Légumineuses., Lechevalier Ed., Paris, XVI: 123-193.
- 35- Marchal, L., Legrand, J., Foucault A., 2003. Centrifugal partition chromatography: A survery of its history, and our recent advances in the field. Chemical Record 3 (3), 133-43.
- 36- Mémento de l'agronome. 1974. Les Publications du ministère de la coopération, Collection Techniques rurales en Afrique, p1591.
- 37- Merdas, S., 2007. Bilan des incendies de forêts dans quelques wilaya de l'est Algérien, cas de Béjaia,Jijel, Sétif et Bordj BouArréridj, Mémoire de magister, option Ecologie et environnement, Université Mentouri Constantine p54.
- 38- Nurgun, E., Semiha, O., 2009. GC/MS analysis and antimicrobial activity of alcaloid extract from *Genista vuralii*, Pharmaceutical Biology 47(1), 81-85.
- 39- Noccioli,C., Meini,L., Loi.M., Potensa,D.,Pistelli,L.,2011. A new alinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*, Phytochemistry Letters 4, 342-344.
- 40- Olivon, F., 2017.MZmine Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability, Analytical Chemistry 89, 7836-7840.
- 41- Ozenda, P., 1977. Flore du Sahara, Ed. CNRS. Paris, France, 250-259.
- 42- Pistelli, L., Giachi, I., Potenzs, D., Morselli, I., 2000. A New Isoflavone from *Genista corcica*. Journal of Natural Products 63, 504-506.



- 43- Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, Morelli, I., Rubiolo, P., Bicchi, C., 2001. Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. Biochemical Systematic Ecology 29, 137–141.
- 44- Polhill, R.M., 1981. Papilionoideae. In: Polhill R.M. & Raven P.H. (eds.), Advances in Legume Systematics: Part 1. Royal Botanic Gardens, Kew, and London. P191-208.
- 45- Quezel, P., Santa S., 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, 2., CNRS Paris, p1170.
- 46- Quezel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, p 611.
- 47- Rauter, A.P., Martins, A., Borges, C., Ferreira, J., Justino, J., Bronze, M.R., Coelho, A.V., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2005. Liquid chromatography-diode array detection electrospray ionization mass spectrometry nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera*. Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. Journal Chromatography, 1089, 59–64.
- 48- Rauter, A.P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L.M., Araujo, M., Borges, C., Justino, J., Silva, F., Goulart, M., Thomas-Oates, J., Rodrigues, J.A., Edwards, E., Noronha, J., Helder Mota-Filipe, R.P., 2009. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. Journal Ethnopharmacology 122, 384-393.
- 49- Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldinic, M. T., Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., Senatore, F., 2009. *Genista sessilifolia* and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. ChemicoBiological Interactions 18, 211-219.
- 50- Seltzer, P., 1946. Le climat de l'Algérie. Institut de météorologie et de physique du globe. Université Alger. p219.
- 51- Stewart, P.H., 1975. Un nouveau Climagramme pour l'Algérie et son application pour le barrage vert. Bull. Soc. Hist. Nat. AFN. Fsc. 65, 1 et 2. Alger, p 239-252.
- 52- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod D., 2002. Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH - Lausanne.
- 53- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M., Albach, T.D., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W.H., Hoot, S.B., Fay, M.F., Axtell, M., Swensen, S.M., Prince, L.M., Kress, W.J., Nixon, K.C., Farris, J.S., 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. Botanical Journal of the Linnean Society 133(4), 381-461.



- 54- Toubal., Boumaza, O., 1986. Phytoécologie, biogéographie et dynamique des principaux groupements végétaux du massif de l'Edough (Algérie Nord orientale). Thèse de 3ème cycle. Univ de Grenoble, 110 p + Carte.
- 55- Van Rensen, I., Veit, M., Wrey, V., Czygan, F.-C., 1996. Genistein-C-glucoside from *Genista cinerea*. Natural Product Letters, 6 (3), 203-207.
- 56- Vela, E., Benhouhou S., 2007. Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen en Afrique du nord, C.R.Biologies, 330.
- 57- Venditti A, Frezza C, Foddai S, Serafini M, Bianco A. 2019. A rare bis-rhamnopyranosyl-aromadendrin derivative and other flavonoids from the flowers of *Genista cilentina* Vals. An endemic species of Southern Italy. Arabian Journal of Chemistry 12, 3921-3926.

# **ANNEXES SECTION I**

# Annexes

## Activité antibacterienne

### Annexe 1

**Tableau 37:** Panel anaérobie des bactéries aérobie (gram positif et gram négatif) testé pour les extraits de *G. numidica*.

| Numéro d'espèces | GRAM POSITIVE                       | Référence   | MIC ofloxacin |
|------------------|-------------------------------------|-------------|---------------|
| 1                | <i>Bacillus cereus</i>              | CIP 6624    | 0,5           |
| 2                | <i>Corynebacterium minutissimum</i> | CIP 100652T | 0,12          |
| 3                | <i>Enterococcus avium</i>           | CIP 104 053 | 2             |
| 4                | <i>Enterococcus casseliflavus</i>   | CIP 103.018 | 64            |
| 4                | <i>Enterococcus durans</i>          | CIP 104 999 | 2             |
| 5                | <i>Enterococcus faecalis</i>        | CIP 103.214 | 2             |
| 6                | <i>Enterococcus faecium</i>         | CIP 103.014 | 8             |
| 7                | <i>Enterococcus gallinarum</i>      | CIP 105 985 | 4             |
| 8                | <i>Enterococcus hirae</i>           | CIP 5855    | 1             |
| 9                | <i>Listeria monocytogenes</i>       | CIP 103.575 | 2             |
| 10               | <i>Staphylococcus aureus</i>        | ATCC 25.923 | 0,5           |
| 11               | <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | CIP 53.124  | 0,5           |
| 12               | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>  | CIP 81.56   | 0,25          |
| 13               | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>   | ATCC 43.809 | 1             |
| 14               | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | CIP 76125   | 1             |
| 15               | <i>Streptococcus agalactiae</i>     | CIP 103.227 | 2             |

|    | GRAM NEGATIVE                                                 | Référence   | MIC ofloxacin |
|----|---------------------------------------------------------------|-------------|---------------|
| 16 | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>Denitrificans</i> | CIP 71.32   | 32            |
| 17 | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>Xylosoxidans</i>  | CIP 77.15   | 2             |
| 18 | <i>Acinetobacter baumannii</i>                                | CIP 70.34   | 2             |
| 19 | <i>Aeromonas caviae</i>                                       | CIP 76.16   | 0,06          |
| 20 | <i>Aeromonas hydrophila</i>                                   | CIP 76.14   | 0,06          |
| 21 | <i>Aeromonas hydrophila</i>                                   | CIP 74.30T  | 0,06          |
| 22 | <i>Alcaligenes faecalis</i>                                   | CIP 67.23   | 1             |
| 23 | <i>Brevundimonas diminuta</i>                                 | CIP103020   | 4             |
| 24 | <i>Burkholderia cepacia</i>                                   | CIP 80.24   | 4             |
| 25 | <i>Citrobacter freundii</i>                                   | CIP 57.32   | 0,06          |
| 26 | <i>Citrobacter koseri</i>                                     | CIP 82.87   | 0,06          |
| 27 | <i>Comamonas acidovorans</i>                                  | N331a       | n.d.          |
| 28 | <i>Comamonas testosteroni</i>                                 | N70a        | 4             |
| 29 | <i>Enterobacter aerogenes</i>                                 | CIP 6086T   | 0,12          |
| 30 | <i>Enterobacter cloacae</i>                                   | CIP 60.85   | 0,06          |
| 31 | <i>Escherichia coli</i>                                       | ATCC25922   | 0,06          |
| 32 | <i>Klebsiella oxytoca</i>                                     | E282a       | 0,06          |
| 33 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                  | CIP 52.145  | 0,12          |
| 34 | <i>Morganella morganii</i>                                    | E342a       | 0,06          |
| 35 | <i>Ochrobactrum anthropi</i>                                  | N16a        | 0,5           |
| 36 | <i>Providencia stuartii</i>                                   | CIP 107.808 | 16            |
| 37 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                 | CIP 103.467 | 2             |
| 38 | <i>Pseudomonas putida</i>                                     | CIP 55.191  | 1             |
| 39 | <i>Salmonella enterica</i>                                    | CIP 58.58   | 0,06          |
| 40 | <i>Serratia marcescens</i>                                    | CIP 60.93   | n.d.          |
| 41 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                           | CIP 54.90   | 2             |
| 42 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                                | CIP 75.2    | n.d.          |
| 43 | <i>Yersinia enterocolitica</i>                                | CIP 80.27   | 0,06          |

## Annexe 2

### Maldi-Tof

**Tableau 38** : Exemple d'un résultat détaillé d'identification des souches sur milieu Bennett

|                                 |                          |                               |       |                                |       |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| (-) (C)                         | AT-03 1                  | not reliable identification   | 1.839 | identification                 | 1.318 |
| <a href="#">A10</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4<br>AT-03 2  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">A11</a><br>(++) (A) | BENNETT 10-4<br>AT-03 3  | Staphylococcus hominis        | 2.15  | Staphylococcus hominis         | 2.116 |
| <a href="#">A12</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4<br>AT-03 4  | not (yet) present             | < 0   | not (yet) present              | < 0   |
| <a href="#">B1</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-4<br>AT-03 5  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B2</a><br>(+) (B)   | BENNETT 10-4<br>AT-03 6  | Staphylococcus<br>epidermidis | 1.908 | Staphylococcus<br>epidermidis  | 1.884 |
| <a href="#">B3</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-4<br>AT-03 7  | not reliable identification   | 1.316 | not reliable<br>identification | 1.287 |
| <a href="#">B4</a><br>(++) (A)  | BENNETT 10-4 JT<br>-03 1 | Staphylococcus hominis        | 2.175 | Staphylococcus hominis         | 2.003 |
| <a href="#">B5</a><br>(+) (B)   | BENNETT 10-2 JT 03<br>1  | Staphylococcus<br>epidermidis | 1.863 | Staphylococcus<br>epidermidis  | 1.828 |
| <a href="#">B6</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-2 JT-03<br>2  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B7</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-2 JT-02<br>1  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B8</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-2 JT-02<br>2  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B9</a><br>(+) (B)   | BENNETT 10-2 JT-02<br>3  | Staphylococcus<br>epidermidis | 1.742 | not reliable<br>identification | 1.668 |
| <a href="#">B10</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 JT-02<br>4  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B11</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 JT-02<br>5  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">B12</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 JT-02<br>6  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">C1</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-4 JT-02<br>1  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">C2</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-4 JT-02<br>2  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |
| <a href="#">C3</a><br>(-) (C)   | BENNETT 10-4<br>AT-01 1  | no peaks found                | < 0   | no peaks found                 | < 0   |

## Annexes I

| Analyte Name                  | Analyte ID              | Organism (best match)      | Score Value | Organism (second best match) | Score Value |
|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| <a href="#">A2</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 1 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A3</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 2 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A4</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 3 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A5</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 4 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A6</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 5 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A7</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-02 6 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">A8</a><br>(+) (B) | BENNETT 10-4<br>AT-02 7 | Staphylococcus epidermidis | 1.793       | Staphylococcus epidermidis   | 1.767       |
| <a href="#">A9</a>            | BENNETT 10-4            |                            |             | not reliable                 |             |
| <a href="#">C4</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-01 2 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |
| <a href="#">C5</a><br>(+) (B) | BENNETT 10-4<br>AT-01 3 | Staphylococcus warneri     | 1.931       | Staphylococcus warneri       | 1.815       |
| <a href="#">C6</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4<br>AT-01 4 | no peaks found             | < 0         | no peaks found               | < 0         |

| Analyte Name                    | Analyte ID           | Organism (best match)  | Score Value | Organism (second best match) | Score Value |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| <a href="#">A12</a><br>(++) (A) | BENNETT 10-4 AT-02 5 | Staphylococcus hominis | 2.133       | Staphylococcus hominis       | 2.04        |



## Annexes I

| Analyte Name                   | Analyte ID               | Organism (best match)                      | Score Value           | Organism (second best match)                 | Score Value           |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|-----------------------|
| <a href="#">C1</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 AT-01<br>03 | not reliable identification                | <a href="#">1.215</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.119</a> |
| <a href="#">C2</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 JT-01<br>03 | not reliable identification                | <a href="#">1.373</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.365</a> |
| <a href="#">C3</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 JT-02<br>01 | not reliable identification                | <a href="#">1.24</a>  | not reliable identification                  | <a href="#">1.168</a> |
| <a href="#">C4</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 JT-02<br>03 | not reliable identification                | <a href="#">1.41</a>  | not reliable identification                  | <a href="#">1.254</a> |
| <a href="#">C5</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 JT-02<br>05 | not reliable identification                | <a href="#">1.381</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.362</a> |
| <a href="#">C6</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 JT-01<br>01 | not reliable identification                | <a href="#">1.35</a>  | not reliable identification                  | <a href="#">1.342</a> |
| <a href="#">C7</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 AT-02<br>01 | no peaks found                             | <a href="#">≤ 0</a>   | no peaks found                               | <a href="#">≤ 0</a>   |
| <a href="#">C8</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-2 AT-02<br>02 | not reliable identification                | <a href="#">1.458</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.229</a> |
| <a href="#">C9</a><br>(++) (A) | BENNETT 10-2 AT-02<br>03 | Candida glabrata                           | <a href="#">2.133</a> | Candida glabrata                             | <a href="#">2.073</a> |
| <a href="#">C10</a><br>(+) (B) | BENNETT 10-2 JT-03<br>01 | <a href="#">Amycolatopsis pretoriensis</a> | <a href="#">1.87</a>  | <a href="#">Amycolatopsis lexingtonensis</a> | <a href="#">1.788</a> |
| <a href="#">C11</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4 AT-03<br>01 | not reliable identification                | <a href="#">1.343</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.277</a> |
| <a href="#">C12</a><br>(-) (C) | BENNETT 10-4 AT-03<br>02 | not reliable identification                | <a href="#">1.454</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.429</a> |
| <a href="#">D1</a><br>(-) (C)  | BENNETT 10-4 AT-03<br>03 | not reliable identification                | <a href="#">1.443</a> | not reliable identification                  | <a href="#">1.331</a> |

**Tableau 39** : Exemple d'un résultat détaillé d'identification des souches sur milieu Bennett et Sabouraud.

| Analyte Name                   | Analyte ID            | Organism (best match)                | Score Value           | Organism (second best match)          | Score Value           |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| <a href="#">B1</a><br>(-) (C)  | AT-01 10-2 03         | not reliable identification          | <a href="#">1.430</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.486</a> |
| <a href="#">B2</a><br>(-) (C)  | JT-01 10-4 03         | not reliable identification          | <a href="#">1.447</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.414</a> |
| <a href="#">B3</a><br>(-) (C)  | BENNETT JT-02 10-4 03 | not reliable identification          | <a href="#">1.412</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.327</a> |
| <a href="#">B4</a><br>(-) (C)  | BENNETT JT-02 10-4 01 | not reliable identification          | <a href="#">1.326</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.325</a> |
| <a href="#">B5</a><br>(-) (C)  | BENNETT JT-02 10-4 05 | not reliable identification          | <a href="#">1.471</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.464</a> |
| <a href="#">B6</a><br>(-) (C)  | SAB AN-02 10-2 1      | no peaks found                       | <a href="#">≤ 0</a>   | no peaks found                        | <a href="#">≤ 0</a>   |
| <a href="#">B7</a><br>(-) (C)  | SAB AN-02 10-2 2      | no peaks found                       | <a href="#">≤ 0</a>   | no peaks found                        | <a href="#">≤ 0</a>   |
| <a href="#">B8</a><br>(-) (C)  | SAB AN-02 10-2 3      | not reliable identification          | <a href="#">1.300</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.32</a>  |
| <a href="#">B9</a><br>(-) (C)  | SAB AN-02 10-2 4      | not reliable identification          | <a href="#">1.451</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.3</a>   |
| <a href="#">B10</a><br>(+) (B) | SAB AN-01 10-2 1      | <a href="#">Bacillus megaterium</a>  | <a href="#">1.794</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.43</a>  |
| <a href="#">C1</a><br>(-) (C)  | SAB AN-01 10-2 2      | not reliable identification          | <a href="#">1.423</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.276</a> |
| <a href="#">C2</a><br>(-) (C)  | SAB AN-01 10-2 3      | no peaks found                       | <a href="#">≤ 0</a>   | no peaks found                        | <a href="#">≤ 0</a>   |
| <a href="#">C3</a><br>(+) (B)  | SAB AN-03 10-2 1      | <a href="#">Enterobacter cloacae</a> | <a href="#">1.756</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.428</a> |
| <a href="#">C4</a><br>(+) (B)  | SAB AN-03 10-2 2      | <a href="#">Enterobacter cloacae</a> | <a href="#">1.95</a>  | <a href="#">Enterobacter ludwigii</a> | <a href="#">1.701</a> |
| <a href="#">C5</a><br>(++) (A) | SAB AN-03 10-2 3      | <a href="#">Enterobacter cloacae</a> | <a href="#">2.043</a> | <a href="#">Enterobacter ludwigii</a> | <a href="#">2</a>     |
| <a href="#">C6</a><br>(-) (C)  | SAB JN-01 10-2 1      | not reliable identification          | <a href="#">1.305</a> | not reliable identification           | <a href="#">1.357</a> |
| <a href="#">C7</a><br>(-) (C)  | SAB JN-01 10-2 2      | no peaks found                       | <a href="#">≤ 0</a>   | no peaks found                        | <a href="#">≤ 0</a>   |



Tableau 40 : Exemple d'un résultat détaillé d'identification des souches sur gélose nutritive.

| Analyte Name                   | Analyte ID    | Organism (best match)               | Score Value           | Organism (second best match)      | Score Value           |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <a href="#">E1</a><br>(-) (C)  | AN-01 10-2 01 | not reliable identification         | <a href="#">1.696</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.696</a> |
| <a href="#">E2</a><br>(+) (B)  | AN-01 10-2 02 | <a href="#">Bacillus cereus</a>     | <a href="#">1.708</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.676</a> |
| <a href="#">E3</a><br>(-) (C)  | AN-01 10-2 03 | not reliable identification         | <a href="#">1.697</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.696</a> |
| <a href="#">E4</a><br>(-) (C)  | AN-01 10-2 04 | no peaks found                      | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                    | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">E6</a><br>(-) (C)  | AN-02 10-2 01 | not reliable identification         | <a href="#">1.687</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.687</a> |
| <a href="#">E7</a><br>(+) (B)  | AN-02 10-2 02 | <a href="#">Bacillus mojavensis</a> | <a href="#">1.858</a> | <a href="#">Bacillus subtilis</a> | <a href="#">1.852</a> |
| <a href="#">E8</a><br>(+) (B)  | AN-02 10-2 03 | <a href="#">Bacillus megaterium</a> | <a href="#">1.953</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.874</a> |
| <a href="#">E9</a><br>(-) (C)  | AN-02 10-2 04 | not reliable identification         | <a href="#">1.681</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.681</a> |
| <a href="#">E10</a><br>(-) (C) | AN-02 10-2 05 | not reliable identification         | <a href="#">1.696</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.688</a> |
| <a href="#">E12</a><br>(-) (C) | JN-02 10-2 01 | not reliable identification         | <a href="#">1.689</a> | not reliable identification       | <a href="#">1.688</a> |

| Analyte Name                   | Analyte ID      | Organism (best match)                  | Score Value           | Organism (second best match)       | Score Value           |
|--------------------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <a href="#">A1</a><br>(-) (C)  | GN AN-01 10-4   | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A2</a><br>(+) (B)  | GN JN-03 10-4   | <a href="#">Micrococcus luteus</a>     | <a href="#">1.866</a> | <a href="#">Micrococcus luteus</a> | <a href="#">1.842</a> |
| <a href="#">A3</a><br>(-) (C)  | GN JN-01 10-2 1 | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A4</a><br>(-) (C)  | GN JN-01 10-2 2 | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A5</a><br>(+) (B)  | GN JN-01 10-4   | <a href="#">Staphylococcus hominis</a> | <a href="#">1.714</a> | not reliable identification        | <a href="#">1.618</a> |
| <a href="#">A6</a><br>(-) (C)  | GN JN-02 10-4   | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A7</a><br>(-) (C)  | GN AN-03 10-2   | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A8</a><br>(-) (C)  | GN AN-02 10-4 1 | not reliable identification            | <a href="#">1.611</a> | not reliable identification        | <a href="#">1.611</a> |
| <a href="#">A9</a><br>(-) (C)  | GN AN-02 10-4 2 | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |
| <a href="#">A10</a><br>(-) (C) | GN AN-02 10-4 3 | not reliable identification            | <a href="#">1.689</a> | not reliable identification        | <a href="#">1.684</a> |
| <a href="#">A11</a><br>(-) (C) | GN JN-03 10-2   | no peaks found                         | <a href="#">1.0</a>   | no peaks found                     | <a href="#">1.0</a>   |

# **DEUXIEME SECTION**

**ETUDE DE *PISTACIA LENTISCUS* L.**

## SOMMAIRE SECTION 02

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Introduction ..... | 156 |
|--------------------|-----|

### Partie I : Recueil bibliographique

|                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Chapitre I : Etude caractéristique de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                      | 159 |
| 1. Généralités .....                                                                                         | 159 |
| 1.1 Classification taxonomique et description botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....                  | 160 |
| 1.1.1. Classification taxonomique.....                                                                       | 160 |
| 1.1.2. Description botanique .....                                                                           | 160 |
| 2. Répartition géographique et exigences écologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                    | 162 |
| 2.1 Répartition géographique .....                                                                           | 162 |
| 2.2 Exigence écologique.....                                                                                 | 162 |
| 3. Utilisations traditionnelles et effets pharmacologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....              | 164 |
| 3.1 Utilisationsthérapeutiques traditionnelles.....                                                          | 164 |
| 3.2 Effets pharmacologiques.....                                                                             | 164 |
| 3.2.1 Feuilles et fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                                | 164 |
| 3.2.2 Le mastic .....                                                                                        | 165 |
| Chapitre II : Etude de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                 | 166 |
| 1. Généralités sur l'huile de fruit de lentisque.....                                                        | 166 |
| 2. Composition chimique .....                                                                                | 166 |
| 2.1 Composition saponifiable de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....                         | 166 |
| 2.1.1 Acides Gras .....                                                                                      | 166 |
| 2.1.2 Triglycérides .....                                                                                    | 167 |
| 2.2 Composition en insaponifiable de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                   | 167 |
| 2.2.1 Les tocophérols .....                                                                                  | 167 |
| 2.2.2 Les phytostérols.....                                                                                  | 167 |
| 2.2.3 Les composés phénoliques .....                                                                         | 168 |
| 3. Aspect pharmacologique et utilisation traditionnelle de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> 168 |     |
| 3.1 Aspects pharmacologiques.....                                                                            | 168 |
| 3.2 Utilisation traditionnelle .....                                                                         | 169 |

### Partie II : Matériels et méthodes

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Chapitre I : travail prospectif .....                                                   | 171 |
| 1 Identification des producteurs d'huile de fruit de lentisque dans l'Est algérien..... | 171 |
| 1.1 La production artisanale.....                                                       | 171 |
| 1.2 Production semi artisanale en coopérative.....                                      | 171 |
| 1.2.1 La coopérative Ladjoudane (Akbou, Béjaia).....                                    | 172 |

|       |                                                                                                                               |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.2.2 | La coopérative Bouannani.....                                                                                                 | 173 |
| 2.    | Méthodes de production en coopérative.....                                                                                    | 173 |
| 2.1   | Méthode de la coopérative Bouannani.....                                                                                      | 173 |
| 2.2   | Méthode de la coopérative Ladjoudane.....                                                                                     | 175 |
| 2.3   | Méthode de production artisanale .....                                                                                        | 176 |
|       | Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque .....                                   | 180 |
| 1.    | Étude de la composition de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                              | 181 |
| 1.1   | Étude de la fraction saponifiable.....                                                                                        | 181 |
| 1.1.1 | Déréplication par analyse GC-MS après dérivatisation en esters méthyliques .....                                              | 182 |
| 1.1.3 | Déréplication par HPLC/UV-MS des huiles de lentisque.....                                                                     | 184 |
| 1.2   | Étude de la fraction insaponifiable .....                                                                                     | 185 |
| 1.2.1 | Évaluation de la teneur en insaponifiable .....                                                                               | 185 |
| 1.2.2 | Évaluation de la teneur en caroténoïdes de l'insaponifiable par spectrophotométrie UV .....                                   | 185 |
| 1.2.3 | Profils HPLC-UV/DAD de l'insaponifiable .....                                                                                 | 186 |
| 2.1   | Analyse par Rancimat 743.....                                                                                                 | 186 |
| 2.1.1 | Caractéristiques techniques de l'équipement .....                                                                             | 187 |
| 3.    | Dosage des métaux lourds des échantillons d'huiles de Lentisque et du sol par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ..... | 188 |
| 3.1   | Minéralisation des échantillons .....                                                                                         | 188 |
| 3.1.1 | La minéralisation des échantillons de sols.....                                                                               | 188 |
| 3.1.2 | La minéralisation des huiles .....                                                                                            | 189 |
| 3.2   | Analyse par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).....                                                                    | 189 |
| 3.2.1 | Le principe .....                                                                                                             | 189 |
| 3.2.2 | Caractéristiques du spectromètre à la flamme Agilent 240 FS.....                                                              | 190 |
|       | Paramètres .....                                                                                                              | 191 |
| 4.    | Analyse du sol de <i>Pistacia lentiscus</i> par spectrométrie de fluorescence de rayon X(FRX).....                            | 191 |
| 4.1   | Caractéristiques de la spectrométrie de fluorescence de rayon X .....                                                         | 191 |
| 4.1.1 | Méthode de préparation de l'échantillon .....                                                                                 | 191 |
|       | Chapitre III : Analyses biologiques des huiles de lentisque.....                                                              | 192 |
| 1.    | Dosage des composés phénoliques et activité anti-radicalaire .....                                                            | 193 |
| 1.1   | Dosage des polyphénols totaux .....                                                                                           | 193 |
| 1.2   | Dosage des flavonoïdes totaux .....                                                                                           | 193 |
| 2.    | Activité anti-radicalaire de l'huile et de l'insaponifiable.....                                                              | 193 |
| 2.1   | Activité anti-radicalaire DPPH .....                                                                                          | 194 |
| 2.2   | Activité antiradicalaire ABTS .....                                                                                           | 194 |

|                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. Essai de viabilité sur fibroblastes dermiques humains normaux-test à l'Alamar Blue (rézazurine) ..... | 195 |
| 3.1 Préparation des solutions mères.....                                                                 | 195 |
| 3.1.1 Préparation de la solution NaF (contrôle positif) .....                                            | 195 |
| 3.2 Activité anti-inflammatoire .....                                                                    | 196 |
| 3.2.1 Isolement des monocytes.....                                                                       | 196 |
| 3.2.2 Stimulation des monocytes par LPS .....                                                            | 196 |
| 3.2.3 Protocole Elisa .....                                                                              | 197 |
| 4. Activité antibactérienne.....                                                                         | 197 |
| 4.1 Souches bactériennes et milieux de culture .....                                                     | 197 |
| 5. Toxicité chez les souris.....                                                                         | 198 |
| 5.1 Toxicité aiguë de l'huile de lentisque .....                                                         | 199 |
| 5.1.1 Observation.....                                                                                   | 199 |
| 5.1.2 Poids corporel .....                                                                               | 200 |
| 5.1.3 Dissection et le prélèvement du sang .....                                                         | 200 |
| 5.1.4 Analyses biochimiques .....                                                                        | 200 |
| 5.1.5 Prélèvement des organes.....                                                                       | 200 |
| 5.2 Toxicités subaiguë de l'huile de lentisque.....                                                      | 201 |
| 5.3 Analyse statistique des résultats.....                                                               | 201 |

### Partie III : Résultats et discussion

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Chapitre I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque .....                                                  | 203 |
| 1. Étude de la composition de l'huile de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                                   | 203 |
| 1.1 Étude de la fraction saponifiable.....                                                                                            | 203 |
| 1.1.1 Analyse par GC-FID après formation des esters méthyliques .....                                                                 | 204 |
| 1.1.2 Déréplication par analyse GC-MS après formation des esters méthyliques.....                                                     | 208 |
| 1.1.3 Identification des composés volatils .....                                                                                      | 212 |
| 1.2 Etude de la fraction apolaire des fruits de lentisque PLFE1 (PDM-1) et isolement l'acide 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylique. .... | 215 |
| 1.3 Déréplication par HPLC-UV/DAD-MS des huiles de fruit de lentisque et comparaison à la fraction PLFE1 .....                        | 217 |
| 2. Etude de la fraction insaponifiable .....                                                                                          | 221 |
| 2.1 Déréplication par analyse GC-MS des insaponifiables silylés.....                                                                  | 222 |
| 2.2 Évaluation de la teneur en caroténoïdes de l'insaponifiable par spectrophotométrie UV. ....                                       | 224 |
| 2.3 Profils HPLC-UV/DAD de la fraction insaponifiable de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....                                            | 225 |
| 2.4 Évaluation du degré de rancissement des échantillons d'huiles de lentisque .....                                                  | 227 |
| 2.5 Dosage des métaux lourds des huiles de lentisque par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) .....                              | 228 |

|                                                                                                                                      |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.6 Analyse de la composition chimique du sol de <i>Pistacia lentiscus</i> par FRX (spectrométrie de fluorescence de rayons X) ..... | 231        |
| <b>Chapitre II : ACTIVITES BIOLOGIQUE</b> .....                                                                                      | <b>235</b> |
| 1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des huiles de fruits de lentisques et des insaponifiables .....                         | 235        |
| 1.1 Activité anti-radicalaire sur le DPPH.....                                                                                       | 235        |
| 1.2 Activité antiradicalaire ABTS .....                                                                                              | 237        |
| 2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux .....                                                                     | 238        |
| 2.1 Teneurs en polyphénols totaux.....                                                                                               | 238        |
| 2.2 Teneurs en flavonoïdes totaux.....                                                                                               | 240        |
| 3. Évaluation cytotoxique des fibroblastes cutanés humains normaux (NHDF) .....                                                      | 241        |
| 4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....                                                                                     | 242        |
| 5. Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë .....                                                                                 | 245        |
| 5.1 La toxicité aiguë.....                                                                                                           | 245        |
| 5.1.1 Poids corporel .....                                                                                                           | 246        |
| 5.1.2 Poids relatif des organes .....                                                                                                | 248        |
| 5.1.3 Paramètres biochimiques.....                                                                                                   | 249        |
| 5.2 La toxicité subaiguë (21 jours) .....                                                                                            | 250        |
| 5.2.1 Poids corporel .....                                                                                                           | 250        |
| 5.2.2 Poids relatif des organes .....                                                                                                | 252        |
| 5.2.3 Paramètres biochimiques.....                                                                                                   | 253        |
| <b>Conclusion</b> .....                                                                                                              | <b>255</b> |
| <b>Références bibliographiques</b> .....                                                                                             | <b>256</b> |
| <b>Annexes section II</b> .....                                                                                                      | <b>266</b> |

## Liste des Tableaux de la section II

|                   |                                                                                                                                                                                                                                 |            |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tableau 1</b>  | Coordonnées GPS de la coopérative Ladjoudane (Akbou, Bejaia).                                                                                                                                                                   | <b>173</b> |
| <b>Tableau 2</b>  | Coordonnées GPS de la coopérative Bouannani (Jijel).                                                                                                                                                                            | <b>173</b> |
| <b>Tableau 3</b>  | Identification des huiles de fruit de lentisque.                                                                                                                                                                                | <b>181</b> |
| <b>Tableau 4</b>  | Programmation du four de la GC-FID.                                                                                                                                                                                             | <b>183</b> |
| <b>Tableau 5</b>  | Composition du gradient d'élution.                                                                                                                                                                                              | <b>184</b> |
| <b>Tableau 6</b>  | Composition du gradient d'élution HPLC-UV/DAD.                                                                                                                                                                                  | <b>186</b> |
| <b>Tableau 7</b>  | Conditions opératoires du dosage des métaux lourds.                                                                                                                                                                             | <b>191</b> |
| <b>Tableau 8</b>  | Programmation du four.                                                                                                                                                                                                          | <b>204</b> |
| <b>Tableau 9</b>  | Identification des échantillons des huiles de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> .                                                                                                                                              | <b>205</b> |
| <b>Tableau 10</b> | Temps de rétention et Aire des principaux pics identifiés en GC-FID.                                                                                                                                                            | <b>208</b> |
| <b>Tableau 11</b> | Composés identifiés par GC-MS des huiles de lentisque.                                                                                                                                                                          | <b>212</b> |
| <b>Tableau 12</b> | Identification des composés volatils après formation des dérivés silylés.                                                                                                                                                       | <b>214</b> |
| <b>Tableau 13</b> | Identification des composés de la fraction apolaire PLFE1(PDM1).                                                                                                                                                                | <b>216</b> |
| <b>Tableau 14</b> | Identification des composés de la fraction apolaire PDM6.                                                                                                                                                                       | <b>216</b> |
| <b>Tableau 15</b> | Identification des acides alkylsalicyliques par HPLC-UV-DAD-MS des huiles artisanales et commerciales de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> avec comparaison à PLFE1. (% de l'aire des pics identifiés entre 45 et 60 minutes). | <b>217</b> |
| <b>Tableau 16</b> | Identification des acides alkylsalicyliques et des phytostérols des fractions insaponifiables.                                                                                                                                  | <b>224</b> |
| <b>Tableau 17</b> | Absorbances des insaponifiables par spectrophotomètre UV.                                                                                                                                                                       | <b>225</b> |
| <b>Tableau 18</b> | % des Chlorophylles et des caroténoïdes dans les trois insaponifiables.                                                                                                                                                         | <b>225</b> |
| <b>Tableau 19</b> | Résultats de l'analyse rancimat des huiles de fruit de lentisques.                                                                                                                                                              | <b>228</b> |
| <b>Tableau 20</b> | Les normes selon le règlement Conseil Européen n° 1881/2006.                                                                                                                                                                    | <b>229</b> |
| <b>Tableau 21</b> | Résultats du dosage des métaux lourds des huiles de lentisque par (SAA).                                                                                                                                                        | <b>229</b> |
| <b>Tableau 22</b> | Résultats du dosage des métaux lourds des sols par (SAA) (zone de récolte des fruits de lentisque destiné à l'extraction des huiles artisanales).                                                                               | <b>230</b> |
| <b>Tableau 23</b> | Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des huiles de lentisque et des insaponifiables à 200 µg/mL.                                                                                                                            | <b>236</b> |
| <b>Tableau 24</b> | % Efficacité ABTS des huiles de lentisques et des insaponifiables à 200 µg/mL.                                                                                                                                                  | <b>237</b> |
| <b>Tableau 25</b> | Teneurs en polyphénols totaux des huiles de lentisques et des insaponifiables.                                                                                                                                                  | <b>240</b> |
| <b>Tableau 26</b> | Résultats de l'activité antibactérienne des huiles de lentisque et des insaponifiables (200µg/ml) testé sur les bactéries anaérobies.                                                                                           | <b>244</b> |
| <b>Tableau 27</b> | Poids corporel des souris femelles traitées à l'huile de lentisque comparé avec le lot témoin (toxicité aiguë).                                                                                                                 | <b>246</b> |
| <b>Tableau 28</b> | Poids corporels chez les souris mâles pendant toxicité aiguë.                                                                                                                                                                   | <b>247</b> |

|                   |                                                                                                                        |            |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tableau 29</b> | Poids relatif des organes chez les souris femelles après un traitement de 15 jours par l'huile de lentisque.           | <b>248</b> |
| <b>Tableau 30</b> | Poids relatif des organes chez les souris mâles après un traitement de 15 jours par l'huile de lentisque.              | <b>248</b> |
| <b>Tableau 31</b> | Paramètres biochimiques chez souris mâles traités par l'huile de lentisque au cours de la toxicité aiguë (n=4/5).      | <b>249</b> |
| <b>Tableau 32</b> | Paramètres biochimiques chez les souris femelles traités par l'huile de lentisque au cours de la toxicité aiguë (n=4). | <b>249</b> |
| <b>Tableau 33</b> | Poids corporels chez les souris femelles pendant toxicité subaiguë.                                                    | <b>250</b> |
| <b>Tableau 34</b> | Poids corporels chez les souris mâles pendant toxicité subaiguë.                                                       | <b>251</b> |
| <b>Tableau 35</b> | Poids relatifs des organes chez les souris mâles après un traitement de 21 jours par l'huile de lentisque.             | <b>252</b> |
| <b>Tableau 36</b> | Poids relatif des organes chez les souris femelles après un traitement de 21 jours par l'huile de lentisque.           | <b>252</b> |
| <b>Tableau 37</b> | Paramètres biochimiques chez souris mâles traités par l'huile de lentisque pendant la toxicité subaiguë (n=4/5).       | <b>253</b> |
| <b>Tableau 38</b> | Paramètres biochimiques chez souris femelles traités par l'huile de lentisque pendant la toxicité subaiguë (n=4/5).    | <b>253</b> |



## Liste des figures de la section II

|                  |                                                                                                                                                                          |            |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 1</b>  | Feuille (A), Fleur (B), Résine (C) de <i>Pistacia lentiscus</i> L.                                                                                                       | <b>161</b> |
| <b>Figure 2</b>  | Fruits (D) de <i>Pistacia lentiscus</i> L. (Bejaia-Akbou), (photo prise en novembre 2019).                                                                               | <b>162</b> |
| <b>Figure 3</b>  | Caractéristiques climatiques du <i>Pistacia lentiscus</i> (Julve, 2020).                                                                                                 | <b>163</b> |
| <b>Figure 4</b>  | Caractéristiques du sol de <i>Pistacia lentiscus</i> (Julve, 2020).                                                                                                      | <b>164</b> |
| <b>Figure 5</b>  | Localisation des échantillons de l'huile du fruit de lentisque.                                                                                                          | <b>172</b> |
| <b>Figure 6</b>  | Moulin traditionnel de l'huile de lentisque (Bensalem., 2015).                                                                                                           | <b>174</b> |
| <b>Figure 7</b>  | Collecte de fruits de lentisque par le propriétaire de la coopérative.                                                                                                   | <b>175</b> |
| <b>Figure 8</b>  | Broyage du fruit de lentisque par le broyeur meule de pierre.                                                                                                            | <b>175</b> |
| <b>Figure 9</b>  | Le pressage de l'huile de lentisque par la presse hydraulique.                                                                                                           | <b>176</b> |
| <b>Figure 10</b> | Étapes d'extraction de l'huile de lentisque selon la méthode artisanale (Bouteldj et Kadjoudj, 2013).                                                                    | <b>179</b> |
| <b>Figure 11</b> | Transformation des triglycérides en esters méthyliques d'acides gras (EMAG ou FAME).                                                                                     | <b>182</b> |
| <b>Figure 12</b> | Photo de l'équipement Rancimat 743 (C.R.A.P.C).                                                                                                                          | <b>187</b> |
| <b>Figure 13</b> | Spectrométrie d'absorption atomique SAA (C.R.A.P.C).                                                                                                                     | <b>190</b> |
| <b>Figure 14</b> | Principe de la méthode d'incorporation.                                                                                                                                  | <b>198</b> |
| <b>Figure 15</b> | Souris pendant la période d'adaptation.                                                                                                                                  | <b>199</b> |
| <b>Figure 16</b> | Prélèvement sanguin des souris pendant le sacrifice.                                                                                                                     | <b>200</b> |
| <b>Figure 17</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Bouanani (1).                                                                                               | <b>205</b> |
| <b>Figure 18</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque d'Akbou 2015(2) et akbou 2017(3) respectivement.                                                            | <b>205</b> |
| <b>Figure 19</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Blida(8) et de Settara (4).                                                                                 | <b>206</b> |
| <b>Figure 20</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque El Kala (7) et Sidi Abdelaziz (6).                                                                          | <b>206</b> |
| <b>Figure 21</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Belkis (11) et Elwafia (9).                                                                                 | <b>206</b> |
| <b>Figure 22</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Elmilia(15) et sultane(14).                                                                                 | <b>207</b> |
| <b>Figure 23</b> | Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Z. Atebaa (12) et Zazia (10)                                                                                | <b>207</b> |
| <b>Figure 24</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en ester méthyliques de l'huile de fruit de lentisque Bouanani (1) (10min-20min).                    | <b>208</b> |
| <b>Figure 25</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de fruit de lentisque Akbou 2015(2) et Akbou 2017(3) (10min-20min). | <b>209</b> |

|                  |                                                                                                                                                                         |            |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 26</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisque de Blida et Sidi Abdelaziz (6) (10min-20min).         | <b>209</b> |
| <b>Figure 27</b> | Profil chromatographique en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques de l'huile de lentisque d'Elkala (7) (10min-20min).                             | <b>209</b> |
| <b>Figure 28</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisque Elwafia (9) et Zazia (10) (10min-20min).              | <b>210</b> |
| <b>Figure 29</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de fruit de lentisque d'ElMiliaet Belkis(11) (10min-20min).        | <b>210</b> |
| <b>Figure 30</b> | Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisqueEl Fourssane (13) et Sultane (14) (10min-20min).       | <b>210</b> |
| <b>Figure 31</b> | Structure générale des alkylphénols et acides alkyl-salicyliques                                                                                                        | <b>213</b> |
| <b>Figure 32</b> | Profil chromatographique global en GC-MS et entre (0-62 min) de <b>PLFE1</b> (PDM-1).                                                                                   | <b>213</b> |
| <b>Figure 33</b> | Profil chromatographique globale en GC-MS du <b>PDM6</b> .                                                                                                              | <b>215</b> |
| <b>Figure 34</b> | Structure de l'acide $\Delta 8$ ginkgolique (17:1)                                                                                                                      | <b>216</b> |
| <b>Figure 35</b> | Profils HPLC-UV-DAD-MS : détails des spectres UV et spectres de masse pour les pics correspondants aux acides alkyl-salicyliques de la fraction <b>PLFE1</b> .          | <b>218</b> |
| <b>Figure 36</b> | Profils chromatographiques HPLC-UV/DAD-MS à 320nm des huiles de fruit de lentisque (1-14) (44min-65min).                                                                | <b>219</b> |
| <b>Figure 37</b> | Profils HPLC-UV-DAD-MS : détails des spectres UV et spectres de masse pour les pics correspondants aux acides alkyl-salicyliques des échantillons d'huile <b>1-14</b> . | <b>220</b> |
| <b>Figure 38</b> | Profil chromatographique en GC-MS de l'insaponifiable silyléElkala ( <b>7 BIS</b> ).                                                                                    | <b>222</b> |
| <b>Figure 39</b> | Profil chromatographique en GC-MS de l'insaponifiablesilylé Blida ( <b>8 BIS</b> ).                                                                                     | <b>222</b> |
| <b>Figure 40</b> | Profil chromatographique GC-MS de l'insaponifiablesilyléAkbou 2017 ( <b>3 BIS</b> ).                                                                                    | <b>223</b> |
| <b>Figure 41</b> | Agrandissement de la zone 11,5 à 14,0 minutes et identification des 5 acides alkylsalicyliques des trois fractions insaponifiables.                                     | <b>223</b> |
| <b>Figure 42</b> | Profil chromatographique en HPLC UV/DAD de l'extrait insaponifiable Blida ( <b>8 BIS</b> ) (450 nm).                                                                    | <b>226</b> |
| <b>Figure 43</b> | Profil chromatographique en HPLC UV/DAD de l'extrait insaponifiable Akbou ( <b>3 BIS</b> ).                                                                             | <b>227</b> |
| <b>Figure 44</b> | Profil chromatographique en HPLC UV/DAD de l'extrait insaponifiable ElKala ( <b>7 BIS</b> ).                                                                            | <b>227</b> |
| <b>Figure 45</b> | Profil UPLC-HRMS et extraction du m/z 551,4252 d'extrait insaponifiable ElKala.                                                                                         | <b>227</b> |

|                  |                                                                                                                                                                                                                             |            |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 46</b> | Les éléments chimiques du sol de <i>Pistacia lentiscus</i> provenant d'Akbou par FRX.                                                                                                                                       | <b>231</b> |
| <b>Figure 47</b> | Les éléments chimiques du sol de <i>Pistacia lentiscus</i> provenant d'Elkala par FRX.                                                                                                                                      | <b>232</b> |
| <b>Figure 48</b> | Droite d'étalonnage de l'acide gallique utilisée pour la détermination des composés phénoliques.                                                                                                                            | <b>238</b> |
| <b>Figure 49</b> | Viabilité cellulaire (%) des huiles de fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> sur fibroblastes (NHDF).                                                                                                                          | <b>241</b> |
| <b>Figure 50</b> | Viabilité cellulaire des insaponifiables sur fibroblastes (NHDF).                                                                                                                                                           | <b>242</b> |
| <b>Figure 51</b> | Exemple du résultat négatif du screening de l'activité antibactérienne (panel aérobie) d'huile de lentisque.                                                                                                                | <b>243</b> |
| <b>Figure 52</b> | Résultat positif du screening de l'activité antibactérienne (panel anaérobie) d'huile de lentisque Elkala et insaponifiable Blida. (Photo A = Insaponifiable Blida ( <b>8 BIS</b> ), photo B = L'huile Elkala( <b>7</b> )). | <b>243</b> |
| <b>Figure 53</b> | Evolution du poids corporel chez les souris femelles traitées avec les doses de 2000 mg /Kg(D1) et 5000 mg/Kg(D2) de l'huile de lentisque d'Akbou 2017( <b>3</b> ).                                                         | <b>246</b> |
| <b>Figure 54</b> | Evolution du poids corporel chez les souris mâles traitées avec les doses de 2000 mg/Kg (D1) et 5000mg/Kg (D2) de l'huile de lentisque d'Akbou 2017.                                                                        | <b>247</b> |
| <b>Figure 55</b> | Evolution du poids corporel chez les souris femelles traitées avec les doses de 2000mg /Kg (D1) et 5000mg/Kg (D2) de l'huile de lentisque d'Akbou 2017( <b>3</b> ).                                                         | <b>251</b> |
| <b>Figure 56</b> | Evolution du poids corporel chez les souris mâles traitées avec les doses de 2000 mg /Kg (D1) et 5000 mg/Kg (D2) de l'huile de lentisque d'Akbou 2017.                                                                      | <b>251</b> |

# Introduction

## Introduction

Comme décrit précédemment, *Pistacia lentiscus* L possède un usage médicinal commun à tout le bassin méditerranéen. Le programme européen EXANDAS (EXploitation of AromaticplaNts' by-proDucts for the development of novelcosmeceuticAls and food Supplements) porte sur la valorisation d'espèces aromatiques méditerranéenne en vue d'applications cosmétiques et alimentaires. L'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* L, couramment appelée huile de lentisque, a attiré notre attention en tant que matière première potentielle en vue d'applications cosmétiques. C'est pourquoi nous avons envisagé dans le cadre de ce projet de chercher à caractériser chimiquement cette huile végétale, mais aussi d'évaluer différentes activités biologiques, ainsi que des études toxicologiques afin de garantir l'innocuité de cette huile. Pour cela, une coopération entre quatre laboratoires a été mise en place afin de réaliser les travaux de recherche envisagés :

- Laboratoire de Pharmagnosie-UMR 8638 CiTCOM (Paris, France), pour les études phytochimiques et certaines évaluations biologiques.
- Laboratoire de Vivacell (Denzlingen, Allemagne), pour les évaluations toxicologiques *in vitro*.
- Laboratoires du centre de recherche CRAPC (Tipaza, Algérie), pour les études phytochimiques mais également les analyses des sols,
- Laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques de l'université Ferhat Abbas (Sétif 1, Algérie), pour les évaluations toxicologiques *in vivo*.

Ce travail a été réalisé en plusieurs temps :

1-Travail prospectif de recueil des échantillons d'huiles issues de filières bien contrôlées : deux coopératives Bouanani à Jijel et Ladjoudane à Béjaia, ainsi que d'autres échantillons provenant de productions artisanales et des échantillons du commerce.

2- Investigation phytochimique par GC-MS et LC-DAD-MS des quinze échantillons d'huiles de fruit de lentisques recueillis et des fractions insaponifiables de trois d'entre elles.

3- Un dosage des métaux lourds des différents échantillons et une évaluation du degré de rancissement ont été effectués.

4- Des évaluations biologiques *in vitro* portant sur l'activité antibactérienne et antioxydante des différents échantillons ont été réalisés.

5- Des évaluations toxicologiques, *in vitro* sur fibroblastes humains et *in vivo* par voie orale chez la souris ont été effectuées.

La présentation de ce travail est divisée en trois parties :

- La première partie est consacrée à un recueil bibliographique de *Pistacia lentiscus* L. portant sur l'aspect botanique, l'utilisation en médecine traditionnelle, et d'autre part sur l'huile de fruit de lentisque et ses effets thérapeutiques et pharmacologiques.
- La deuxième partie intitulée « Matériels et méthodes » décrit toutes les démarches méthodologiques que nous avons menées pour les deux fractions saponifiable et insaponifiable des huiles de fruit de lentisque.
- La troisième partie de ce travail comprend les « résultats et la discussion » des différentes études réalisées
- Enfin, une conclusion générale, avec des références bibliographiques et des annexes clôturent cette section du manuscrit.

**Première partie :**  
**RECUEIL BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I : Etude caractéristique de *Pistacia lentiscus* L.**

### **1. Généralités**

Le genre botanique *Pistacia* (les pistachiers) regroupe neuf espèces d'arbustes appartenant à la famille des Anacardiaceae. Cette famille regroupe 600 espèces réparties en 70 genres selon la classification de Watson et Dallwitz. Ce sont des arbres, arbustes, ou des lianes à feuilles alternes, souvent composées que l'on trouve dans les régions tempérées à tropicales (Mamane, 2017). Selon Quezel et Santa (1962-1963), le genre *Pistacia* est représenté en Algérie par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica*. Ces espèces sont dispersées spontanément dans le bassin méditerranéen (Seigue, 1985).

*Pistacia lentiscus* est un arbre ou arbuste à feuillage persistant, il possède un arôme caractéristique fort, sa hauteur varie d'un à huit mètres, ou il contribue à constituer les forêts, broussailles, maquis et garrigues. Il est très répandu sur le pourtour méditerranéen, il se développe sur tout type de sol (Bachrouch et al., 2015).

Quant à la nomenclature de *Pistacia lentiscus*, le nom du pistachier vient du grec pistaké « pistachier » qui signifie cet arbrisseau, et le nom lentisque vient du latin « lentus » qui signifie visqueux. Il est connu aussi par d'autres appellations comme : Darou, dherou ou drou en arabe local, Thidekt en kabyl, lentisque et arbre au mastic en Français ; et lentisk en Anglais



**1.1 Classification taxonomique et description botanique de *Pistacia lentiscus* L.**

**1.1.1. Classification taxonomique**

La classification phylogénétique de *Pistacia lentiscus* selon APG III est présentée comme suit :

|                     |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| <b>Règne :</b>      | <b>Archéplastides</b>                 |
| <b>Clade</b>        | <b>Angiospermes</b>                   |
| <b>Clade</b>        | <b>Dicotylédones vraies</b>           |
| <b>Clade</b>        | <b>Noyau des Dicotylédones vraies</b> |
| <b>Clade</b>        | <b>Rosidées</b>                       |
| <b>Clade</b>        | <b>Malvidées</b>                      |
| <b>Ordre</b>        | <b>Sapindales</b>                     |
| <b>Famille</b>      | <b>Anacardiacees</b>                  |
| <b>Sous famille</b> | <b>Anacardioides</b>                  |
| <b>Genre</b>        | <b><i>Pistacia</i></b>                |
| <b>Espèce</b>       | <b><i>Pistacia lentiscus</i> L.</b>   |

**1.1.2. Description botanique**

Les caractéristiques botaniques de *Pistacia lentiscus* L. sont présentées comme suit :

**-Ecorce :** Rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.

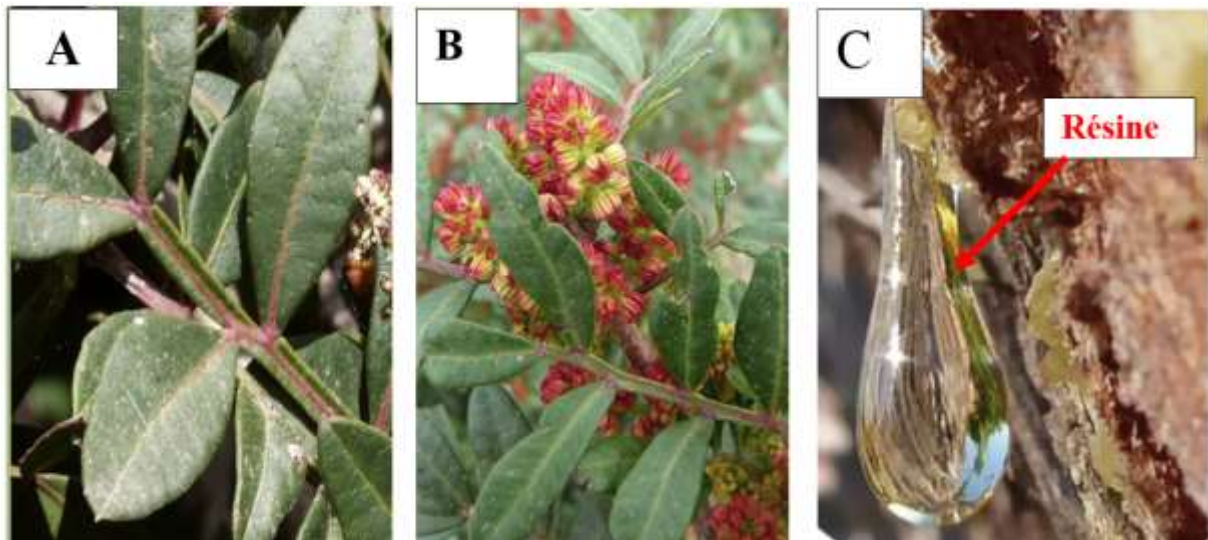
**- Branches** tortueuses et pressées, forment une masse serrée.

**- Feuilles :** Sont persistantes, composées, et possèdent un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (Figure 01 A).

**- Fleurs :** Les fleurs unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe. Elles apparaissent au printemps et sont très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. On différencie les fleurs femelles des fleurs mâles grâce à leur couleur, vert jaunâtre pour les femelles et rouge foncé pour les mâles. Les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents, les mâles ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres reposant sur un disque nectarifère. Les femelles, à 3 ou 4 sépales, un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates. Floraison de Mars à Mai (Belfadel, 2009)(Figure 01 B).

-**Fruit** : Est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme ; d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité, qui est complète l'automne (Figure 01 D).

-**Mastic** : Si l'on incise le tronc de ce végétal, il s'en écoule un suc résineux (Figure 01C) nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie.



**Figure 01** : Feuille (A), Fleur (B), Résine (C) de *Pistacia lentiscus* L.

(<http://monerbier.canalblog.com/archives/2010/05/04/17781652.html>, visité le 4-9-2020).



**Figure 02 :** Fruits (D) de *Pistacia lentiscus* L. (Bejaia-Akbou), (photo prise en novembre 2019).

## 2. Répartition géographique et exigences écologiques de *Pistacia lentiscus* L.

### 2.1 Répartition géographique

*Pistacia lentiscus* est un arbrisseau que l'on trouve couramment en sites arides d'Asie et région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique, jusqu'aux îles Canaries (Belfadel, 2009).

*Pistacia lentiscus* pousse dans l'Algérie à l'état sauvage dans les garrigues et sur les sols en friche, on la retrouve sur tous types de sols, plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Saadoun, 2002 ; Belhadj, 2000).

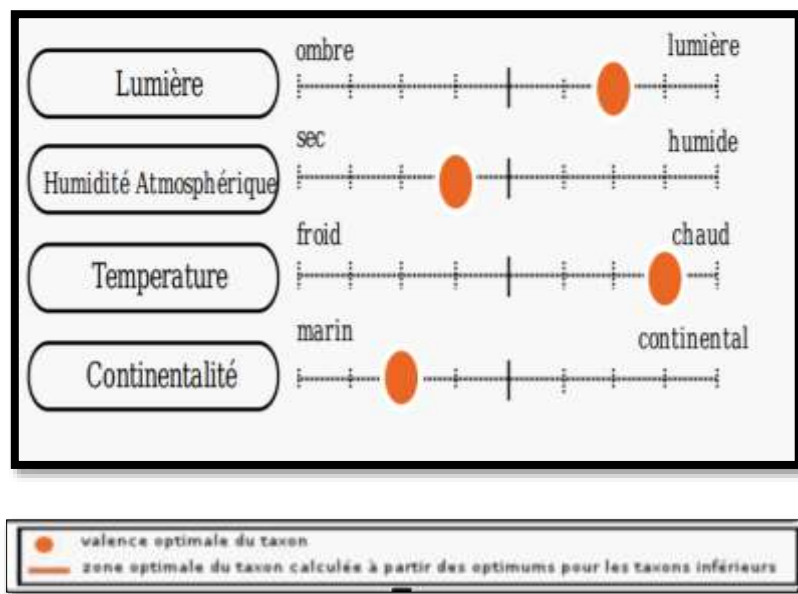
### 2.2 Exigence écologique

Le pistachier lentisque pousse dans une ambiance climatique subhumide, semi-aride et chaude. En zones humides, *Pistacia lentiscus* est plus abondante dans les plaines que sur les hauteurs, contrairement aux zones semi-arides où elle pousse plutôt sur les hauteurs. Dans des régions arides et avec un climat sec, *Pistacia lentiscus* devient rare excepté dans certaines régions, où sont présents certains facteurs compensateurs (morceau temporairement humide, substratum argileux ou limon argileux) (Bensalem, 2015).

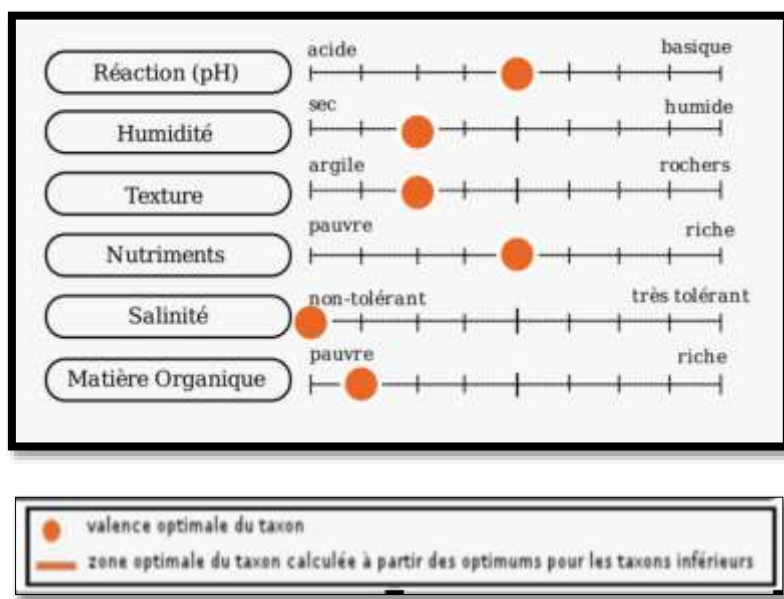
Pistachier lentisque est un arbrisseau qui préfère sur les sols siliceux et secs, il se développe sur

des sols calcaires, donc cette plante est considérée comme thermophile et xérophile. *Pistacia lentiscus* est une espèce indifférente aux propriétés physico-chimiques du sol mais préfère des sols à faible concentration en phosphore et potassium conjugués avec des concentrations différentes en carbonate de calcium et en azote (Dogan et al., 2003).

*Pistacia lentiscus* est considéré comme une espèce indifférente aux variations du milieu, d'ailleurs sa dispersion indique son adaptation optimale aux conditions globales qu'offre son milieu environnant. L'adaptation au manque d'eau de *Pistacia lentiscus* est expliquée par l'absence de stomate au niveau de la face supérieure des feuilles, et la présence de stomates sur la face inférieure de la feuille. Son système racinaire est puissant et bien développé, s'accrochant sur les pentes rudes et les terrains rocheux, c'est un couvre sol idéal (Saadoun, 2002).



**Figure 03 :** Caractéristiques climatiques du *Pistacia lentiscus* (Julve, 2020).



**Figure 04 :** Caractéristiques du sol de *Pistacia lentiscus* (Julve, 2020).

### 3. Utilisations traditionnelles et effets pharmacologiques de *Pistacia lentiscus* L.

#### 3.1 Utilisations thérapeutiques traditionnelles

*Pistacia lentiscus* est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. En effet, les médecins traditionnels de la méditerranée, attribuent aux parties aériennes de lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux et la jaunisse (Benhammou et al 2008 ; Bammou et al., 2015).

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que : les infections buccales, diarrhées, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (Villar et al., 1987 ; Ali-Shtayeh et al., 1999 ; Ali-Shtayeh et al., 2000 ; Lev et Amar, 2000 ; Lev et Amar, 2002 ; Said et al., 2002 in Belfadel, 2009). Pour le décocté des racines séchées, il s'est avéré qu'il est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Palevitch, 2000).

#### 3.2 Effets pharmacologiques

##### 3.2.1 Feuilles et fruits de *Pistacia lentiscus* L.

Les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* présentent des propriétés hypocholestérolémiques et pourraient être utilisés pour la prévention des troubles associés à l'hypercholestérimie (Cheurfa et Allem, 2015). Alors que les huiles essentielles de feuilles de *P. lentiscus* ont montré des propriétés anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes remarquables (Bouyahiya et al., 2019). L'étude de Mehenni et al (2016) sur les extraits de fruits et de feuilles de *Pistacia*

*lentiscus*, montre un effet hépatoprotecteur et antidiabétique. Selon Arab et al (2014), les fruits murs du lentisque sont très efficaces pour le traitement des maladies de l'estomac et les infections respiratoires.

### **3.2.2 Le mastic**

La résine de *Pistacia lentiscus* a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005). Ces croyances traditionnelles sont en accord avec de récentes études montrant que le mastic de Chios induit l'apoptose et dispose d'action antiproliférative contre les cellules cancéreuses du côlon (Balan et al, 2005)



## Chapitre II : Etude de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.

### 1. Généralités sur l'huile de fruit de lentisque

Huile de lentisque est extraite du fruit comestible qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et la confection du savon. Elle est produite en Algérie surtout dans le Nord et l'Est, dans les zones notamment côtières (Jijel, Skikda, Béjaia), où l'espèce abonde. Les fruits atteignent leur maturité vers la fin de l'été et le début de l'automne. Ils prennent alors une coloration noire au lieu de rouge. Ils sont récoltés aux mains, macérées dans de l'eau chaude puis écrasés à l'aide d'une presse. Des baies s'exultent un liquide épais de couleur jaune vert. L'huile est récupérée par décantation (Boukeloua, 2009). Le rendement de l'huile varie de 8 à 18% selon les conditions de sol et du climat (Benslama, 2015). La méthode de préparation de l'huile de lentisque, sera détaillée dans le chapitre « matériels et méthodes ».

### 2. Composition chimique

La fraction saponifiable de l'huile de lentisque est constituée majoritairement par des acides gras insaturés mono et polyinsaturés ainsi que d'acides gras saturés. D'autres substances lipidiques auxiliaires dites constituants mineurs constituent la fraction insaponifiable de l'huile de lentisque tels que : les tocophérols, les phytostérols et des composés phénoliques (Dhifi et al., 2013).

#### 2.1 Composition saponifiable de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.

##### 2.1.1 Acides Gras

La classe la plus importante des acides gras dans l'huile de *Pistacia lentiscus* est représentée par les acides gras mono-insaturés (AGMI), suivie par les AG saturés (AGS) et polyinsaturés (AGPI). Le principal AG de l'huile de lentisque est de l'acide oléique (C18: 1), celui-ci est réputé pour son rôle dans la préservation des maladies cardiovasculaires et pour sa valeur nutritive. En effet, les résultats de Dhifi et al (2013) ont montré que la classe d'acides gras prédominante était celle des acides gras mono-insaturés représentant 52,4% des acides gras totaux. Elle a été suivie par la classe des acides gras saturés et des acides gras polyinsaturés représentant respectivement : 26,42, 21,18 et 11%. Djerrou (2014) montre aussi dans son étude que les trois acides gras dominants dans l'huile végétale obtenue à partir des baies de *Pistacia lentiscus* de l'Algérie sont: l'acide oléique (54,4%), l'acide palmitique (22,5%) et l'acide linoléique (19,8%).

### 2.1.2 Triglycérides

Les triglycérides (TG) représentent 95 à 98 % des graisses alimentaires et sont composés d'une molécule de glycérol dont les 3 fonctions alcool sont estérifiées par 3 acides gras semblables ou différents. La majorité des triglycérides (TG) de l'huile de *Pistacia lentiscus* sont des formes mono et polyinsaturées (Mamane, 2017).

## 2.2 Composition en insaponifiable de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.

La fraction insaponifiable de l'huile de fruit de *P. lentiscus* contient des tocophérols, des stérols et des composés phénoliques. Notons cependant que peu de travaux ont été réalisés sur cette fraction.

### 2.2.1 Les tocophérols

Les tocophérols désignent un ensemble de molécules composées d'un noyau 6-hydroxy-chromane, et d'une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique. La chaîne carbonée existe sous deux formes : une forme comprenant trois insaturations présentées par les tocotriénols et la forme totalement saturée caractérisant les tocophérols. Quant aux huiles végétales, elles sont caractérisées par la présence de quatre groupes de tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ ) (Dellapenna et Pogson, 2006).

Selon Dhifi et al (2013), l'huile de *Pistacia lentiscus* est très riche en tocophérols, elle contient 811,137 mg de tocophérols / kg d'huile de lentisque, dont l' $\alpha$ -tocophérol présente la plus forte activité antioxydante. Cet antioxydant qui se trouve sous quatre formes isomériques est responsable de la stabilité de l'huile de lentisque à l'oxydation.

### 2.2.2 Les phytostérols

Les phytostérols présentent une analogie de structure avec le cholestérol. Toutes les huiles végétales contiennent des phytostérols avec des teneurs variant en moyenne de 0,1 à 0,5 %, soit 100 à 500 mg/100g d'huile (Evrard et al., 2007).

L'étude réalisée par Trabelsi et al (2012) sur les baies de *Pistacia lentiscus* récoltées en Tunisie montre que, seulement quatre stérols ont été identifiés et quantifiés. Le  $\beta$ -sitostérol a été le principal, suivi par le campestérol. Le cholestérol et le stigmastérol ont été détectés en quantités infimes.



### 2.2.3 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles et l'évaluation de l'intérêt nutritionnel, malgré leurs faibles teneurs (Brenes, 2002). De faibles teneurs en polyphénols ont été trouvées dans l'huile de lentisque par rapport, aux autres parties de la plante selon l'étude de Bensaci et Hadj mokhnache (2015). Selon l'étude de Djedaia (2016), les fruits de *Pistacia lentiscus* présentent de fortes teneurs en polyphénols (154,34 mg EAG.g-1 de matière sèche) en flavonoïdes (75,2 mgEcat.g-1 MS), en tanins (51,5 mg Ecat.g-1 matière sèche) et en vitamine E (6,6%). Ceci permet d'expliquer l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle.

## 3. Aspect pharmacologique et utilisation traditionnelle de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus*

### 3.1 Aspects pharmacologiques

L'étude de Djerrou et al (2010) montre que l'huile de fruit de *P.lentiscus* a une activité curative réelle des brûlures expérimentales effectuées sur les lapins, en diminuant la phase inflammatoire, en favorisant la contraction de blessure et en réduisant la période d'épithélialisation. Un autre travail qui vise à évaluer l'activité anti-hypercholestérolémique d'huile végétale de *Pistacia lentiscus* a été élaboré par Djerrou (2014). Il a montré que cette huile possède des propriétés anti-hyperlipidimique en réduisant les taux de LDL-cholestérol et des triglycérides totaux.

Maameri-Habibatni (2014) a mené une étude afin d'établir une procédure rigoureuse à l'utilisation de l'huile végétale de *P. lentiscus* dans la médecine traditionnelle. Elle note que cette huile peut être recommandée dans le traitement des maladies du foie à la dose de 2mL /Kg. Par ailleurs, des propriétés cicatrisantes sont décrites sur l'utilisation du mélange d'huile de lentisque avec le miel.

Mezni et ses collaborateurs (2012) ont évalué l'influence du mode d'extraction sur les activités antioxydante et antibactérienne d'huile du fruit de *Pistacia lentiscus*. Ils ont noté que les meilleures activités ont été attribuées aux huiles extraites par pression par rapport à celles extraites traditionnellement.

### **3.2 Utilisation traditionnelle**

En Algérie cette huile est employée dans la médecine traditionnelle comme antidiarrhéique (Trabelsi et al., 2012). Au Maroc, l'huile de fruit de lentisque est recommandée aux diabétiques, dans le traitement des douleurs de l'estomac et en cas de circoncision (Hmimsa, 2004). Elle est utilisée aussi comme médication externe sous forme d'onguent pour soigner des brûlures ou les douleurs dorsales (Bellakhdar, 1997). En Tunisie, en dehors de l'utilisation de cette huile pour le traitement de l'estomac et des blessures, elle est utilisée également pour traiter le cancer (Mezni et al., 2016).

**DEUXIEME PARTIE :**  
**MATERIELS ET METHODES**

## Chapitre I : travail prospectif

En Algérie, l'huile de fruit de lentisque est produite traditionnellement à l'Est de l'Algérie, dans les zones notamment côtières (Jijel, Skikda, voire même Béjaia), où l'espèce est abondante. Notre travail a pour objectif principal de caractériser l'huile de fruit du *Pistacia lentiscus* L. dans la région de l'Est algérien.

### 1 Identification des producteurs d'huile de fruit de lentisque dans l'Est algérien

Les nombreuses vertus thérapeutiques et cosmétiques attribuées à l'huile de lentisque poussent depuis quelques années, beaucoup de personnes à se lancer dans sa production en Algérie. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux productions dans l'Est algérien. Pour cela, nous avons choisi de décrire les procédés de deux coopératives à caractère semi traditionnel ainsi que ceux de productions artisanales et commerciales.

#### 1.1 La production artisanale

Dans la plupart des régions rurales où prolifère *Pistacia lentiscus*, ce sont des femmes, notamment de condition modeste, qui se sont lancées dans cette production utilisant des méthodes purement traditionnelles. Cette activité lucrative a inspiré d'autres qui se sont mis à la cadence d'une production plus professionnelle. Pour cela, nous nous sommes rapprochés des femmes qui travaillent sur l'extraction des huiles. Trois échantillons artisanaux ont été collectés dans la région de Jijel (Sidi abdelaziz, Settara, Ouled rabeh) et deux autres échantillons proviennent de Blida et de la région d'Elkala (Etaref). Dans la suite du document, nous avons appelé ces huiles : les huiles artisanales.

#### 1.2 Production semi artisanale en coopérative

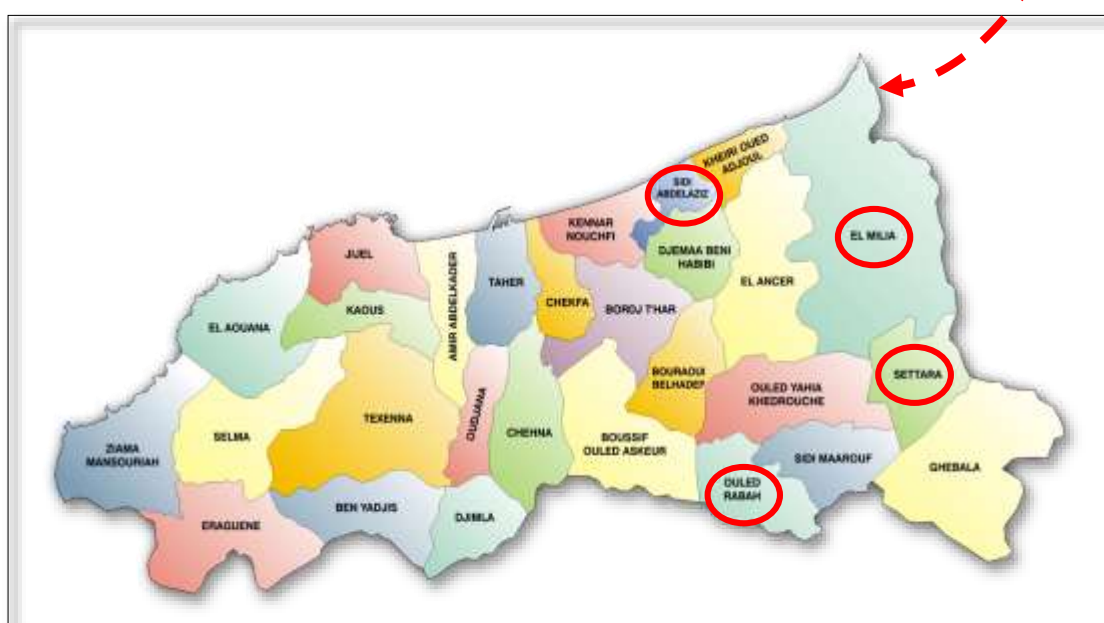
D'après notre investigation sur les coopératives d'huile de lentisque. Deux coopératives ont pu être contactées :

La coopérative de Bouannani située dans la wilaya de Jijel.

La coopérative Ladjudane à Akbou dans la wilaya de Bejaia.



**Figure 05 :** Localisation des échantillons de l'huile du fruit de lentisque.



**Figure 06 :** Localisation des échantillons de l'huile de lentisque dans la région de Jijel.

### 1.2.1 La coopérative Ladjoudane (Akbou, Béjaia)

Djelouah abdenour est propriétaire et gérant d'une huilerie traditionnelle au village Seddouk Ouadda à Akbou, dans la wilaya de Béjaia (voir Tableau 01). Cette coopérative tire son appellation du mot français l'adjutant ou Ladjoudane selon l'argot algérien qui était le grade du propriétaire pendant la guerre de libération. A. Djelouah ne se limite pas à la production d'huile de lentisque il produit plusieurs autres huiles issues d'oléagineux : grains d'oléastre

(azebouj) d'où il extrait des huiles destinées à la commercialisation à visée santé, cosmétique. Cette coopérative a débuté sa production en 2008.

**Tableau 01 :** Coordonnées GPS de la coopérative Ladjoudane (Akbou, Bejaia).

| Station | Latitude Nord     | Longitude Est   | Altitude | Distance de la wilaya (Béjaia) |
|---------|-------------------|-----------------|----------|--------------------------------|
| Akbou   | 36° 27' 32.458" N | 4° 32' 0.522" E | 400 m    | 70 km                          |

### 1.2.2 La coopérative Bouannani

Cette coopérative produit l'huile de lentisque depuis 2005 à Boucharef, une localité située à la périphérie de la commune de Settara, à l'est de la wilaya de Jijel (voir Tableau 02). Le propriétaire Smail Bouannani nous a affirmé lors de notre discussion être l'un des premiers producteurs à l'échelle nationale, et posséder l'unique huilerie de toute la wilaya de Jijel, spécialisée dans l'huile de lentisque.

**Tableau 02:** Coordonnées GPS de la coopérative Bouannani (Jijel).

| Station            | Latitude Nord | Longitude Est | Altitude | Distance de la wilaya (Jijel) |
|--------------------|---------------|---------------|----------|-------------------------------|
| Bouchref (Settara) | 36° 43' 6.69" | 6° 20' 9.244" | 234 m    | 68km                          |

## 2. Méthodes de production en coopérative

Afin d'assurer un revenu pour les populations locales et de produire une huile de lentisque de grande quantité et de meilleure qualité, plusieurs procédés de fabrications sont employés. Il existe deux méthodes d'extraction de l'huile de lentisque : la méthode traditionnelle mécanique ou semi traditionnelle et la méthode artisanale.

### 2.1 Méthode de la coopérative Bouannani

Le propriétaire de cette coopérative a introduit des transformations sur le mécanisme de fonctionnement de cette huilerie pour l'adapter aux graines de lentisque. La méthode d'extraction de l'huile de lentisque au sein de cette coopérative passe par les étapes suivantes :

- 1) Cueillette et le tri:** La récolte des fruits se fait en période hivernale quand il fait plus ou moins beau par des riverains qui touchent une rémunération de 5000 et 6000 DA par quintal. Après la cueillette, les fruits de lentisque sont triés pour éliminer les rameaux et les feuilles, puis lavées à l'eau froide.

- 2) **Broyage et le malaxage :** Le broyage est effectué avec un broyeur métallique pour libérer le maximum d'huile, un malaxage semble nécessaire afin d'obtenir une pâte onctueuse. C'est une opération qui suit le broyage et a pour but de rompre l'émulsion entre l'eau et l'huile et faire agglomérer les particules d'huile en gouttes plus grosses, se séparant spontanément de l'eau provenant du végétal. Cette pâte est constituée d'une partie solide (débris des noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires,...) et une partie fluide (huile et eau de végétation).
  - 3) **Pressage et la décantation:** La pâte doit subir une pression en ajoutant de l'eau tiède, elle est répartie sur des disques en fibres naturelles appelés scourtins. Le résultat de cette pression est d'une part un liquide constitué de la margine (eau de végétation) et de l'huile, et d'autre part le grignon, la partie solide qui reste entre les scourtins.
  - 4) Dans un réservoir, la décantation se fait par un procédé naturel dans des bidons en plastique ou des bouteilles: l'huile plus légère est séparée de la margine qui reste en bas des récipients. Les tourteaux de grignon forment une nourriture destinée aux bétails et volaille.
- **Le rendement :** Il varie entre 4,5%-12% (4,5 à 12 litres par quintal).



**Figure 06 :** Moulin traditionnel de l'huile de lentisque (Bensalem., 2015).



## 2.2 Méthode de la coopérative Ladjoudane

Dans le procédé d'extraction semi-artisanal, le propriétaire de la coopérative Ladjoudane emploie un matériel qui est constitué d'un broyeur à pierre, une presse hydraulique moderne et une nageoire pour la collecte et la décantation de l'huile. La cueillette et le tamisage sont réalisés par le propriétaire et son fils (voir figure 07). Les autres étapes de cette fabrication (voir figures 08 et 09) ressemblent à celles de la coopérative de Bouannani. Dans le but d'optimiser la qualité de l'huile de lentisque, le propriétaire de la coopérative Ladjoudane préconise d'ajouter l'extrait de feuille de lentisque à l'huile.

- Le rendement: Il varie entre 4.5%-12% (4.5 à 12 litres par quintal).



**Figure 07 :** Collecte de fruits de lentisque par le propriétaire de la coopérative.



Partie liquide : l'eau de végétation et l'huile

Partie solide : débris des noyaux,

**Figure 08 :** Broyage du fruit de lentisque par le broyeur meule de pierre.





Empilement  
de centaines  
de scourtins

**Figure 09 :** Pressage de l'huile de lentisque par la presse hydraulique.

### 2.3 Méthode de production artisanale

Ce procédé reste le plus commun pour l'extraction de l'huile, il est purement artisanal et généralement utilisé par la population locale du milieu rural algérien. Les fruits sont matures vers la fin de l'automne, début de l'hiver, de couleur rouge puis noire à maturité. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude puis écrasées à l'aide de deux pierres. La pâte est séparée ensuite du liquide par filtration. Ce liquide est un mélange d'eau de d'huile épais de couleur jaune vert. L'huile est enfin, récupérée par décantation (Lanfranchi,1999).

Pour les échantillons des huiles collectés auprès des familles rurales, ont été obtenus par les procédés d'extraction suivants :

#### ➤ Extraction à chaud

Deux méthodes ont été constatées :

- Le premier procédé consiste à effectuer un premier chauffage avant l'extraction ce qui facilite l'obtention et la préparation de l'huile (voir figure 3). L'huile récupérée subit ensuite un second chauffage qui élimine l'eau résiduelle.
- Contrairement à la première méthode, un seul chauffage à la vapeur ou par trempage pendant 15 minutes pour faciliter l'extraction.

Il est à noter que toutes les huiles artisanales sont extraites à chaud excepté celle d'Elkala est obtenue à froid.

➤ **L'extraction à froid**

Lors de notre visite à la région de Haddada à Elkala, les femmes nous ont expliqué leur méthode d'extraction à froid basée sur les étapes suivantes :

- 1) La collecte des fruits durant la période (Octobre, Novembre, Décembre).
  - 2) Le tamisage des fruits (le tri des échantillons).
  - 3) L'écrasement des fruits de lentisque en utilisant la pierre jusqu'à l'obtention d'une pâte.
  - 4) La macération de la pâte dans l'eau froide, en mettant des glaçons dans l'eau, durant 12 à 36h.
  - 5) Séparation de l'huile suivie d'un essorage de la pâte à l'aide d'un tissu propre afin de séparer l'huile résiduelle, durant deux jours, le liquide est ensuite décanté durant 2 jours.
  - 6) Récupération de l'huile et conditionnement dans des bouteilles.
- **Le rendement** : de ce type d'extraction est de 16% (25 kg pour 4 litres). Cette valeur est proche de celle rapportée par Lanfranchi et al. (1999) qui montrent que 16 kg des baies mûres produisent environ 3 litres d'huile soit un rendement proche de 18 à 19 %.



Tri et nettoyage des fruits de lentisque.



Chauffage par vapeur des fruits nettoyés.



Malaxage des fruits chauffés par les pieds et puis par la pierre.



Chauffage de la pâte et essorage.



Recueil de l'huile et évaporation de l'eau.



Conditionnement de l'huile dans des bouteilles.

**Figure10** : Étapes d'extraction de l'huile de lentisque selon la méthode artisanale (Bouteldj et Kadjoudj, 2013).

➤ **Les huiles du commerce**

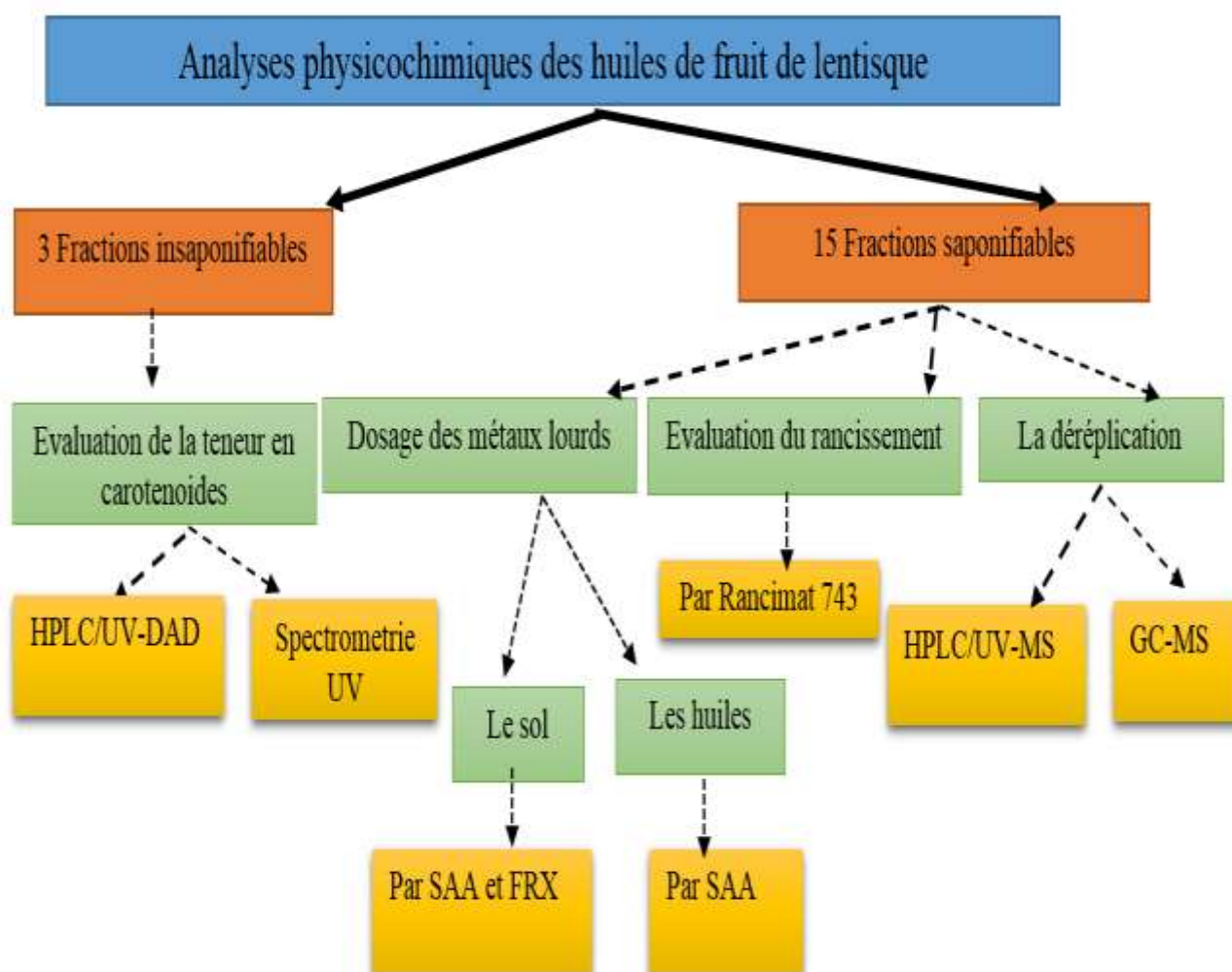
En parallèle des huiles du commerce ont été ajoutées à l'étude. Des demandes sur les modes de production ont été réalisées, cependant aucune réponse ne nous est parvenue.

## Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque

## Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque

Nos travaux ont été menés à partir d'échantillons provenant des huiles de deux coopératives, de six artisans exerçant dans la région de Jijel, El teref et Blida et d'huiles commerciales de six marques différentes achetées à Sétif, Skikda, Jijel et Oum bouaghi.

Des analyses physicochimiques des échantillons collectés ont été réalisées afin de déceler des particularités et ou des différences pouvant provenir des lieux de cultures ou des méthodes de fabrication. Ces analyses ont également pour objectif d'identifier des marqueurs de qualité, l'ensemble des analyses de ce chapitre sont récapitulés en dessous.



**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

**1. Étude de la composition de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.**

L'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* nous donc été fournie par deux coopératives semi-traditionnelles : Ladjoudane (Akbou) situé à Bejaia et huilerie Bouannani (Jijel). Les huiles artisanales, proviennent de familles exerçant cette activité traditionnellement (en majorité les femmes). Les huiles commerciales ont été achetées dans des boutiques parapharmaceutiques et herboristes. La collecte des échantillons a été faite en période hivernale (Décembre 2017).

L'ensemble des analyses réalisées, dans le cadre de cette étude, ont été effectués au laboratoire de pharmacognosie (Paris-Descartes) en France et le centre de recherche des analyses physicochimiques (C.R.A.P.C) en Algérie.

**Tableau 03 :** Identification des huiles de fruit de lentisque.

| Origine des huiles de lentisque | Nom l'échantillon            | Région de production ou siège de l'entreprise | Méthode d'extraction | Code      |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|-----------|
| Huilesdes coopératives          | Coopérative Bouanani         | Settara –Jijel                                | Extraction à chaud   | <b>1</b>  |
|                                 | CoopérativeLadjoudane (2015) | Akbou-Béjaia                                  | Extraction à chaud   | <b>2</b>  |
|                                 | CoopérativeLdjoudane (2017)  | Akbou-Béjaia                                  | Extraction à chaud   | <b>3</b>  |
| Huiles artisanales              | Settara                      | Jijel                                         | Extraction à chaud   | <b>4</b>  |
|                                 | Ouled rabah                  | Jijel                                         | Extraction à froid   | <b>5</b>  |
|                                 | Sidi abdelaziz               | Jijel                                         | Extraction à chaud   | <b>6</b>  |
|                                 | El kala                      | El teref                                      | Extraction à froid   | <b>7</b>  |
|                                 | Blida                        | Blida                                         | Extraction à chaud   | <b>8</b>  |
| Huile commerciales              | El wafia                     | Blida                                         | *                    | <b>9</b>  |
|                                 | Zazia                        | Oumbouaghi                                    | *                    | <b>10</b> |
|                                 | Belkis                       | Constantine                                   | *                    | <b>11</b> |
|                                 | Zahretatibaa                 | Skikda                                        | *                    | <b>12</b> |
|                                 | El fourssane                 | Sétif                                         | *                    | <b>13</b> |
|                                 | Sultane                      | Sétif                                         | *                    | <b>14</b> |
|                                 | El milia                     | Jijel                                         | *                    | <b>15</b> |

\* : Méthode d'extraction des huiles commerciales est inconnue, parce qu'aucune réponse ne nous est parvenue par les responsables des entreprises.

**1.1 Étude de la fraction saponifiable**

L'huile de lentisque est constituée de deux fractions, une fraction saponifiable et une fraction insaponifiable. Le principe de la saponification est basé sur la transformation des acides gras en dérivés d'esters d'acides gras ou esters méthyliques.

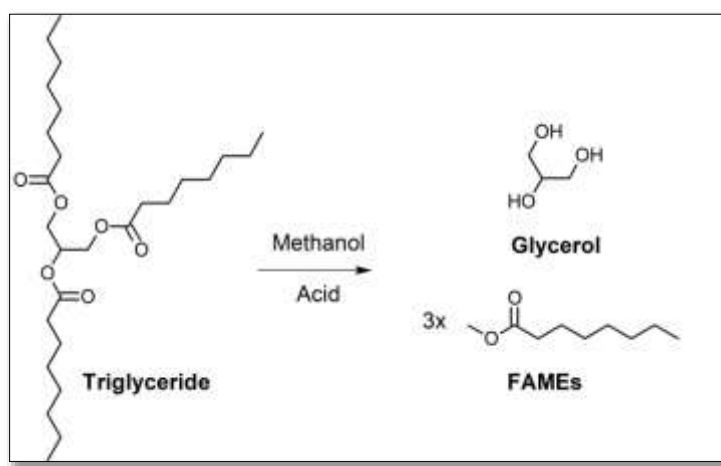
## Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque

## 1.1.1 Déréplication par analyse GC-MS après dérivatisation en esters méthyliques

L'analyse des esters alkyls des acides gras d'une huile végétale reflète la détermination de sa teneur en acides gras. Pour cela, il conviendra de réaliser une réaction de trans-estérification de l'huile de lentisque afin d'obtenir des esters alkyls et les analyser par la technique GC/MS.

## 1.1.1.1 Préparation des esters méthyliques

L'extraction des acides gras correspond à la solubilisation des triglycérides contenus dans l'huile par un solvant organique. Cette étape est suivie d'une méthyl-trans-estérification qui consiste à ajouter un alcool aux acides gras libérés pour former des esters méthyliques d'acides gras dont la séparation sera facilitée.



**Figure11** : Transformation des triglycérides en esters méthyliques d'acides gras (EMAG ou FAME).

Les esters méthyliques ont été préparés selon la méthode suivante :

- Dans un tube en verre de 5 mL, l'huile de lentisque (50 mg) est diluée dans 1 mL d'hexane. Puis, 0,5 mL de  $\text{BF}_3$  (14%)-méthanol sont ajoutés et la solution est placée dans l'étuve pendant 30 minutes (50-60°C). Après retour à température ambiante, 1 mL d'eau distillée est ajouté au mélange, puis la phase organique contenant les esters méthyliques est récupérée pour être injectée en chromatographie gazeuse (CG) (Lawal et al., 2015).

## 1.1.1.2 Analyse après formation des esters méthyliques par CG-FID

L'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un appareil CG (Master GC-Dani, France) avec une colonne HP5 (5% Phenyl-Hexyl) muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ayant les caractéristiques suivantes : longueur de 100 m, diamètre interne de 0,25 mm, épaisseur



**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

du film de 0,2  $\mu\text{m}$ . Les conditions chromatographiques étaient :

- Gaz vecteur : Azote avec un débit de 1 mL/min.
- Température de l'injecteur : 250 °C.
- température du détecteur FID : 280°C.
- Volume injection : 1  $\mu\text{L}$  splitless.

**Tableau 04** : Programmation du four de la GC-FID.

| T (°C) | Temps (min) | Rate °C/min |
|--------|-------------|-------------|
| 70     | 5           | 10          |
| 130    | 2           | 30          |
| 220    | 4           | 10,00       |
| 280    | 7           | 0,00        |

Les esters méthyliques ont été identifiés par comparaison avec des standards commerciaux d'esters méthyliques (F.A.M.E.Mix C8-C24, 100mg, N CRM18918).

### 1.1.2 Déréplication par analyse GC-MS après dérivatisation en dérivés silylés

La silylation permet de convertir les alcools (-OH) en groupements éther de silyle (-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Ces éthers moins polaires fournissent des composés plus lourds mais volatils en spectrométrie de masse. Cette technique souvent utilisée pour l'identification des molécules par GC-MS, a été retenue pour caractériser les insaponifiables.

#### 1.1.2.1 Dérivatisation en dérivés silylés

Environ 5 mg de la fraction insaponifiable des échantillons Elkala, Blida, Akbou, PDM1, PDM6 (Fruit de lentisque de Jijel, El ansar), sont introduits dans des ballons, placés dans un bain marie. Les solutions des échantillons sont portées à ébullition (60°C), puis on ajoute 500  $\mu\text{L}$  de la pyridine, 100  $\mu\text{L}$  d'hexaméthylidisilane (HMTS) et 40  $\mu\text{L}$  de triméthylchlorosilane (TMCS). La solution est ensuite agitée durant 30 minutes (Bereau, 2001).

#### 1.1.2.2 Analyse des dérivées silylés par CG-MS

Les analyses en CG-SM ont été réalisées sur un GCMS-QP2010SE Système Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'une colonne capillaire de longueur : 30 m  $\times$  0,250 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  DB-5. La détection a été réalisée par un spectromètre de masse Agilent 5973N en mode d'ionisation par impact électronique, avec une température de source de 220°C, température d'interface : 240°C, Mode : balayage et une énergie d'ionisation de 70 eV.

Les conditions chromatographiques étaient :



**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

• Gaz vecteur : hélium avec un débit de 1 mL/min, et un split ratio de 20.00 (Mode d'injection : Split ratio, 100 :1, Pression : 95,2 Kpa, Débit total : 98,7 mL, Débit de la colonne : 0,92 mL/min, Débit de la purge : 6 mL/min,)

- Température de la colonne : 180°C
- Température de l'injecteur : 220°C
- Volume d'injection : 1 µL

Les échantillons ont été analysés avec la colonne maintenue initialement pendant 1 minute à 180°C après l'injection, puis la température a été augmentée à 270°C avec une rampe de chauffage à 8°C/minute et maintenue ensuite à une température isothermale pour 65 min (Jasminca, 2001).

**1.1.3 Déréplication par HPLC/UV-MS des huiles de lentisque**

L'analyse des huiles de lentisque a été effectuée sur l'appareil UHPLC Dionex Ultimate 3000 (thermo fischer scientifique) LC-UV-Vis équipé d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4,6 mm × 15mm, 5µm).

La température du four de la colonne a été fixée à 25 °C. En outre, l'HPLC a été couplée à un spectromètre de masse ISQEM en utilisant une interface ESI qui fonctionne dans les deux modes d'ionisation, avec une analyse complète de 100-1000 uma. Les valeurs optimales des paramètres de la masse ISQEM ESI sont : température de la source : 320 °C; température de séchage de gaz : 320 °C ; débit de gaz : 15L /min ; voltage capillaire : 3500 V; pression de nébuliseur : 60 PSI.

➤ **Procédure LC- MS**

10 mg d'huile de lentisque ont été solubilisés dans 1mL de MeOH (grade LCMS), un volume de 10µL est prélevé de la solution puis injecté. L'élution a été réalisée selon les conditions suivantes : La phase mobile était composée d'acétonitrile et d'eau dans les proportions ci-dessous indiquées :

Solvant A : ACN (0,5% acide formique) ; Solvant B : H<sub>2</sub>O (0,5% acide formique)

**Tableau 05** : Composition du gradient d'élution de LC-MS.

| Temps (min) | Solvant A (%) | Solvant B(%) | Débit (ml/min) |
|-------------|---------------|--------------|----------------|
| 0           | 5             | 95           | 0,7            |
| 10          | 5             | 95           |                |
| 40          | 100           | 0            |                |
| 60          | 100           | 0            |                |
| 70          | 5             | 95           |                |
| 75          | 5             | 95           |                |

**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

---

**1.2 Étude de la fraction insaponifiable**

L'insaponifiable d'une huile correspond à l'ensemble des constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Généralement, la fraction insaponifiable des huiles contient des molécules de haut poids moléculaire, non volatils, possédant une solubilité faible dans les solvants aqueux.

Elle représente environ 0,2 à 2% d'une huile non raffinée, la moyenne se situant aux environs de 1%, bien que l'on rencontre des proportions pouvant aller exceptionnellement jusqu'à 10%.

L'isolement de l'insaponifiable des huiles a été réalisé suivant la norme **AFNOR NF T 60-206**.

Le principe de cette méthode repose sur la saponification d'une prise d'essai de 5g d'huile par 50 mL d'une solution de KOH éthanolique (2N) à chaud, le mélange est porté à reflux pendant une heure à température 75°C avec agitation. La solution est concentrée à sec par évaporation sous pression réduite à une température ne dépassant pas 40°C. 50 mL d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel.

La solution ainsi obtenue est extraite par addition d'éther diéthylique (3x100 mL) dans une ampoule à décanter. Les fractions combinées sont rincées par 100 mL de la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (0,5 N) et deux fois par 100 mL d'eau distillée puis la phase éthylique est séchée sur sulfate de sodium anhydre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite pour fournir un résidu sec correspondant à la fraction insaponifiable.

**1.2.1 Évaluation de la teneur en insaponifiable**

La teneur des insaponifiables est déterminée par la relation suivante :

$$\text{Insaponifiable (\%)} = (m_1/m_0) \times 100$$

**m<sub>1</sub> : la masse (g) du résidu séché.**

**m<sub>0</sub> : la masse (g) de la prise d'essai.**

**1.2.2 Évaluation de la teneur en caroténoïdes de l'insaponifiable par spectrophotométrie UV**

Les caroténoïdes constituent une classe unique et diversifiée de pigments végétaux responsables de colorations jaune, rouge, orangée. Les caroténoïdes sont de puissants antioxydants, chez l'homme ils peuvent contribuer à la protection contre les maladies chroniques causées par un stress oxydant important. Environ 700 caroténoïdes sont retrouvés dans la nature, il existe six caroténoïdes couramment identifiés chez le plasma humain, sérum et lait maternel : α-carotène, β-carotène, β-cryptoxanthine, lycopène, lutéine et zéaxanthine (Khachik, 2006).

## Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque

## ➤ Mesures d'absorbance

À 5 mg des extraits insaponifiables (Blida, Akbouet Elkala), est ajouté 1mL de méthanol (grade HPLC). L'absorbance est lue à 665,2 nm ; 652,4 nm et 470 nm par un spectrophotomètre UV(SCHIMADZU).

## 1.2.3 Profils HPLC-UV/DAD de l'insaponifiable

L'analyse HPLC-UV des insaponifiables (Blida, Akbou et Elkala) a été effectuée en utilisant l'instrument Lachrome, équipé d'undégazeur à vide, un échantillonneur automatique, une pompe binaire et une DAD. La colonne utilisée pour la séparation chromatographique est une colonne X Select C18 (150 mm ×4.6 mm~5µm). Dans la séparation des extraits insaponifiables, le taux du flux utilisé était de 01 mL/min, la pression était de 412 Bar. La phase mobile utilisée est l'acétonitrile 40% mélangée avec le méthanol à 60% (éluant A) et de l'acétate d'ammonium 10 mM (éluant B). Le volume d'injection dans le système HPLC est de 5 µL. Le gradient linéaire appliqué est décrit selon le Tableau ci-dessous. Les extraits de l'insaponifiable ont été comparés par la lutéine (DUR-22-8-17, F : 2756), isolé par l'unité Phycosource (laboratoire de Pharmacognosie Paris-Descartes).

**Tableau 06 :** Composition du gradient d'élution HPLC-UV/DAD.

| Temps (min) | ACN/MeOH(%) | Acétate d'ammonium(%) |
|-------------|-------------|-----------------------|
| 0,0         | 70          | 30                    |
| 15,0        | 90          | 10                    |
| 30,0        | 90          | 10                    |
| 35,0        | 95          | 05                    |
| 45,0        | 98          | 02                    |
| 55,0        | 98          | 02                    |
| 60,0        | 70          | 30                    |
| 70,0        | 70          | 30                    |

## 2. Évaluation du degré de rancissement des échantillons d'huiles de Lentisque

## 2.1 Analyse par Rancimat 743

La stabilité à l'oxydation est un paramètre important dans la caractérisation des graisses et des huiles. La détermination de ce paramètre avec la méthode alternative Rancimat est basée sur la détermination conductométrique des produits de dégradation volatiles et comprend un tracé automatique de la conductivité en fonction du temps. L'évaluation est effectuée graphiquement à la fin de l'expérience (Markus et al., 1982).

Afin d'évaluer la qualité et la durabilité des huiles de lentisque de façon automatique, on a utilisé le Rancimat 743. C'est un appareil de mesure rapide commandé pour la détermination

**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

simple et fiable de la stabilité à l'oxydation. La méthode Rancimat est la méthode standard utilisée de différentes normes nationales et internationales telles que par exemple :

AOCS Cd 12b-92 (AOCS – American OilChemists' Society) Échantillonnage et analyse des graisses et des huiles commerciales : indice de stabilité huile.

ISO 6886 Graisses animales et végétales et huiles – Détermination de la stabilité à l'oxydation (test d'oxydation accélérée).

2.4.28.2-93 Test de stabilité des graisses sur autoxydation. CDM, Japan.

**2.1.1 Caractéristiques techniques de l'équipement**

Le Rancimat 743 est constitué de deux blocs de chauffage composés chacun de quatre positions de mesure, chaque bloc peut être chauffé de manière individuelle ce qui signifie que 4 échantillons à la fois peuvent être analysés à deux températures différentes ou 8 à la même température. Le Rancimat743 est commandé par l'intermédiaire d'un ordinateur raccordé à l'interface RS232 à l'aide d'un logiciel. Il est possible de connecter 4 appareils Rancimat au même logiciel donc on aura pour avantage d'analyser 32 échantillons simultanément. La plage de température est de 50°C à 220°C.



**Figure 12 :** Photo de l'équipement Rancimat 743 (C.R.A.P.C).

**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

---

**2.1.1.1 Principe et mode opératoire**

L'analyse Rancimat est basée sur l'accélération du processus de vieillissement de l'échantillon en augmentant sa température et en faisant passer un courant continu d'air au travers. Le courant d'air transporte les produits d'oxydation volatils à partir du tube échantillon dans un récipient contenant de l'eau distillée. La conductivité de l'eau est mesurée en continu. La conductivité augmente, une fois que les produits d'oxydation apparaissent. Une forte augmentation de la conductivité révélée par une inflexion de la courbe marque le temps d'induction. Pour mesurer le degré du rancissement des huiles de lentisque, on a pesé 3g de chaque échantillon dans un tube à Rancimat. Cet appareil est réglé selon les conditions suivantes : T : 110°C,  $\Delta T$  : 1,60°C, Débit du gaz : 10 L/Heure, deux essais pour chaque échantillon ont été effectués.

**3. Dosage des métaux lourds des échantillons d'huiles de Lentisque et du sol par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)**

Il y a une vingtaine de métaux lourds qui sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments. Pour autant, ils sont impliqués au niveau des processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes et des métabolites secondaires. De plus, certains éléments traces peuvent se présenter sous différents états d'oxydation et jouent ainsi un rôle très important dans les multiples systèmes enzymatiques (Kabata-pendias et pendias, 2001).

Malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains métaux sont considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles (Kabata-pendias et Pendias, 2001).

Dans notre étude de qualité des huiles de lentisque, nous nous sommes intéressés aussi du dosage du sol de *Pistacia lentiscus* avant extraction de l'huile, pour mieux comprendre l'origine des métaux lourds. Pour cela, nous avons choisi les sols des huiles des coopératives (Jijel et Akbou) et celui des récoltes utilisées pour la production de l'huile artisanale d'Elkala. Les éléments choisis sont les suivants : Cadmium (Cd), Cuivre (Cu), Plomb (Pb), Nickel (Ni) et Zinc (Zn).

**3.1 Minéralisation des échantillons**

Cette étape doit permettre l'élimination des matières organiques tout en stabilisant l'analyte.

**3.1.1 La minéralisation des échantillons de sols**

La minéralisation a lieu sous une hotte aspirante dans un godet en téflon, des masses de 0,5g de chaque échantillon ont été pesées dans des godets en téflon, puis un volume de 8 mL d'acide

**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré à 65% et de 5mL d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) à 37 % ont été ajoutés. Les godets sont fermés hermétiquement avec des pinces et laissés à la température ambiante pendant une heure, par la suite les godets ont été placés dans une étuve réglée à une température de  $110^\circ\text{C}$  pendant 2 heures.

Après refroidissement, les échantillons ont été filtrés dans des fioles jaugées de 50 mL, préparés au préalable, les fioles sont complétées au trait de jauge par l'eau bidistillée (Bakircioglu et al., 2012).

**3.1.2 La minéralisation des huiles**

Environ 5g de l'huile de lentisque de chaque échantillon sont introduits dans des godets en téflon auxquels on ajoute 6 mL d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  concentré à 65% et 4 mL d'eau oxygénée  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrée à 30%, le mélange est laissé en réaction pendant 10 min. Ensuite, les échantillons sont portés pendant 2 heures à  $110^\circ\text{C}$ . Après refroidissement des godets en téflon et stabilisation de la température à  $25^\circ\text{C}$ , les échantillons ont été filtrés dans des fioles jaugées de 50 mL, préparés au préalable, les fioles sont complétées au trait de jauge par l'eau bidistillée (Soil total digestion –HRR-EN-13).

**3.2 Analyse par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)**

**3.2.1 Le principe**

La spectrométrie d'absorption atomique est une technique qui s'est largement développée ces dernières années.

Cette technique sert à déterminer la concentration de certains métaux dans un échantillon. Elle fait partie des méthodes classiques d'analyse en chimie analytique. Basée sur des méthodes optiques, elle conduit aussi bien à des résultats qualitatifs qu'à des données quantitatives. L'absorption est utilisée pour faire un dosage sur un élément connu.

L'absorption atomique est un processus qui se produit lorsqu'un atome appartenant à l'état fondamental passe à l'état excité par l'absorption d'une énergie, sous la forme d'un rayonnement électromagnétique, qui correspond à une longueur d'onde spécifique.

Pour un atome à l'état libre, le passage de l'état fondamental à l'état excité est conditionné à la fourniture d'un quantum d'énergie correspondant à la différence d'énergie entre le niveau excité  $E_n$  et le niveau fondamental  $E_0$ .

En spectrométrie d'absorption atomique (SAA) on utilise un générateur de photons dont la fréquence correspond à l'élément à doser. Une population d'atomes, générée par un atomiseur à partir de l'échantillon, est éclairée par un rayonnement lumineux de longueur d'onde donnée. Les atomes absorbent cette énergie incidente pour passer du niveau fondamental au niveau

**Chapitre II : Analyse physico-chimique des échantillons d'huile de fruit de lentisque**

énergétique excité. Le nombre de photons absorbés dans ce rayonnement incident peut être relié à la concentration de l'élément à doser par relation :  $A = KC$  ( $A$ = absorbance,  $C$ = concentration de l'élément considéré dans la solution à analyser,  $K$ = coefficient spécifique à chaque élément). On peut déterminer la concentration d'un métal en comparant les quantités de rayonnement absorbé par ce dernier avec la quantité de radiation absorbée par les standards. La Lecture affichée sur l'instrument peut être calibrée de façon à lire les concentrations de l'échantillon directement (Brokaert, 2005).

**3.2.2 Caractéristiques du spectromètre à la flamme Agilent 240 FS**

Le spectromètre à la flamme utilisé est un Agilent Technologies 240FS Series AA programmé par un ordinateur avec un logiciel Spectre AA version 5.2 et comprend :

Une source d'émission primaire.

Une tourelle qui peut contenir huit lampes (UltrAA) pour un dosage successif.

Une source d'atomisation constitue la cellule d'absorption.

Un sélecteur de radiations monochromateur.

La solution contenant les ions à doser est aspirée à débit constant dans un nébuliseur pneumatique. La solution est ainsi envoyée sous la forme d'un brouillard dans une flamme (acétylène/air, ou acétylène/air/protoxyde d'azote). Les ions en solution vont alors passer à l'état d'atome. On envoie sur la flamme un rayonnement de longueur d'onde spécifique de l'atome à analyser. On mesure l'absorbance, celle-ci étant proportionnelle à la quantité d'atome dans la flamme donc d'ion en solution. Cela permet le dosage de l'analyte (après avoir réalisé une courbe de calibration).



**Figure 13 :** Spectrométrie d'absorption atomique SAA (C.R.A.P.C).



Tableau07 : Conditions opératoires du dosage des métaux lourds.

| Paramètres                  | Ni            | Cd            | Pb            | Cu            | Zn            |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Longueur d'onde (nm)        | 232,0         | 228,8         | 217,0         | 324,7         | 213,9         |
| Fente nm                    | 0, 2          | 0.5           | 1,0           | 0,5           | 1,0           |
| Temps de lecture(s)         | 5,0           | 4,0           | 4,0           | 4,0           | 4,0           |
| Air-Acétylène               | Air-Acétylène | Air-Acétylène | Air-Acétylène | Air-Acétylène | Air-Acétylène |
| Limite de détection (µg/mL) | 0,1-20        | 0,023-30      | 0,1-30        | 0,03-10       | 0,1-30        |

Les résultats sont exprimés en µg/g et sont obtenus à partir d'une dose d'essai de 0,5g, pour les échantillons des huiles de *Pistacia lentiscus* et les sols.

#### 4. Analyse du sol de *Pistacia lentiscus* par spectrométrie de fluorescence de rayon X (FRX)

Afin de mieux connaître la constitution des sols (Akbouet Elkala) en éléments chimiques, nous avons opté de l'analyser par spectrométrie de fluorescence de rayon X.

##### 4.1 Caractéristiques de la spectrométrie de fluorescence de rayon X

La spectrométrie de fluorescence Rigaku ZSX Primus II délivre la détermination quantitative rapide des éléments atomiques majeurs et mineurs, du béryllium (Be) à l'Uranium (U), dans une grande variété de types d'échantillons avec les normes minimales.

Le Primus ZSX dispose d'un tube de 30 microns, mince fenêtre pour la détection des limites de l'élément lumière exceptionnelle (faible Z). Combiné avec le logiciel cartographique performant pour détecter l'homogénéité et les inclusions. Le ZSX Primus permet une analyse analytique détaillée des échantillons qui est difficilement obtenue à partir d'autres méthodes. Les erreurs d'échantillonnage dans les matériaux hétérogènes sont minimisées grâce à une analyse multispot.

##### 4.1.1 Méthode de préparation de l'échantillon

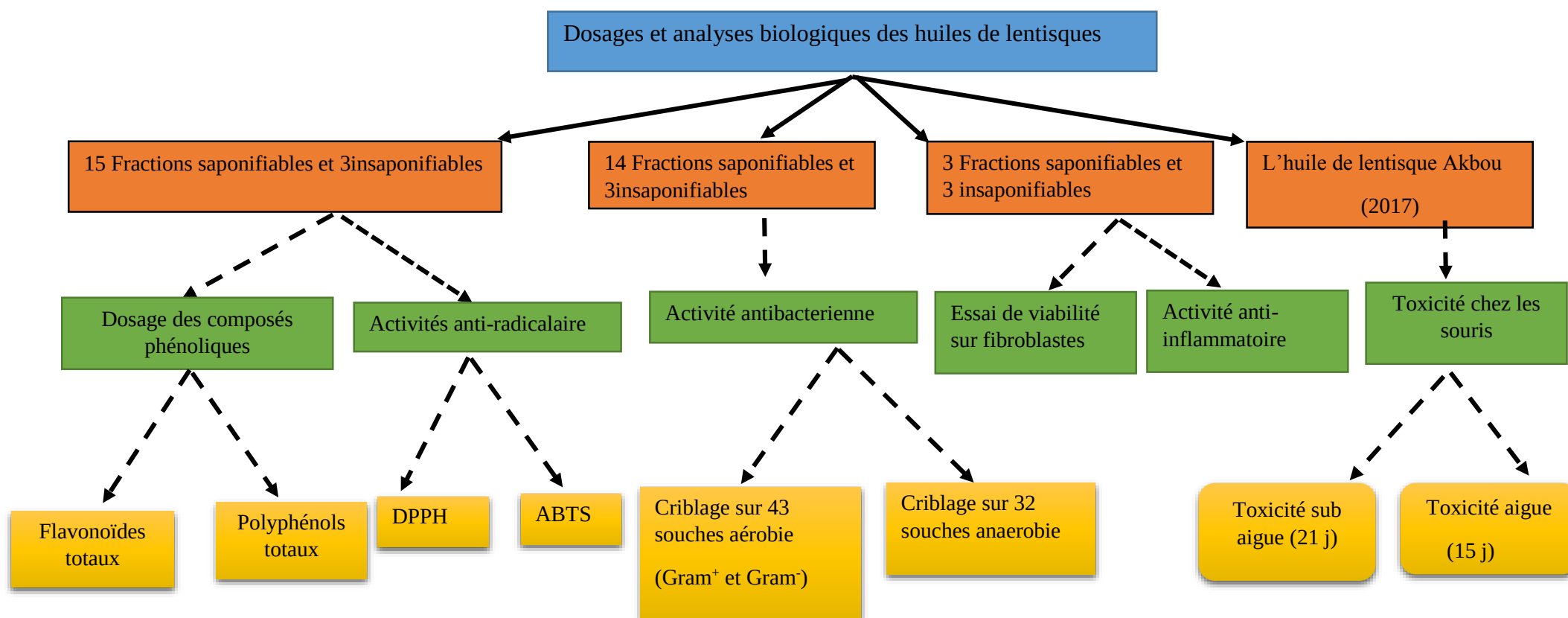
A partir d'un prélèvement de 10g de sol fin (50 µm) auquel, on forme une pastille de 32 mm à l'aide d'une pastilleuse (Specac). Cette dernière, applique une pression mécanique de 6 tonnes pendant une minute. Ensuite, on met la pastille préparée dans un porte échantillon pour les faire passer dans la chambre de bombardement de FRX.



## Chapitre III :

## Chapitre III : Analyses biologiques des huiles de lentisque

Les différents dosages et activités biologiques des huiles de lentisques (Fractions saponifiables et insaponifiables), sont regroupés dans le schéma en-dessous.



## 1. Dosage des composés phénoliques et activité anti-radicalaire

Les composés phénoliques possèdent un pouvoir antioxydant, grâce à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes (Nijveldt, 2001).

### 1.1 Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits de l'insaponifiable et de l'huile de lentisque est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Clarcke et ses collaborateurs 2013. Brièvement, dans une plaque à 96 puits, 25 µL de solution à 4 mg/mL ont été mélangés avec 125 µL de réactif (F-C) fraîchement dilué 1/10 avec de l'eau distillée. Après 5 min, 100 µL de la solution ont été mélangés avec 100 µL de la solution à 7,5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. Les plaques ont été incubées pendant 30 minutes dans l'obscurité et l'absorbance a été mesurée à 650 nm. Le blanc a été utilisé pour remplacer l'échantillon par 25 µL de DMSO et un autre blanc pour remplacer le réactif FolinCiocalteu par 125 µL d'H<sub>2</sub>O. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

### 1.2 Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bampouli et al., 2015) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes totaux. En bref, dans une plaque à 96 puits, 50 µL de l'extrait à 4 mg / mL a été mélangé avec 160 µL d'EtOH, 20 µL de 1,8% d'AlCl<sub>3</sub> et 20 µL de 0,08% d'acétate de sodium CH<sub>3</sub>COONa en solution dans l'eau permutée. Ensuite, les plaques ont été maintenues à température ambiante pendant 40 min et l'absorbance a été mesurée à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

## 2. Activité anti-radicalaire de l'huile et de l'insaponifiable

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme dispose de systèmes efficaces de protection : les antioxydants, définis comme des substances capables, à des concentrations relativement faibles, de retarder ou d'inhiber l'oxydation de substrats (Halliwell, 1999) Les antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits des huiles de lentisques et des insaponifiables a été réalisée selon deux méthodes : piégeage du radical libre DPPH, et piégeage du radical 2,2'-azino-bis (acide 3-

éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS). Les insaponifiables ont été solubilisés dans le DMSO et les huiles ont été testées directement.

### 2.1 Activité anti-radicalaire DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (2,2- diphényl-picrylhydrazyle) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Clarcke et al (2013).

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

Brièvement le réactif 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a été préparé fraîchement juste avant le test, comme suit : 12,4 mg de DPPH dans 100 mL d'éthanol. Dans chaque puits, on a placé 10 µL de solution d'échantillon (extrait à 4 mg / mL de concentration initiale, 200µg / mL de concentration finale dans le puits) avec 190 µL de solution de DPPH.

Un contrôle négatif (10 µL de DMSO) et un contrôle positif (10µl d'acide gallique à une concentration initiale de 100 µL/ mg, concentration finale de 5 µg / mL) dans les puits ont été préparés. Un blanc de chaque échantillon a également été préparé. Les plaques ont été incubées pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ DPPH piégeage} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs du blanc contrôle}) - (\text{Abs de l'échantillon} - \text{Abs blanc de l'échantillon})}{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs blanc du contrôle})}$$

### 2.2 Activité antiradicalaire ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS•+ a été déterminée selon le procédé de Clarcke et al (2013).

Le réactif acide 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) a été traité un jour avant le dosage comme suit :

10 mL de solution ABTS à 7 mM (36,02 mg par 10 mL de H<sub>2</sub>O) ont été mélangés à 164 µL de persulfate de potassium 140 mM :37,84 mg dans 1 mL de H<sub>2</sub>O) et conservés pendant une nuit (environ 16 h). La solution finale, après stockage, a été diluée dans H<sub>2</sub>O (1 : 20) jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 ± 0,02 (100 µL de solution ABTS plus 50 µL de DMSO). Dans chaque plaque, on a placé 100 µL de solution ABTS finale et 50 µL d'échantillon (extrait à 600 µg / mL en concentration initiale, concentration finale de 200 µg / mL dans le puits).

Le contrôle négatif a été préparé en remplaçant 50 µL de solution d'échantillon par 50 µL de DMSO. Un témoin positif a été également préparé avec 50 µL de solution de Trolox à 25 µg/mL (concentration finale dans le puits : environ 8 µg / mL avec 50% d'efficacité). Un blanc de chaque échantillon a également été préparé.

Les plaques ont été incubées à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. L'absorbance a été mesurée à 734 nm. La capacité de piégeage de L'ABTS•+ a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ABTSpiégeage} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs blanc du contrôle}) - (\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc d'échantillon})}{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs blanc du contrôle})} \times 100$$

### 3. Essai de viabilité sur fibroblastes dermiques humains normaux-test à l'Alamar Blue (rézaurine)

Cette partie a été réalisée dans le cadre d'un stage d'une semaine réalisé au laboratoire de Vivacell (Denzlingen, Allemagne), dirigé par le Dr B. Fiebich et sous l'encadrement du Dr T. Rose.

Des fibroblastes dermiques humains normaux ont été cultivés dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (Sigma, Royaume-Uni) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Biowest Ltd., Royaume-Uni), 2 % de L-glutamine (Sigma), 100 U/mL de pénicilline, (Sigma) et 100 g/mL de streptomycine (Sigma). Après avoir compté le nombre de cellules dans un compteur de particules (Euro Diagnostics, Krefeld, Allemagne), les fibroblastes dermiques humains ont étéensemencés dans des plaques de 96 puits, à une densité de 8 000 cellules/puits et incubés à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> pendant la nuit.

#### 3.1 Préparation des solutions mères

Les solutions mères des extraits des insaponifiables et des huiles de fruit de lentisque (Blida, Akbou et ElKala) ont été préparées afin d'obtenir une concentration de 10mg/mL. Les insaponifiables ont été solubilisés dans le DMSO à partir de la solution mère.

##### 3.1.1 Préparation de la solution NaF (contrôle positif)

25 mg de NaF sont solubilisés dans 1 mL d'eau. Ensuite, une série de dilution de la solution mère est préparée : 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL.

Les cellules ont été incubées soit avec du fluorure de sodium (NaF 250 µg/mL, contrôle positif), ou seulement avec du DMSO (contrôle négatif), ou bien avec les dilutions suivantes des huiles ou insaponifiables : 0,1 ; 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL.

L'expérience a été menée en quadruplés. Après 24 heures d'incubation, 10  $\mu$ L AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été ajoutés à chaque puits. Après 2 heures, la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence (Polarstar, BMG, Offenbug) en utilisant les paramètres de filtre 544 EX nm/590 EM nm. La quantité de fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et correspond à l'activité métabolique des cellules. Les cellules endommagées et non viables ont une activité métabolique innée plus faible et génèrent ainsi un signal proportionnellement plus faible que les cellules saines. L'ingrédient actif d'AlamarBlue® (resazurin) est un composé non toxique, perméable aux cellules, de couleur bleue et pratiquement non fluorescent.

En entrant dans les cellules, la résazurine est réduite à la résorufine, qui produit une fluorescence rouge très brillante. Les cellules viables convertissent continuellement la résazurine en résorufine, générant ainsi une mesure quantitative de la viabilité et de la cytotoxicité (Rampersad, 2012). Sous la sorbonne sous atmosphère stérile, dans une plaque de 96 puits de marque Falcon (Ref 353072), on place en premier lieu le milieu sans cellule, le milieu avec cellules et 1  $\mu$ L de DMSO à 1% (contrôle négatif), le milieu avec cellules et 1  $\mu$ L de NaF à 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL et 250  $\mu$ g/mL (contrôles positifs), le reste de la plaque est utilisé pour mettre le milieu avec cellules et 1  $\mu$ L des extraits à tester (huiles ou insaponifiables) avec les concentrations suivantes : 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 0,1  $\mu$ g/mL. La plaque est ensuite incubée pendant 24h dans l'étuve réglée à 37°C.

### **3.2 Activité anti-inflammatoire**

#### **3.2.1 Isolement des monocytes**

Dans un tube à hémolyse, on met du sang et une solution «Anprotec lymphocyte separation » (AC-AF-0018) pour la séparation des lymphocytes en quantité équivalente. Ensuite, on met le tube dans la centrifugeuse pendant 50 min à 2900 rpm. Après, on récupère le surnagent qui contient les monocytes et on ajoute DPBS, et on termine par une centrifugation pendant 10mn. Les monocytes sont mis dans la solution de RPMI (Medium 1640(x)) à 1% et 10%, ce milieu de culture des monocytes contient différentes solutions (Serum humain, vitamines) pour développer les monocytes.

#### **3.2.2 Stimulation des monocytes par LPS**

Deux flacons contenant 25 mL (suspension de monocyte) ont été préparés, puis on ajoute 100 mL de la solution RPMI. Dans une plaque de 24 puits, on met 1 mL du mélange RPMI, puis incubé dans l'étuve pendant une heure à 37°C.

### **3.2.3 Protocole Elisa**

La quantification de la production de cytokines pro-inflammatoires a été effectuée à l'aide des Kits ELISA achetés chez Immuno Tools (Friesoythe, Allemagne). Brièvement, dans des plaques de 96 puits préalablement préparées, on transfère 100 µL d'anticorps anti-cytokine (IL-6 ou TNFα) qui vont capturer des anticorps préalablement dilués (1:100) et incubés pendant la nuit à température ambiante. Ensuite, la solution a été enlevée et 300 µL de mélange tampon bloquant (PBS avec 2 % de BSA et 0,05 % de Tween20) sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 1 h à température ambiante. Après, la solution a été retirée des plaques et 100 µL d'échantillons (dilués dans une solution tampon de blocage dans 1:2 pour l'IL-6 et 1:20 pour la quantification du TNFα) et des étalons (2000-62,5 pg/mL de TNFα et 500-15,6 pg/mL de cytokines IL-6) ont été ajoutés. Les plaques ont été laissées pendant 2 h à température ambiante. Elles ont été lavées 5 fois (PBS avec 0,05 % de Tween20) et le tampon enlevé. 100 µL de solution d'anticorps anti-cytokine de détection (1:100 dilué) ont été ajoutés dans chaque puit.

Les plaques ont été incubées pendant 2 h, en les secouant à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées 5 fois et le tampon a été enlevé. 100 µL de solution de poly-HRP-streptavidin (1:1000 dilué) ont été ajoutés dans chaque puit 30 min à température ambiante. Les plaques ont été lavées de nouveau 5 fois, le tampon a été enlevé et 100 µL de solution de substrat (tampon PBS de 12 mL avec 200 µL de TMB à 6 mg/mL et 12 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 %) ont été ajoutés et incubés à l'obscurité pendant 20 min, puis 50 µL d'une solution aqueuse 2M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés dans chaque puit pour arrêter la réaction. L'absorbance a été enregistrée à 450 nm et les résultats exprimés en pourcentage de cytokine détectée par rapport aux témoins.

## **4. Activité antibactérienne**

Cette activité a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie à la faculté de Pharmacie (Paris -Descartes) sous la direction de Dr Marylin Lesco et l'encadrement du Dr Sergio Ortiz.

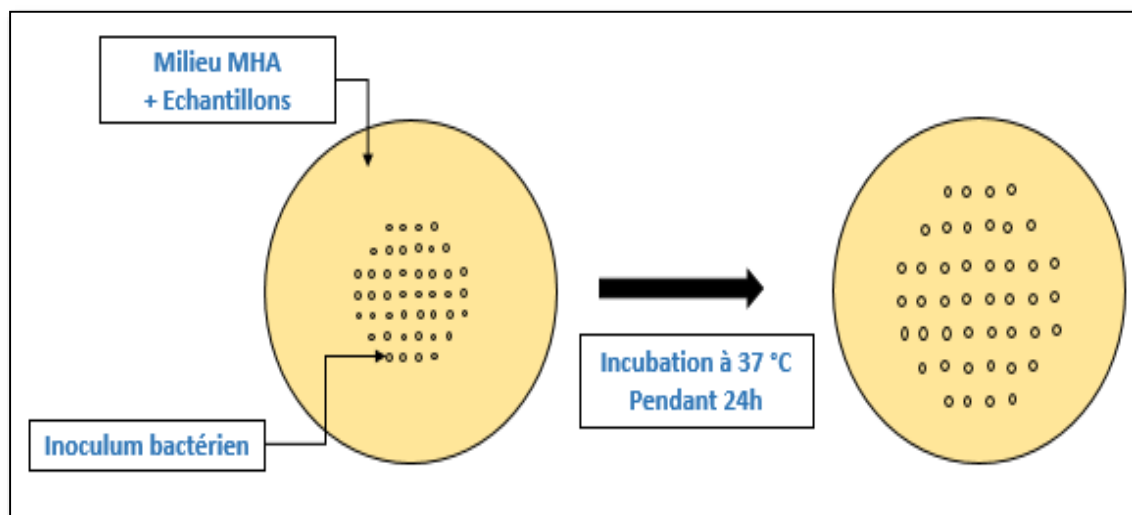
### **4.1 Souches bactériennes et milieux de culture**

Dans cette étude, nous avons testé l'effet des huiles de lentisque et des insaponifiables (Elkala, Akbou, Blida) sur différentes souches bactériennes de référence (American Type Culture Collection (ATCC) et Collection de l'Institut Pasteur (CIP) ou bien des isolats cliniques de la collection du Dr Lecso.

Au départ, un test de criblage a été utilisé pour sélectionner les extraits actifs en utilisant l'ensemble des 52 souches bactériennes qui appartiennent aux différents genres de bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> en milieu aérobie (Annexe1), et sur un panel de bactéries anaérobies.

- **Méthode d'incorporation**

La méthode d'incorporation (Figure 14) a été utilisée pour évaluer qualitativement l'activité antibactérienne. À partir d'une culture bactérienne jeune de 18 – 24 heures sur un milieu liquide Muller-Hinton Broth (MHB). Les boîtes de Pétri ont été préparées ainsi : on place 18 mL du milieu Muller-Hinton (MHA), 250  $\mu$ L de l'échantillon solubilisé dans le DMSO et 1,75 mL d'eau MilliQ pour compléter le volume à 20 mL. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 10 minutes dans l'étuve à 37°C. Les inoculums pour chaque souche bactérienne sont préparés dans une plaque 96 puits de manière à obtenir  $10^7$  bactéries/mL. La plaque est ensuite placée dans l'inoculateur de steers multipoint bien stérilisé. 1  $\mu$ L de l'inoculum ( $10^8$  UFC/mL) a été inoculé sur les différentes boîtes de Pétri l'une après l'autre. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. L'ofloxacin est utilisé comme contrôle positif, le DMSO et l'eau milliQ comme contrôle négatif. La lecture des panels aérobie et anaérobie se fait après 24 heures, et après 48 heures pour *Propionibacterium acnes* (Panel anaérobie).



**Figure 14 :** Principe de la méthode d'incorporation.

## 5. Toxicité chez les souris

L'étude toxicologique a été réalisée au sein du laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques de l'université Ferhat Abbas, Sétif 1 (Algérie).

Les souris proviennent de l'institut Pasteur d'Alger, elles pèsent entre 29 et 31g. Les souris sont mises dans des cages pour une période d'adaptation (2 semaines) avant être utilisés dans l'expérience, pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau, ils sont maintenus dans une animalerie à une température ambiante, à un éclairage naturel de

lumière/obscurité 12h/12h.



**Figure 15 :** Souris pendant la période d'adaptation.

### 5.1 Toxicité aiguë de l'huile de lentisque

L'évaluation de la toxicité aiguë de l'huile de lentisque a été menée selon la procédure décrite dans la ligne directrice 420 de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (**OCDE420, 2008**), qui permet de déterminer les effets nuisibles d'un produit sur le poids corporel et sur les organes notamment le foie et les reins.

Dans cette étude, des souris *SwissAlbinos* mâles et femelles pesant entre 25 et 30 g ont été utilisées. L'huile a été administrée par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique, à deux doses uniques de 2g/kg et 5 g/kg. Les animaux ont été mis à jeun 12 h avant l'administration avec un accès libre à l'eau. 3 groupes d'animaux ont été formés contenant chacun 4 souris de chaque sexe, et sont répartis de la manière suivante :

- Groupe témoin:reçoivent uniquement de l'eau distillée.
- Groupe I: reçoivent 2g/kg de l'huile de lentisque.
- Groupe II : reçoivent 5g/kg le l'huile de lentisque.

#### 5.1.1 Observation

Après l'administration de l'huile de lentisque, les souris sont surveillées de près durant la première heure, puis à la 6<sup>ème</sup>h et 24<sup>ème</sup> h et ensuite chaque jour pendant les 14 jours qui suivent l'administration. Les observations sont effectuées afin de noter tous changements dans le comportement des animaux et l'apparition de troubles pathologiques tels que des convulsions, tremblements, l'altération de l'activité locomotrice (hypoactivité ou hyperactivité), altération des activités physiologiques dont des effets sur la respiration, sur le système nerveux (diminution de l'activité sensorielle) et des effets sur le système gastro-intestinal (diarrhées).De



plus, le taux de mortalité a été rapporté quotidiennement.

### **5.1.2 Poids corporel**

Afin d'évaluer l'éventuel effet de l'huile de lentisque sur la prise de poids, les animaux des différents groupes d'expérimentation ont été pesés aux jours suivants : 1<sup>er</sup>, 5<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour.

### **5.1.3 Dissection et le prélèvement du sang**

Après les 14 jours d'observation, les animaux préalablement à jeun, ont été soumis à un prélèvement sanguin qui s'est fait au niveau du sinus rétro-orbitaire. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés, centrifugé à 3000 T/min pendant 20 min. Le plasma est ensuite récupéré dans des tubes eppendorfs, et est conservé au congélateur à une température de -20°C(en attendant les analyses biochimiques).

### **5.1.4 Analyses biochimiques**

Le dosage biochimique des paramètres sanguins (TGO, TGP, GLY, PAL, CHOL) a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie hormonale au centre hospitalier de Sétif, à l'aide d'un appareil analyseur biochimique Architect CI 8200. Le principe du dosage diffère selon le paramètre mesuré.



**Figure 16 :** Prélèvement sanguin des souris pendant le sacrifice.

### **5.1.5 Prélèvement des organes**

Après la dissection des animaux, les organes prélevés (foie, reins, poumons, cœur) ont été bien rincés avec l'eau physiologique froide, après ils ont été pesés et fixés immédiatement dans la solution de formol 10% pour l'analyse histo-pathologique ultérieure.

### **5.2 Toxicités subaiguë de l'huile de lentisque**

Dans le but d'évaluer la toxicité subaiguë de l'huile de lentisque, 12 souris mâles et 12 femelles de souche *SwissAlbino* ont été utilisées.

Les animaux ont été répartis en 3 groupes dont chacun contient 4 souris mâles et 4 souris femelles. Le premier groupe étant le groupe témoin reçoit uniquement de l'eau distillée. Le deuxième groupe intitulé groupe D1 reçoit 2 g/kg d'huile de lentisque (Akbou) pendant 21 jours. Le troisième groupe intitulé groupe D2 reçoit 5 g/kg d'huile de lentisque (Akbou) pendant 21 jours.

Les souris ont été pesées quotidiennement (1<sup>er</sup> j, 7<sup>ème</sup> j, 14<sup>ème</sup> j et 21<sup>ème</sup> j). Après 21 jours de traitement, les souris ont été sacrifiées, le sang a été prélevé dans des tubes héparines, centrifugé pour obtenir le plasma qui permettra l'analyse biochimique. Comme pour la toxicité aiguë, un dosage des paramètres sanguins (TGO, TGP, GLY, PAL, CHOL) a été réalisé également.

### **5.3 Analyse statistique des résultats**

Nous avons employé un test statistique paramétrique par le biais du test de student, en vue de comparer les moyennes tout en vérifiant les critères de normalité. Les résultats ont été exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard moyenne. Dans tous les cas, les différences dont les valeurs de P inférieures à la valeur 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives. L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel Graph Pad Prism version 8.0.1.

Les différences sont considérées comme :

- Significatives lorsque ( $P \leq 0,05$ ).
- Hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).
- Très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ). Avec P : Seuil de signification.

# **TROISIEME PARTIE :**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **Chapitre I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur les échantillons collectés, dans un objectif d'une part, d'identifier les différences entre ces derniers, sous l'influence d'un nombre de facteurs (région, méthode d'extraction), et d'autre part d'identifier des marqueurs de qualité.

L'ensemble des analyses réalisées, dans le cadre de cette thèse en cotutelle entre l'Algérie et la France, ont été effectuées d'une part, dans le laboratoire de CiTCOM –UMR 8038, équipe Produits Naturels Analyses et Synthèse, Faculté de Pharmacie, Université de Paris (France), et d'autre part dans les laboratoires algériens :

Le laboratoire de Phytothérapie Appliquée aux Maladies Chroniques (Université de Sétif 1).

Les laboratoires du Centre de Recherche des Analyses Physicochimiques (C.R.A.P.C) à Bousmail, Tipaza.

### **1. Étude de la composition de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L.**

Pour les différentes analyses envisagées, une approche déréplicative a été appliquée. La déréplication consiste à rechercher dans un mélange complexe (extraits bruts ou premières fractions de séparation) la présence de composés connus d'après leurs caractéristiques physicochimiques.

L'huile de fruit de lentisque est constituée, comme d'autres huiles végétales, de deux fractions, une fraction saponifiable (composée d'acides gras et triglycérides) et l'autre insaponifiable. Leur analyse a donc été envisagée de façon distincte.

#### **1.1 Étude de la fraction saponifiable**

L'étude de ces deux fractions a été envisagée par d'une part par analyse par GC-FID et d'autre part par déréplication par GC-MS, méthode largement employée pour l'analyse de la composition en acide gras d'une huile. Ces méthodes de chromatographie en phase gazeuse requièrent cependant une étape préliminaire de dérivation, c'est-à-dire de transformation chimique en composés identifiants. Dans le cas des huiles, les acides gras peuvent être aisément transformés en dérivés silylés ou méthylés, volatils. Dans le cas de la GC-FID, un mélange d'acides gras méthylés (standards) a été utilisé pour l'identification des acides gras. Pour la GC-MS, les bases de données, telles que la base de données NIST comportent la quasi-totalité des acides gras silylés ou méthylés existant, ainsi la comparaison des composés analysés avec ceux de la base de données permet d'identifier de manière assez certaine la nature des

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

acides gras. Il faut noter cependant que la position et la stéréochimie des doubles liaisons restent incertaines.

**1.1.1 Analyse par GC-FID après formation des esters méthyliques**

Les échantillons des huiles de lentisque représentés dans le Tableau ci-dessous, ont été estérifiés avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID).

Pour rappel, l'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un appareil CG (Master GC-Dani, France) avec une colonne HP5 (5% Phenyl-Hexyl) muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ayant les caractéristiques suivantes : longueur de 100 m, diamètre interne de 0,25 mm, épaisseur du film de 0,2  $\mu\text{m}$ . Les conditions chromatographiques étaient :

- Gaz vecteur : Azote avec un débit de 1 mL/min.
- Température de l'injecteur : 250 °C.
- température du détecteur FID : 280°C.
- Volume injection : 1  $\mu\text{L}$  splitless.

**Tableau 08** : Programmation du four de la GC-FID.

| T (°C) | Temps (min) | Rate °C/min |
|--------|-------------|-------------|
| 70     | 5           | 10          |
| 130    | 2           | 30          |
| 220    | 4           | 10,00       |
| 280    | 7           | 0,00        |

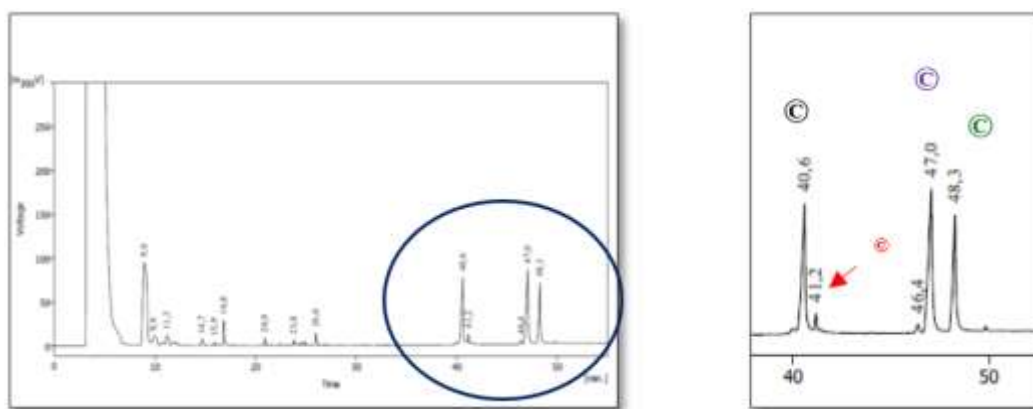
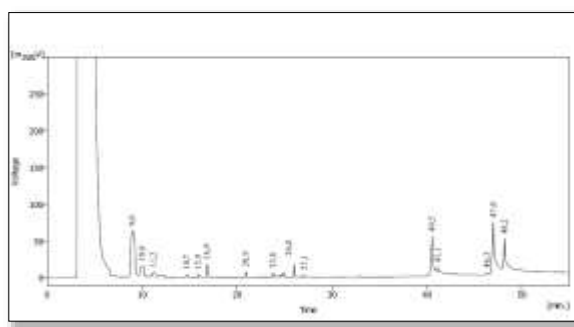
Les esters méthyliques ont été identifiés par comparaison avec des standards commerciaux d'esters méthyliques (F.A.M.E.Mix C8-C24, 100mg, N CRM18918).

**Tableau 09 :** Identification des échantillons des huiles de fruit de *Pistacia lentiscus*.

| Origine des huiles de lentisque | Provenance des huiles de lentisque  | Code |
|---------------------------------|-------------------------------------|------|
| Huiles des coopératives         | Coopérative Bouanani                | 1    |
|                                 | Coopérative Ladjoudane (Akbou 2015) | 2    |
|                                 | Coopérative Ladjoudane (Akbou 2017) | 3    |
| Huiles artisanales              | Settara                             | 4    |
|                                 | Ouled rabah                         | 5    |
|                                 | Sidi abdelaziz                      | 6    |
|                                 | El kala                             | 7    |
|                                 | Blida                               | 8    |
| Huiles commerciales             | El wafia                            | 9    |
|                                 | Zazia                               | 10   |
|                                 | Belkis                              | 11   |
|                                 | Zahretatibaa                        | 12   |
|                                 | El fourssane                        | 13   |
|                                 | Sultane                             | 14   |
|                                 | El milia                            | 15   |

➤ **Chromatogrammes des huiles de lentisque des coopératives**

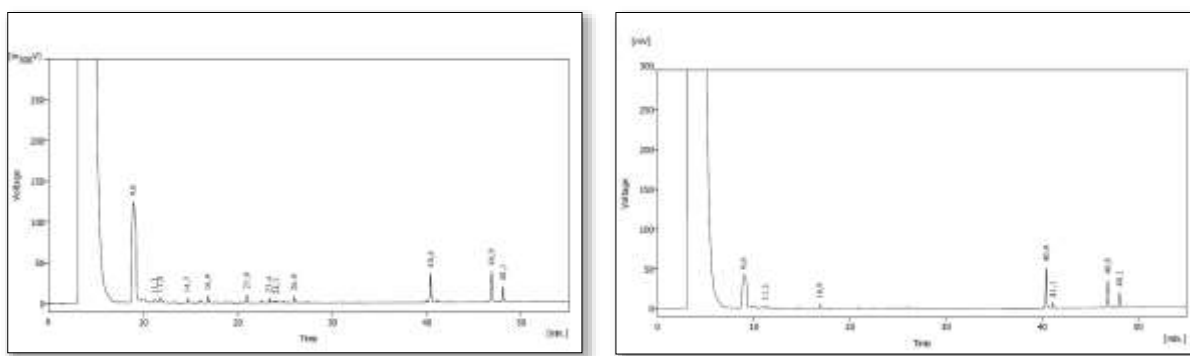
Les profils chromatographiques des huiles analysées par GC-FID sont présentés dans les figures 17 et 18.

**Figure 17 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Bouanani (1).

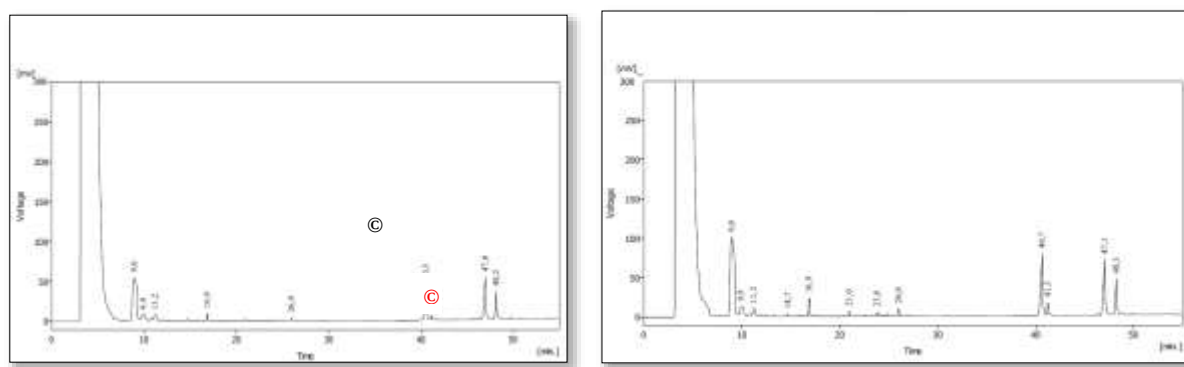
**Figure 18 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque d'Akbou 2015(2) et akbou 2017(3) respectivement.

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

## ➤ Chromatogrammes des huiles de lentisque artisanales



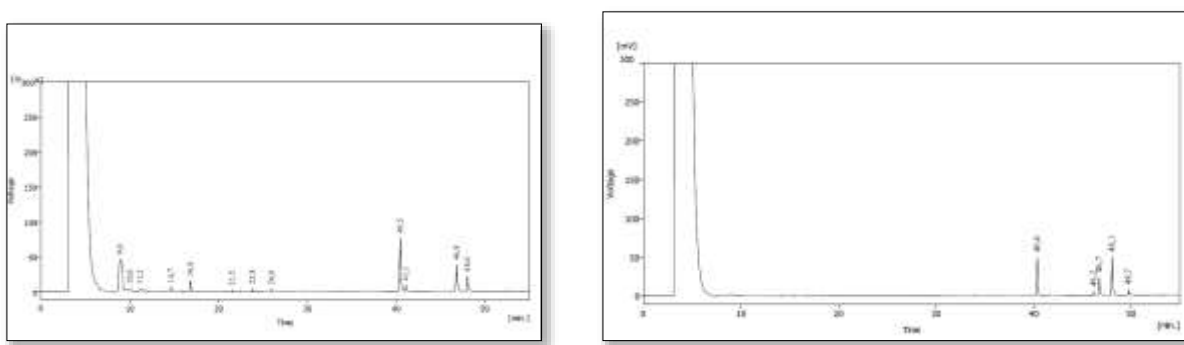
**Figure 19 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Blida(8) et de Settara(4).



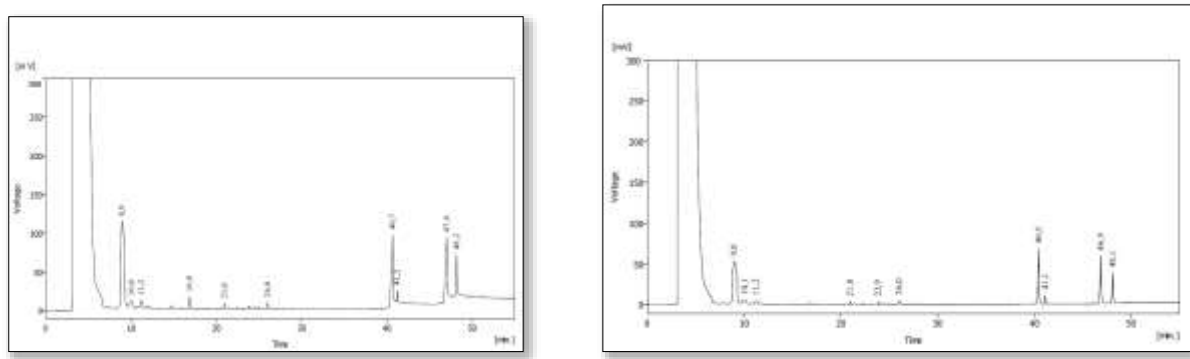
**Figure 20 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque El Kala(7) et Sidi Abdelaziz (6).

## ➤ Chromatogrammes des huiles de lentisque commerciales

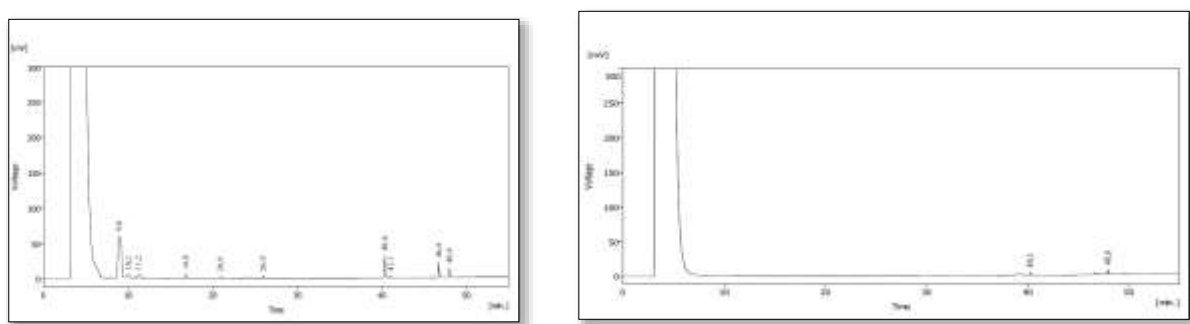
Les huiles de lentisques commerciales analysées par GC-FID sont présentées



**Figure 21 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Belkis(11) et Elwafia(9).



**Figure 22 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Elmilia(15) et sultane(14).



**Figure 23 :** Profils chromatographiques en GC-FID de l'huile de lentisque Z. Atebaa (12) et Zazia(10)

D'après l'analyse des résultats des chromatogrammes obtenus par l'analyse GC-FID, on remarque que la plupart des huiles de lentisque présentent des profils similaires. Cependant, l'intégration des signaux n'a pas été effectuée correctement et il n'est donc pas possible de préciser les pourcentages d'aires des principaux acides gras identifiés. On peut cependant noter que les pics des principaux acides gras présents sont identifiés à partir de 30 minutes et qu'ils correspondent aux esters des acides palmitique (©), palmitoléique (©), stéarique (©).oléique (©) et linoléique (©).



## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

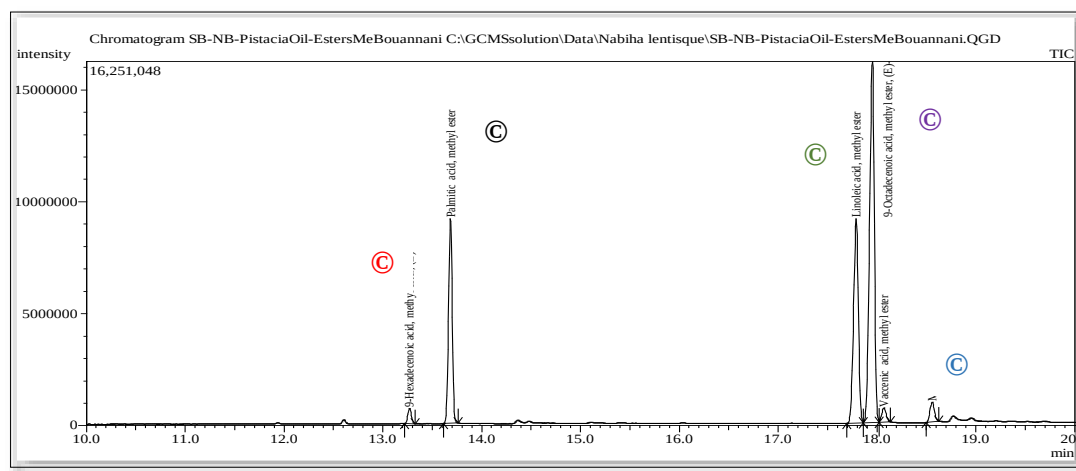
Tableau 10 : Temps de rétention et aire des principaux pics identifiés en GC-FID.

| Tr (min) | Standards             | (1)       | (2)       | (3)       | (4)     | (6)       | (7)     | (8)     | (9)   | (10) | (11)    | (12)    | (14)   | (15)      |
|----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|---------|-------|------|---------|---------|--------|-----------|
| 40,9     | Methyl palmitate ©    | 1,054,882 | 1,818,163 | -         | -       | 1,093,335 | 501,616 | -       | -     | -    | -       | -       | -      | 1,363,566 |
| 41,5     | Methyl palmitoleate © | -         | 357,763   | -         | -       | 169,96    | 62,885  | -       | 5,229 | -    | -       | -       | -      | 537,774   |
| 46,5     | Methyl stearate ©     | -         | -         | -         | -       | -         | 14,21   | 10,012  | -     | -    | -       | 174,231 | 10,673 | -         |
| 47,1     | Methyl oleate ©       | 1256,21   | 1604,9    | 1486092   | -       | 996,092   | -       | -       | -     | -    | -       | -       | -      | 1,558,286 |
| 48,2     | Methyl linoleate ©    | 839,602   | 734,13    | 1,209,264 | 133,126 | 509,097   | 362,954 | 140,704 | -     | -    | 198,524 | -       | -      | 1,596,843 |

## 1.1.2 Déréplication par analyse GC-MS après formation des esters méthyliques

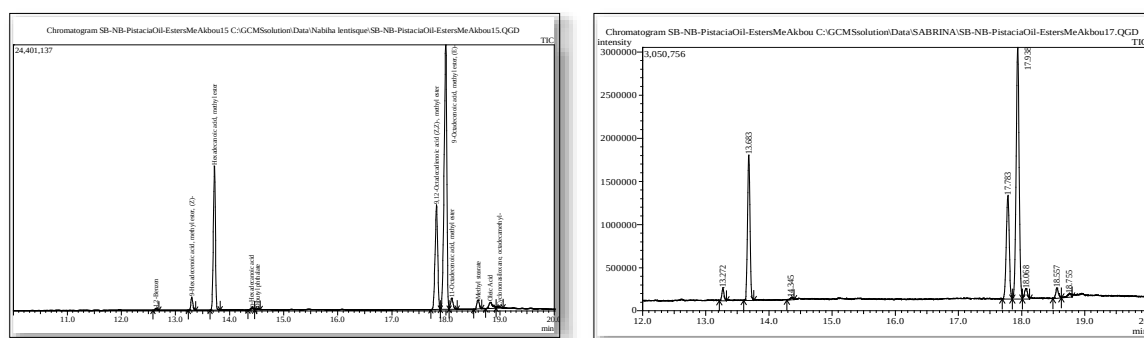
Compte-tenu des résultats non interprétables de la GC-FID et devant l'impossibilité de récupérer les données afin de refaire une intégration des chromatogrammes, une analyse par GC-MS a été envisagée avec les échantillons méthylés analysés en GC-FID.

## ➤ Chromatogrammes des huiles de lentisque des coopératives



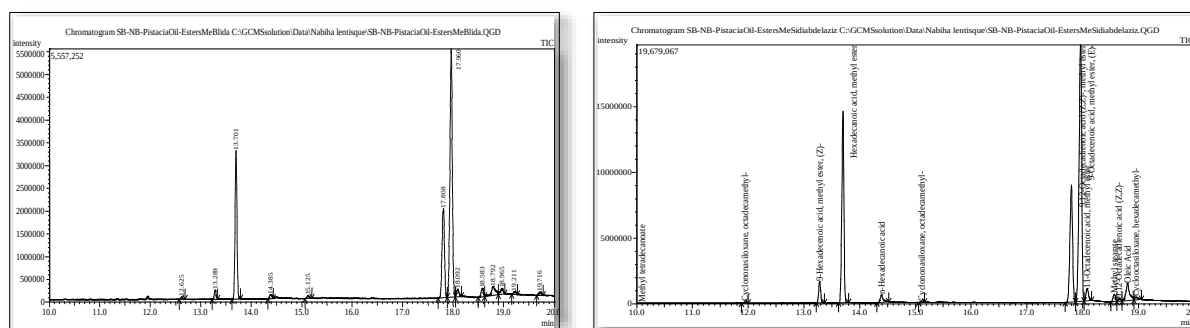
**Figure 24 :** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en ester méthyliques de l'huile de fruit de lentisque Bouanani (1) (10min-20min).acide palmitoléique (© : 13,27 min, palmitique (© : 13,68 min), linoléique (©: 17,79 min) oléique (©: 17,95 min) et stéarique (©: 18,56 min).

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

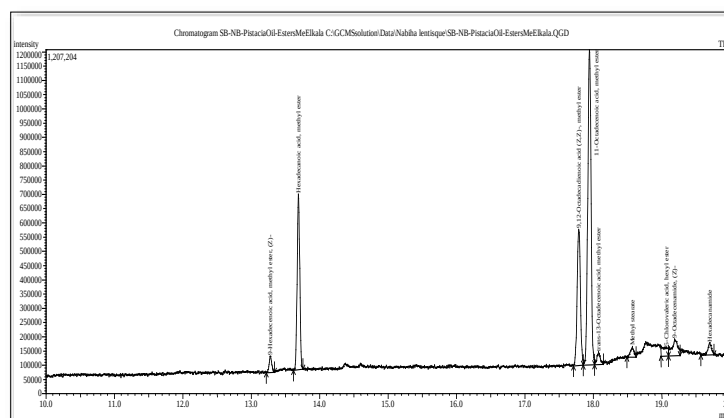


**Figure25 :** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de fruit de lentisque Akbou 2015(2) et Akbou 2017(3) (10min-20min).

➤ **Chromatogrammes des huiles de lentisque artisanales**



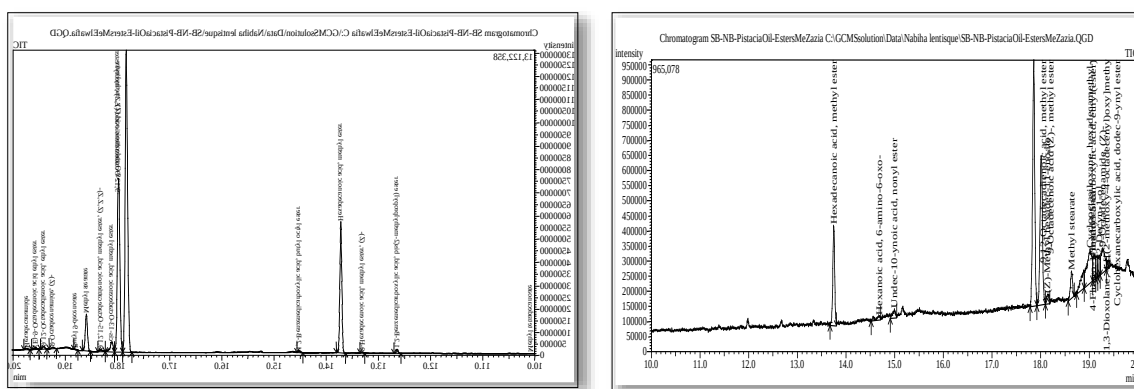
**Figure26:** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisque de Blida et Sidi Abdelaziz (6) (10min-20min).



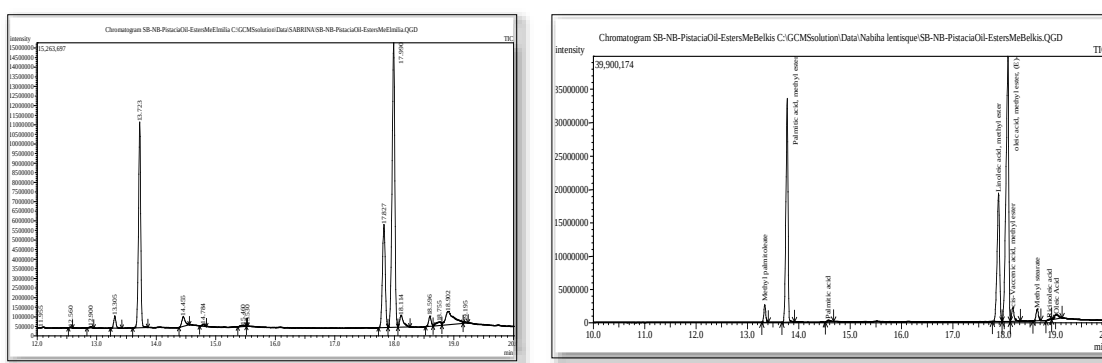
**Figure 27 :** Profil chromatographique en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques de l'huile de lentisque d'Elkala (7) (10min-20min).

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

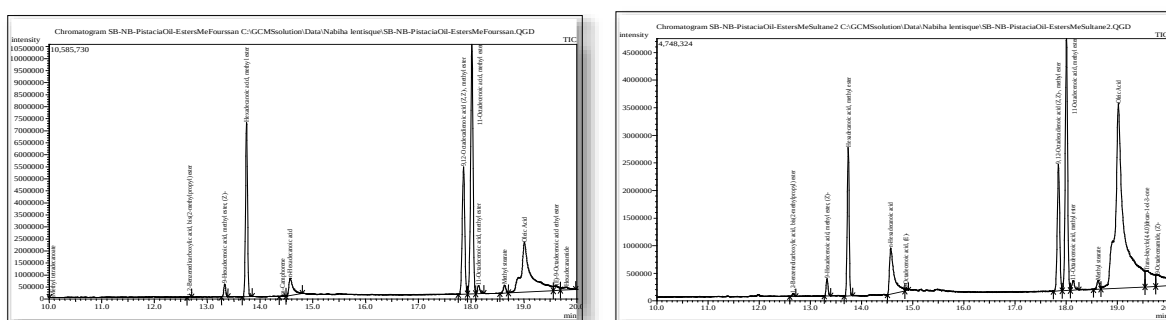
## ➤ Chromatogrammes des huiles de lentisque commerciales



**Figure 28 :** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisque Elwafia (9) et Zazia (10) (10min-20min).



**Figure 29 :** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de fruit de lentisque d'ElMiliaet Belkis(11) (10min-20min).



**Figure 30 :** Profils chromatographiques en GC-MS après estérification des acides en esters méthyliques des huiles de lentisque El Fourssane (13) et Sultane (14) (10min-20min).

Les résultats de l'analyse des huiles de fruit de lentisque par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS ont montré que les huiles de fruits de *Pistacia lentiscus* provenant d'échantillons artisanaux et commerciaux sont principalement constituées d'acide oléique (18:1), d'acide palmitique (16:0), d'acide linoléique (18:2) et d'acide

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

---

palmitoleique (16:1) avec un rapport de 3/2/1/0,1. Ces quatre principaux acides gras représentent plus de 90 % des acides gras (Tableaux 2 et 3). Le principal acide gras (AG) était de l'acide oléique (C18 :1) avec des valeurs très proche de 45,91% et 44,32% respectivement pour les huiles artisanales et commerciales. Ces chiffres sont conformes aux données obtenues à partir d'échantillons tunisiens et algériens (Charef 2008, Mezni 2012, Trabelsi 2012, Djerrou 2014, Benslama 2015) et proche de Boutemine et al.,(2018). Cependant, deux échantillons commerciaux (Elwafia et Zazia) montrent des profils d'acides gras très différents avec un rapport inverse d'acides linoléiques et oléiques, laissant supposer soit une adultération, soit une variation de la composition causée par divers facteurs (mode de préparation, de conservation...). Or, la forte homogénéité de la composition en acides gras décrites dans la littérature, est observée pour des huiles dont la traçabilité est bien connue (producteurs artisanaux, coopératives), laisse plutôt penser que les deux échantillons commerciaux El wafia et Zazia ne contiennent pas ou peu d'huile de lentisque.

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

Tableau 11 : Composés identifiés par GC-MS des huiles de lentisque.

| Les échantillons artisanaux                  |                                                       |       |       |                 |                      |                      |                                |                     |                          |                   |              |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------|-------|-----------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|--------------|
| Composés                                     | % acide gras<br>Echantillons<br>artisanaux<br>moyenne | ET*   | RET** | Bouanani<br>(1) | Akbou<br>2015<br>(2) | Akbou<br>2017<br>(3) | Settara<br>(4)                 | Ouledrabah<br>(5)   | Sidi<br>Abdelaziz<br>(6) | El<br>kala<br>(7) | Blida<br>(8) |
| Acide<br>palmitoléique<br>(16 :1)            | 2,31                                                  | 0,43  | 0,18  | 2,38            | 1,72                 | 2,07                 | 3,03                           | 2,02                | 2,42                     | 2,1               | 2,76         |
| Acide palmitique<br>(16 :0)                  | 30,35                                                 | 4,1   | 0,14  | 31,45           | 23,94                | 30,34                | 34,22                          | 27,15               | 28,09                    | 30,54             | 37,08        |
| Acide <i>n</i> -<br>Hexadecanoïque<br>(16:0) | 0,11                                                  | 0,13  | 1,2   | 0,19            | 0,36                 | 0                    | 0                              | 0,17                | 0,17                     | 0                 | 0            |
| Acide linoléique<br>(18 :2)                  | 16,63                                                 | 2,07  | 0,12  | 15,98           | 21,33                | 17,15                | 15,98                          | 14,52               | 15,24                    | 16,87             | 15,98        |
| Acide oléique<br>(18 :1)                     | 45,91                                                 | 4,88  | 0,11  | 39,67           | 46,33                | 42,83                | 43,96                          | 52,84               | 51,89                    | 48,6              | 41,12        |
| Acide stéarique<br>(18 :0)                   | 3                                                     | 2,16  | 0,72  | 6,12            | 2,73                 | 6,63                 | 2,19                           | 2,2                 | 1,11                     | 1,15              | 1,87         |
| <b>Acides gras<br/>saturés AGS</b>           | <b>33,46</b>                                          | -     | -     | <b>37,76</b>    | <b>27,03</b>         | <b>36,97</b>         | <b>36,41</b>                   | <b>29,52</b>        | <b>29,37</b>             | <b>31,69</b>      | <b>38,95</b> |
| <b>Acides gras<br/>insaturés AGI</b>         | <b>64,85</b>                                          | -     | -     | <b>58,03</b>    | <b>69,38</b>         | <b>62,05</b>         | <b>62,97</b>                   | <b>69,38</b>        | <b>69,55</b>             | <b>67,57</b>      | <b>59,86</b> |
| <b>AGI/AGS</b>                               | <b>1,93</b>                                           | -     | -     | <b>1,54</b>     | <b>2,57</b>          | <b>1,68</b>          | <b>1,73</b>                    | <b>2,35</b>         | <b>2,37</b>              | <b>2,13</b>       | <b>1,54</b>  |
| Les échantillons commerciaux                 |                                                       |       |       |                 |                      |                      |                                |                     |                          |                   |              |
| Composés                                     | % Acide gras<br>Echantillons<br>commerciaux           | ET*   | RET** | El wafia<br>(9) | Zazia<br>(10)        | Belkis<br>(11)       | Zahrat<br>el<br>atibaa<br>(12) | Al fourssan<br>(13) | Sultane<br>(14)          |                   |              |
| Acide<br>palmitoléique<br>(16 :1)            | 1,24                                                  | 0,97  | 0,79  | 0,13            | 0                    | 2,03                 | 1,69                           | 2,31                | 1,28                     |                   |              |
| Acide palmitique<br>(16 :0)                  | 23,3                                                  | 6,25  | 0,27  | 16,41           | 16,25                | 24,78                | 31,58                          | 28,42               | 22,35                    |                   |              |
| Acide <i>n</i> -<br>Hexadecanoïque<br>(16:0) | 0                                                     | 0     | 0     | 0               | 0                    | 0                    | 0                              | 0                   | 0                        |                   |              |
| Acide linoléique<br>(18 :2)                  | 26,88                                                 | 15,11 | 0,56  | 47,46           | 44,95                | 15,46                | 17,37                          | 15,35               | 20,69                    |                   |              |
| Acide oléique<br>18 :1                       | 44,32                                                 | 11,37 | 0,26  | 28,72           | 31,35                | 54,62                | 47,58                          | 50,13               | 53,5                     |                   |              |
| Acide stéarique<br>(18 :0)                   | 2,98                                                  | 1,76  | 0,59  | 5,28            | 5,16                 | 2,14                 | 1,3                            | 2,15                | 1,84                     |                   |              |
| <b>Acides gras<br/>saturés AGS</b>           | <b>26,28</b>                                          | -     | -     | <b>21,69</b>    | <b>21,41</b>         | <b>26,92</b>         | <b>32,88</b>                   | <b>30,57</b>        | <b>24,19</b>             |                   |              |

\* ET : Ecart type

\*\* RET : % Ecart type

## 1.1.3 Identification des composés volatils

Le résultat de l'analyse GC-MS réalisée après formation des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de lentisque indique la présence d'autres composés volatils qui permettent l'identification de marqueurs spécifiques des huiles.

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

## ➤ Dérivés terpéniques

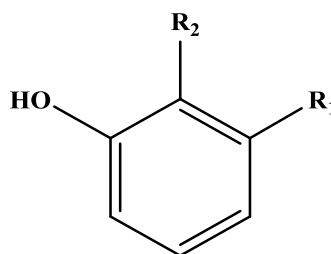
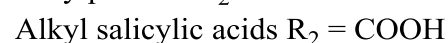
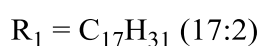
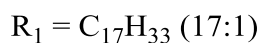
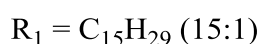
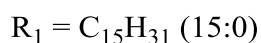
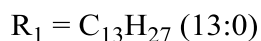
Les monoterpènes ont été identifiés entre le temps de rétention 5 et 15 minutes. Les principaux monoterpènes identifiés étaient l' $\alpha$ -pinène (●), le myrcène (●) et la  $\beta$ -limonène (●), également observés dans les fruits et l'huiles de *Pistacia lentiscus* par Mecherara-Idjeri et al (2008) et Wyllie et al (2006).

Le myrcène est le monoterpène le plus abondant, représentant plus de 50% des monoterpènes détectés. La fraction monoterpénique représente une quantité de 2,37 à 20,43% de tous les composés volatiles identifiés dans les échantillons artisanaux (1-8). L'échantillon Elkala présente la fraction monoterpénique la plus élevée, représentant 20,43% des composés détectés, contre 2,36% pour l'échantillon (2) (Akbou, 2015) (Tableau 12).

Pour les deux échantillons commerciaux, (El wafia) et (Zazia) la fraction monoterpène est absente ou peu significative (0,26%), ce qui confirme la falsification des échantillons, tandis que d'autres échantillons commerciaux, ont une fraction monoterpénique semblable à celle des échantillons artisanaux. De  $T_r = 15$  min à  $T_r = 34$  min, certains sesquiterpènes ont été identifiés en petites quantités.

## ➤ Alkylphénols

Après 34 min, des traces d'alkylphénols ont été identifiées dans la bibliothèque du NIST. Les principaux fragments de MS  $m/z$  étaient 108 et 120. En ce qui concerne les données de la littérature, l'identification des cardanols des espèces de *Rhus* par GC-MS décrit l'ion hydroxytropolium avec une valeur de  $m/z$  de 108 comme un fragment commun pour tous les alkylphénols identifiés (Franke, 2001). Les chaînes latérales alkylées des composés identifiés varient de 13 à 17 carbones et peuvent présenter une insaturation (Figure 31). La présence d'alkylphénols est considérée comme critique en raison du potentiel irritant des composés apparentés chez les Anacardiaceae et Ginkgoaceae.



**Figure 31 :** Structure générale des alkylphénols et acides alkyl-salicyliques

Tableau 12 : Identification des composés volatils après formation des dérivés silylés.

| Compound                                                | Tr<br>(min) | IR<br>Calculé | Bouan<br>ani (1) | Akbou<br>2015<br>(2) | Akbou<br>2017<br>(3) | Settara<br>(4) | Ouledr<br>abah(5<br>) | Sidi<br>Abdel<br>aziz<br>(6) | El kala<br>(7) | Blida(<br>8) | El<br>wafia<br>(9) | Zazia<br>(10) | Belkis<br>(11) | Zahrat<br>elatiba<br>a<br>(12) | Al<br>fourss<br>an<br>(13) | Sultan<br>(14) |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------|-----------------------|------------------------------|----------------|--------------|--------------------|---------------|----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Monoterpènes (%de volatiles totaux)</b>              |             |               | <b>9,3</b>       | <b>2,37</b>          | <b>15,29</b>         | <b>11,81</b>   | <b>6,46</b>           | <b>9,71</b>                  | <b>20,43</b>   | <b>13,84</b> | <b>0,26</b>        | <b>0</b>      | <b>14,27</b>   | <b>7,17</b>                    | <b>15,63</b>               | <b>6,12</b>    |
| <i>α – pinène</i>                                       | <u>5,51</u> | <u>948</u>    | <u>1,4</u>       | <u>0,3</u>           | <u>2,59</u>          | <u>1,24</u>    | <u>0,89</u>           | <u>1,44</u>                  | <u>2,28</u>    | <u>1,4</u>   | <u>-</u>           | <u>-</u>      | <u>1,81</u>    | <u>0,93</u>                    | <u>2,69</u>                | <u>1,06</u>    |
| Camphène                                                | 6,01        | 953           | -                | -                    | -                    | -              | -                     | -                            | 0,55           | -            | -                  | -             | -              | 0,09                           | -                          | -              |
| <i>β-myrcène</i>                                        | <u>7,15</u> | <u>976</u>    | <u>6,62</u>      | <u>1,68</u>          | <u>8,64</u>          | <u>9,32</u>    | <u>4,73</u>           | <u>6,66</u>                  | <u>14,79</u>   | <u>9,37</u>  | <u>0,26</u>        | <u>-</u>      | <u>10,13</u>   | <u>4,25</u>                    | <u>10,29</u>               | <u>3,56</u>    |
| 1,3,5-cycloheptatriène,3,7,7-triméthyl-                 | 8,31        | 1010          | -                | -                    | 0,18                 | -              | -                     | -                            | -              | 0,47         | -                  | -             | 0,27           | 0,15                           | 0,29                       | 0,21           |
| <i>d-limonène</i>                                       | <u>8,47</u> | <u>1018</u>   | <u>0,63</u>      | <u>0,19</u>          | <u>2,24</u>          | <u>0,69</u>    | <u>0,39</u>           | <u>0,86</u>                  | <u>1,06</u>    | <u>0,71</u>  | <u>-</u>           | <u>-</u>      | <u>0,89</u>    | <u>0,53</u>                    | <u>1,09</u>                | <u>0,52</u>    |
| Cyclohexène,4-méthyl-3-(1-méthyléthyl)-                 | 8,66        | 1023          | -                | -                    | 0,14                 | -              | -                     | -                            | -              | -            | -                  | -             | -              | -                              | -                          | -              |
| <i>α –terpinolène</i>                                   | 9,01        | 1045          | 0,34             | 0,1                  | 0,47                 | 0,33           | 0,23                  | 0,38                         | 0,57           | 0,61         | -                  | -             | 0,49           | 0,17                           | 0,6                        | -              |
| <i>trans</i> -sabinène hydrate                          | 9,42        | 1090          | -                | -                    | 0,19                 | -              | -                     | -                            | 0,65           | 0,85         | --                 | -             | -              | 0,38                           | -                          | 0,49           |
| <i>trans</i> -4-méthoxy thujane                         | 13,9        | 1197          | -                | -                    | 0,2                  | -              | -                     | -                            | -              | -            | -                  | -             | -              | -                              | -                          | -              |
| 4(2-méthoxypropan-2-yl)-1-méthylcyclohex-1-ène          | 14,6        | 1210          | 0,31             | 0,1                  | 0,64                 | 0,23           | 0,22                  | 0,37                         | 0,53           | 0,43         | -                  | -             | 0,68           | 0,64                           | 0,67                       | 0,28           |
| <b>Acides Alkylalicycliques (% de volatiles totaux)</b> |             |               | <b>3,21</b>      | <b>0,93</b>          | <b>11,25</b>         | <b>0</b>       | <b>2,42</b>           | <b>2,28</b>                  | <b>0</b>       | <b>0</b>     | <b>0</b>           | <b>0,63</b>   | <b>2,12</b>    | <b>0</b>                       | <b>1,32</b>                | <b>0,44</b>    |
| 3-tridecyl- acide salicylique (13:0)                    | 34,88       | 2282          | 1,86             | 0,23                 | 7,2                  | 0              | 2,42                  | 1,85                         | 0              | 0            | 0                  | 0,63          | 1,84           | 0                              | 1,04                       | 0              |
| 3-(heptadec-10-en-1-yl)- acide salicylique(17:1)        | 34,94       | 2296          | 1,35             | 0,7                  | 2,93                 | 0              | 0                     | 0,43                         | 0              | 0            | 0                  | 0             | 0,28           | 0                              | 0,28                       | 0,3            |
| 3-(pentadec-8-en-1-yl)- acide salicylique (15 :1)       | 35,25       | 2333          | 0                | 0                    | 1,12                 | 0              | 0                     | 0                            | 0              | 0            | 0                  | 0             | 0              | 0                              | 0                          | 0,14           |

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

## 1.2 Etude de la fraction apolaire des fruits de lentisque PLFE1 (PDM-1) et isolement l'acide 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylique.

La fraction apolaire PLFE1 (initialement codifiée PDM-1) est une fraction apolaire de fruits de *Pistacia lentiscus* d'Algérie préparée lors des travaux antérieurs au laboratoire dans le cadre d'une évaluation des activités antibactériennes. Dans le cadre de cette thèse, la déréplication de deux fractions apolaires PLFE1 (PDM-1) fortement active, et PDM-6 a été envisagée après silylation. Les fractions PLFE1 (PDM-1) et PDM-6 ont montré outre la présence d'acides gras (**voir tableaux en annexe**), une proportion importante d'acides alkylsalicyliques identifiés dans la base de données NIST comme étant des acides ginkgoliques.

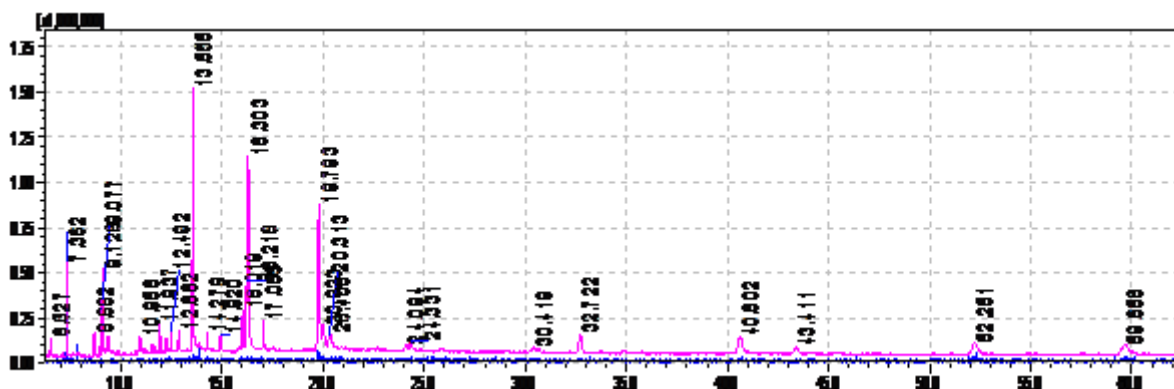


Figure 32 : Profil chromatographique global en GC-MS et entre (0-62 min) de PLFE1 (PDM-1).

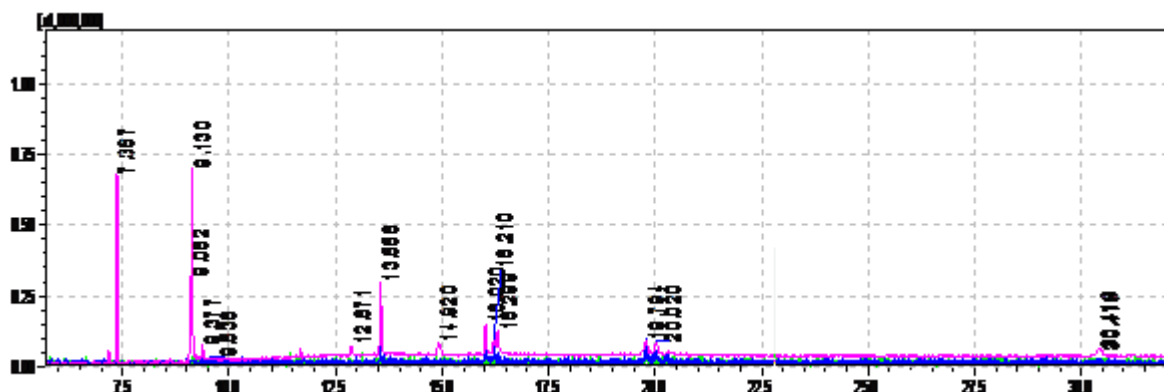


Figure 33 : Profil chromatographique global en GC-MS du PDM6.



## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

**Tableau 13 :** Identification des composés de la fraction apolaire PLFE1(PDM1).

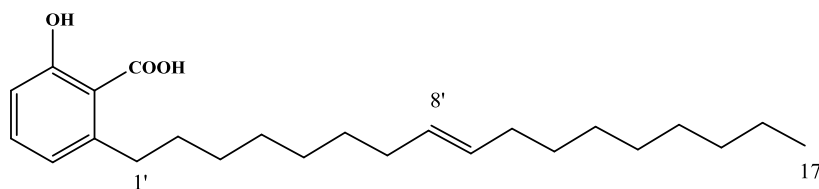
| Tr (min) | Aire    | % Aire | Composé identifié dans NIST   |
|----------|---------|--------|-------------------------------|
| 13.555   | 1457672 | 20.17  | Acide ginkgoneolique (2TMS)   |
| 16.019   | 240177  | 3.32   | Acide ginkgolique15 :1 (2TMS) |
| 16.218   | 394461  | 5.46   | Acide ginkgolique15 :1 (2TMS) |
| 16.303   | 1086687 | 15.04  | Acide hydroginkgolique (2TMS) |

**Tableau 14 :** Identification des composés de la fraction apolaire PDM6.

| Tr (min) | Aire   | Aire (%) | Composé identifié dans NIST   |
|----------|--------|----------|-------------------------------|
| 13.556   | 257417 | 10.06    | Acide ginkgoneolique (2TMS)   |
| 16.020   | 112116 | 4.38     | Acide ginkgolique15 :1 (2TMS) |
| 16.299   | 86647  | 3.39     | Acide hydroginkgolique (2TMS) |

Cependant, la base de données ne permet pas d'identifier précisément la taille de la chaîne alkyl ni la position des doubles liaisons éventuellement présentes puisque la similitude des composés est basée sur la parenté des fragmentation en spectrométrie de masse.

Afin de confirmer la structure des composés identifiés après déréplication par GC-MS, une purification a donc été réalisée dans le cadre du stage de Master 2 de Mr Christian Echague. Dans ce travail, la fraction PLFE1 a été purifiée par chromatographie moyenne pression. L'acide 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylique également connu sous le nom d'acide ginkgolique (17:1), ainsi que l'acide hydroginkgolique (15:0) ont été isolés. La structure de l'acide  $\Delta^8$  ginkgolique (17:1) a été confirmée après analyse RMN. La position de la double liaison a été confirmée après ozonolyse (Tahriou et al 2020) (voir analyse structurale en annexe 1).

**Figure 34 :** structure de l'acide  $\Delta^8$  ginkgolique (17:1).

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

## 1.3 Déréplication par HPLC-UV/DAD-MS des huiles de fruit de lentisque et comparaison à la fraction PLFE1

Afin de confirmer la présence d'acides alkylsalicyliques dans les échantillons d'huile, S'agissant de la première identification d'alkylphénols ou d'acides alkylsalicyliques dans l'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* L., nous avons souhaité confirmer ces résultats à l'aide d'une analyse HPLC-DAD-MS en comparant les échantillons d'huile 1-14 avec la fraction apolaire de fruit de lentisque PLFE1.

**Tableau 15** : Identification des acides alkylsalicyliques par HPLC-UV-DAD-MS des huiles artisanales et commerciales de fruit de *Pistacia lentiscus* avec comparaison à PLFE1. (% de l'aire des pics identifiés entre 45 et 60 minutes).

|          |       |              |                    | PLFE1 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    |
|----------|-------|--------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tr (min) | AS    | [M-H]<br>m/z | $\lambda$ max (nm) | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire | %Aire |
| 48,12    | 13 :0 | 319,00       | 246,5 ; 315,4      | 0,73  | 1,13  | 10,05 | 12,65 | 1,43  | 8,76  | 6,12  | 8,98  | /     | 7,1   | /     | 7,96  | 7,06  | 8,38  | 8,85  |
| 48,42    | 15 :1 | 345,01       | 246,7 ; 314,7      | 14,26 | 20,5  | 26,09 | 23,14 | 31,02 | 25,50 | 25,19 | 22,86 | /     | 24,76 | /     | 25,10 | 23,74 | 25,64 | 25,66 |
| 48,95    | 17 :2 | 370,94       | 246,8 ; 314,8      | 6,94  | 5,25  | 6,30  | 6,87  | 6,09  | 5,97  | 6,52  | 6,13  | /     | 6,20  | /     | 6,08  | 6,06  | 5,90  | 6,24  |
| 52,83    | 17 :1 | 373,03       | 247,0 ; 314,8      | 72,84 | 67,01 | 55,18 | 54,84 | 57,99 | 56,87 | 59,28 | 59,31 | /     | 57,33 | /     | 57,17 | 59,25 | 56,37 | 55,39 |
| 59,67    | 17 :0 | 375,04       | 246,8 ; 314,7      | /     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |

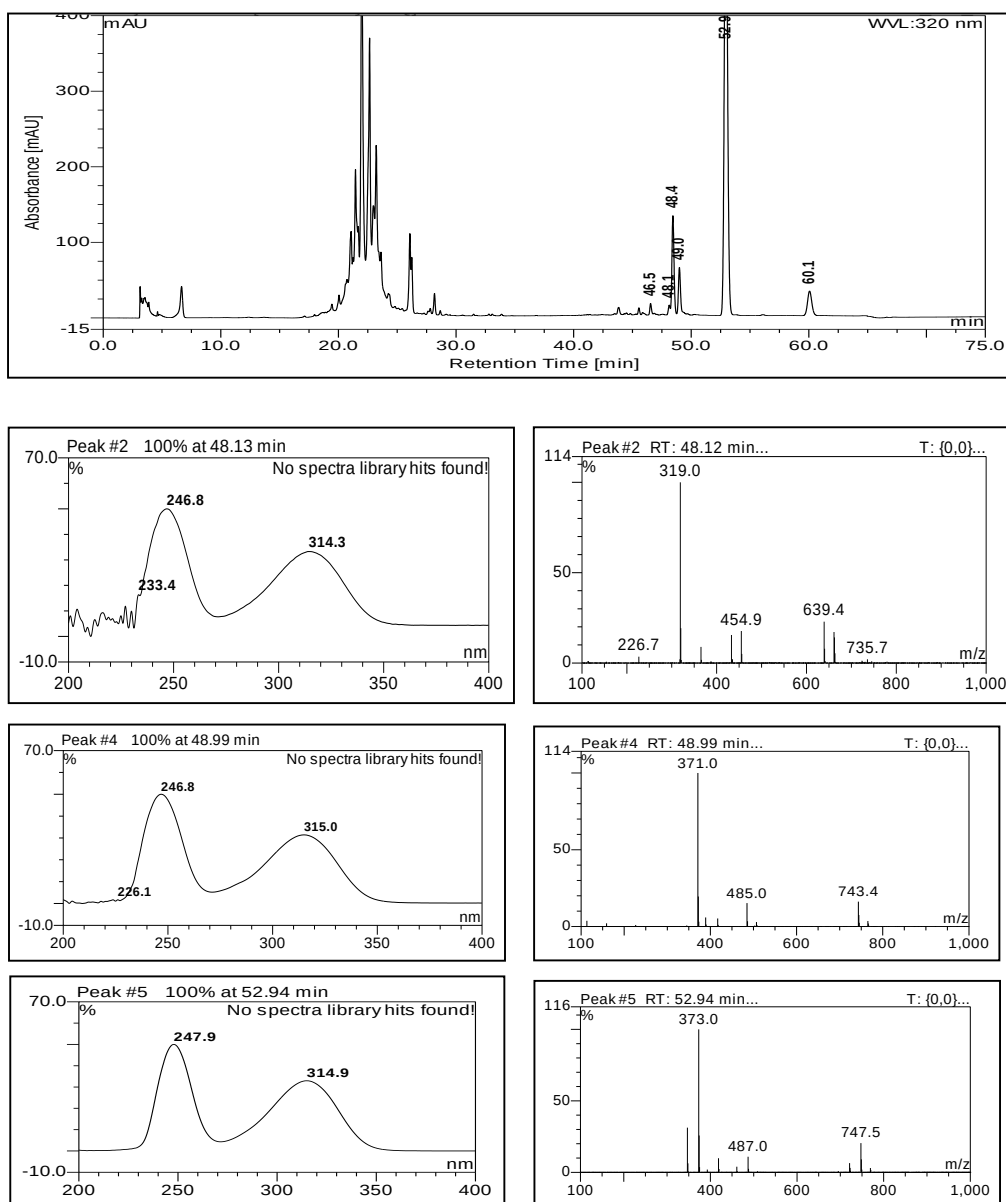
AS : Acide salicylique identifiée.

PLFE1 : Extrait apolaire de fruits de *Pistacia lentiscus*.

Les chromatogrammes de la fraction PLFE1 montre que cette fraction comporte 3 acides alkylsalicylique. L'acide 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylique, majoritaire, isolé au laboratoire, connu sous le nom d'acide ginkgolique (C17 :1), l'acide hydroginkgolique (C15 :0) et l'acide ginkgolique (C13:0).

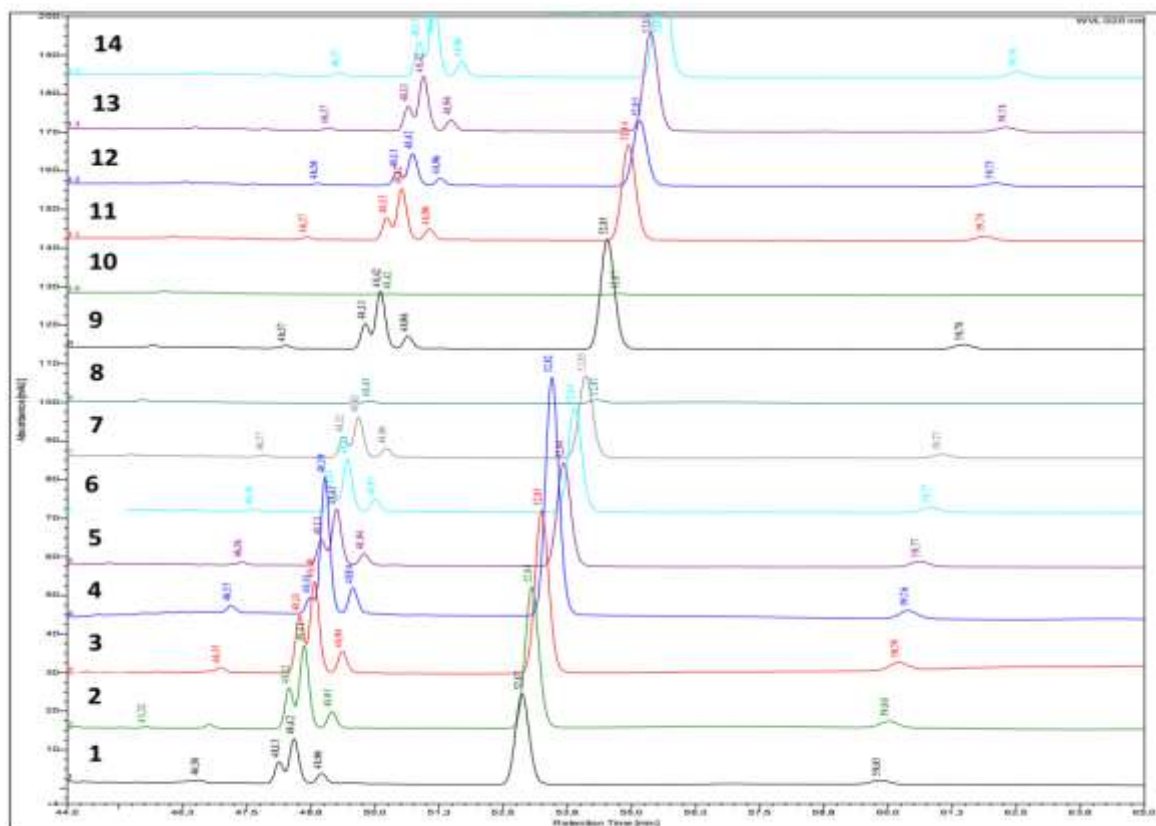
Concernant les échantillons d'huile, les dérivés salicyliques ont été détectés dans les échantillons entre 44 et 60 minutes avec le même profil de distribution pour 5 composés principaux (Figure 36).

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque



**Figure 35 :** Profils HPLC-UV-DAD-MS : détails des spectres UV et spectres de masse pour les pics correspondants aux acides alkyl-salicyliques de la fraction **PLFE1**.

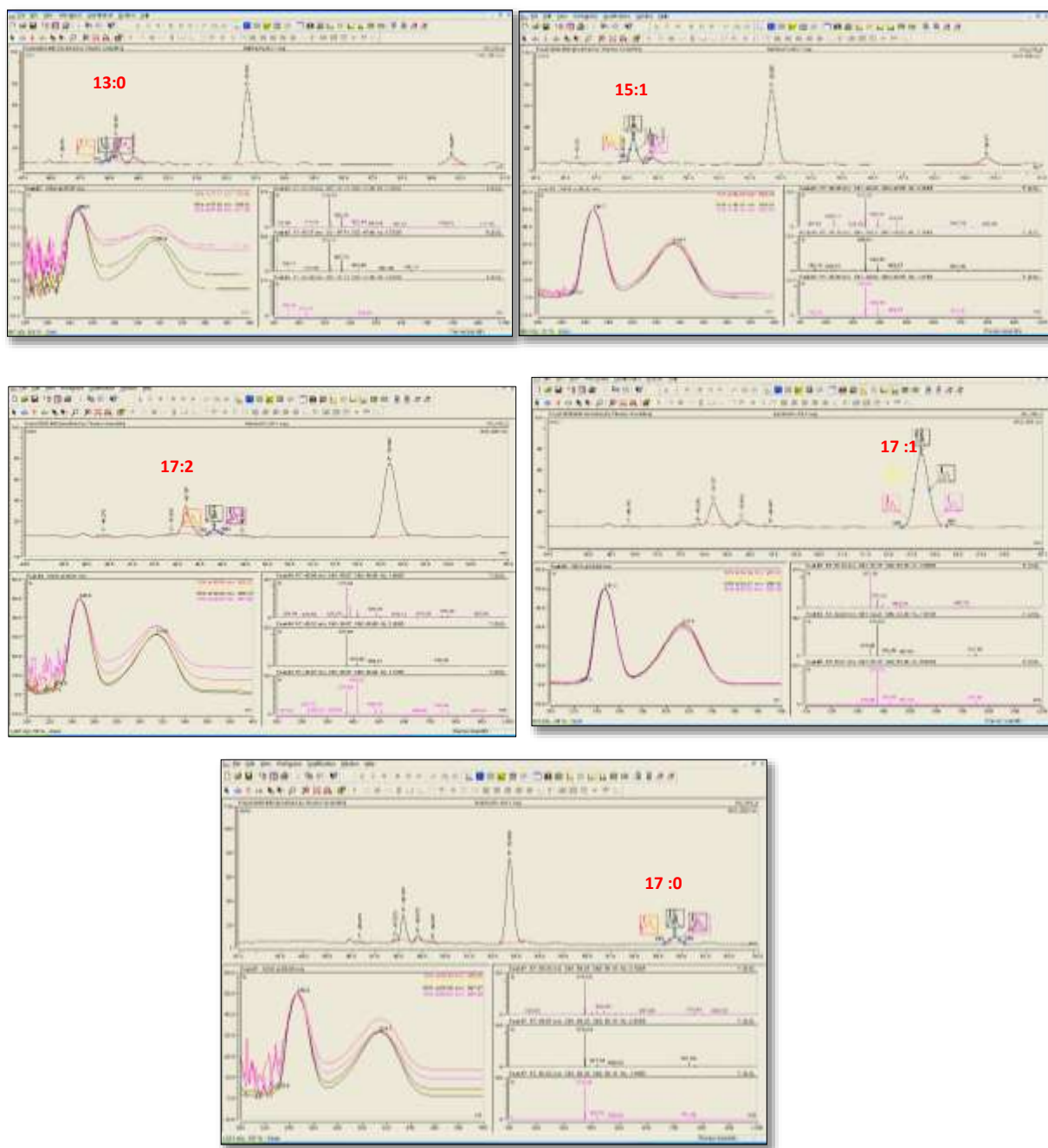
## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque



**Figure 36 :** Profils chromatographiques HPLC-UV/DAD-MS à 320nm des huiles de fruit de lentisque (1-14) (44min-65min).

Pour les échantillons d'huile, parmi les cinq dérivés détectés, les principaux composés sont l'acide ginkgolique (C17 :1) avec une valeur  $m/z$  de 373 en mode négatif, ainsi que l'acide ginkgolique (C15 :1) ( $m/z$  345). Le dérivé C17 :2 et le dérivé C13 :0 sont également identifiés ( $m/z$  respectivement 370,9 et 319), ainsi que le dérivé C17 :0 ( $m/z$ =375). De plus, l'ensemble des composés montre des spectres UV typiques similaires avec deux  $\lambda_{max}$  caractéristiques à 247 et 314 nm (Figure 37).

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque



**Figure 37 :** Profils HPLC-UV-DAD-MS : détails des spectres UV et spectres de masse pour les pics correspondants aux acides alkyl-salicyliques des échantillons d'huile **1-14**.

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

À notre connaissance, il s'agit de la première étude à signaler la présence d'acides alkylsalicyliques dans l'huile de fruit *Pistacia lentiscus*.

Cette classe de métabolites secondaires est signalée chez d'autres espèces d'Anacardiaceae, comme *Anacardium occidentale*, mais aussi chez des espèces de Gingkoaceae. L'identification des acides alkylsalicyliques par LC-MS et GC-MS est principalement décrite pour le *Ginkgo biloba* comme exigences de qualité des produits phytopharmaceutiques et qui exigent des quantités limitées d'acides ginkgoliques (Abate-Pella, 2017). Les acides alkylsalicyliques ont pu être identifiés dans les feuilles de *Ginkgo biloba* par la CG-MS grâce au modèle de fragmentation caractéristique et notamment un fragment typique d'une valeur de m/z de 180 décrit par Wang et al. pour les dérivés des esters méthyliques (Wang et al, 2014). Le profil des acides alkylsalicyliques dans les feuilles de *Ginkgo biloba* est différent de celui identifié pour *Pistacia lentiscus*, en effet, l'acide 15:1 ginkgolique, soit  $\Delta 8$  ou  $\Delta 10$ , étant le principal dérivé. Wang et al. ont déterminé le rapport  $\Delta 8/\Delta 10$  à l'aide de normes commerciales sur une colonne de haute polarité HP-88, car le temps de rétention des composés  $\Delta 8$  est légèrement inférieur. Dans cette étude, l'analyse GC-MS est réalisée avec une colonne RTx-5 apolaire. Dans ce cas, les deux isomères des dérivés alkylsalicyliques 15:1 et 17:1 ont pu être identifiés, sans identification claire de chaque isomère. La disponibilité de la fraction étalon purifiée PLFE1 nous a permis d'identifier précisément le dérivé  $\Delta 8$  17:1 comme le principal composé d'acide salicylique alkyle présent dans l'huile de fruit *Pistacia lentiscus*.

## 2. Etude de la fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable d'une huile correspond à l'ensemble des constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont peu soluble dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Généralement, la fraction insaponifiable des huiles contient des molécules de haut poids moléculaire, non volatils, possédant une solubilité faible dans les solvants aqueux.

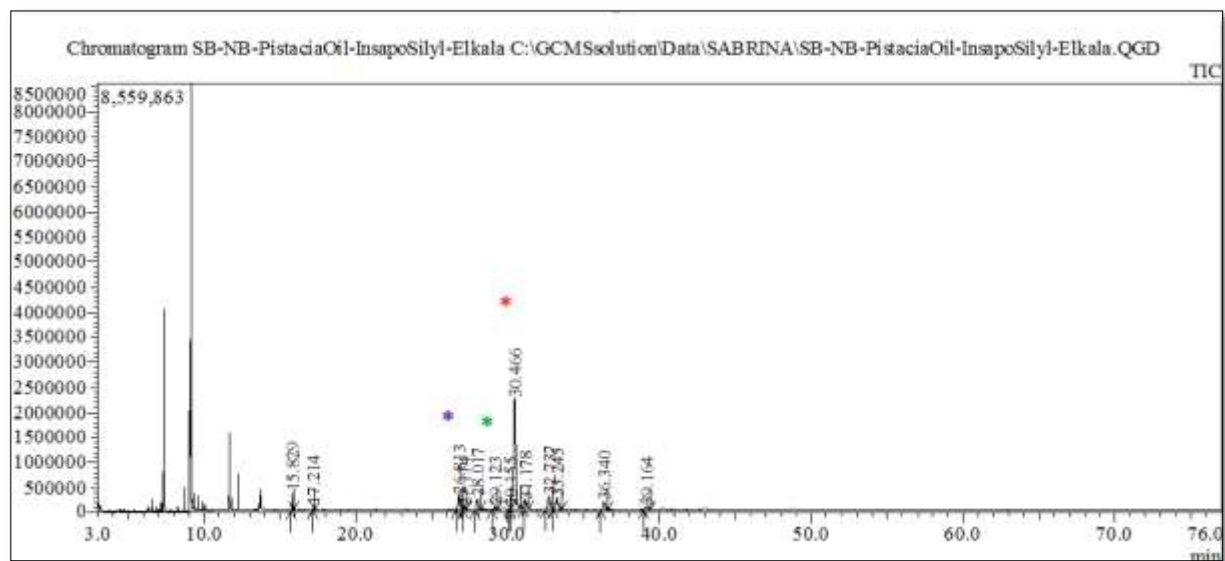
Il est à noter que les trois insaponifiables seront identifiés par les codes suivants :

| Nom de l'échantillon            | Code de l'insaponifiable |
|---------------------------------|--------------------------|
| Huile de lentisque Akbou (2017) | <b>3 BIS</b>             |
| Huile de lentisque Elkala       | <b>7 BIS</b>             |
| Huile de lentisque Blida        | <b>8 BIS</b>             |

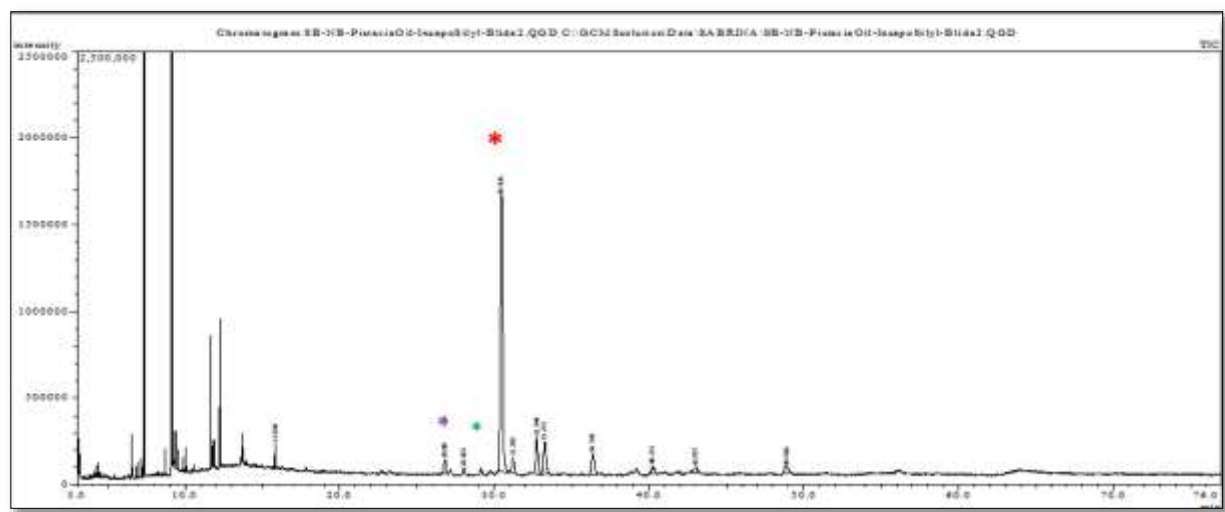
## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

### 2.1 Déréplication par analyse GC-MS des insaponifiables silylés

Une extraction des insaponifiables a été envisagée pour les trois échantillons artisanaux Akbou (2017) (3), Elkala(7) et Blida(8) suivant la méthode AFNOR NF T 60-206. La composition des fractions insaponifiables a été analysée à l'aide de GC-MS après dérivatisation en esters de silylés.



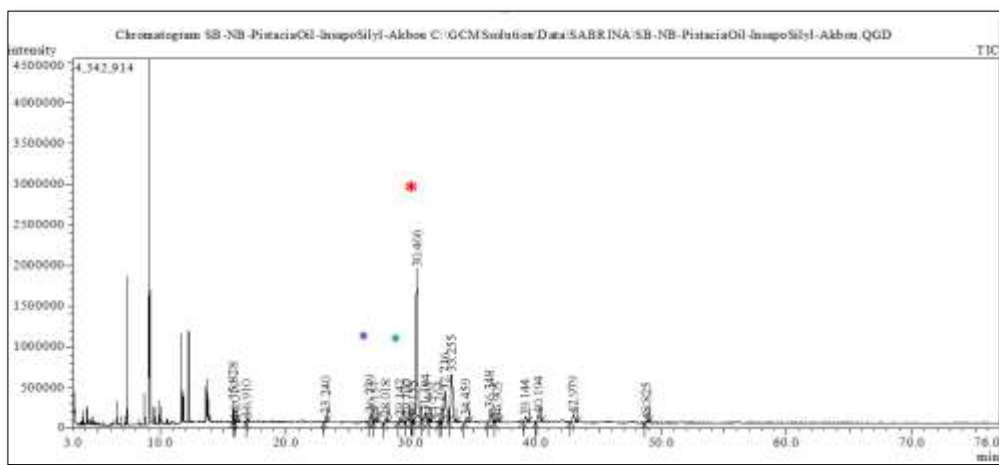
**Figure 38 :** Profil chromatographique en GC-MS de l'insaponifiable silylé Elkala (7 BIS).



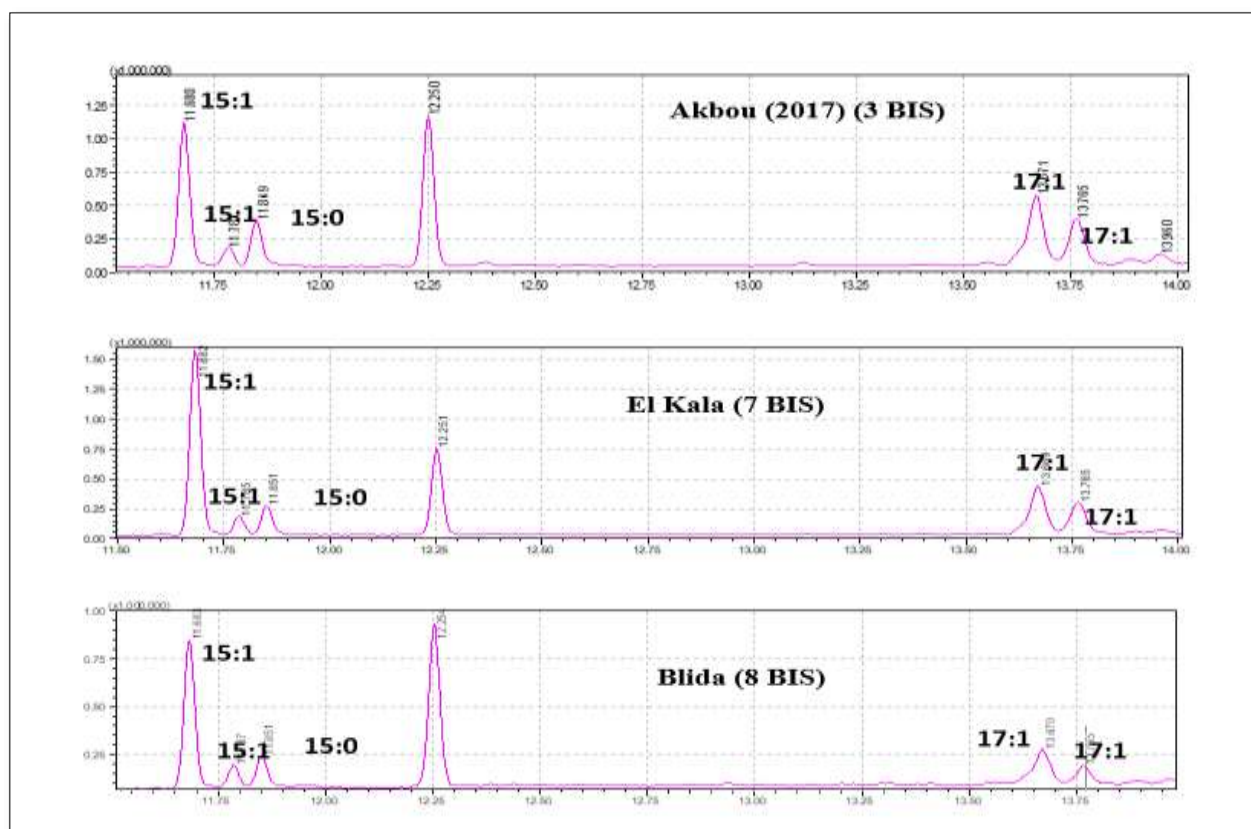
**Figure 39 :** Profil chromatographique en GC-MS de l'insaponifiablesilylé Blida (8 BIS).



## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque



**Figure 40 :** Profil chromatographique GC-MS de l'insaponifiable silylé Akbou 2017 (3 BIS).  
NB :  $\beta$ -sitostérol (\*) stigmastérol (\*) et le campestérol (\*).



**Figure 41 :** Agrandissement de la zone 11,5 à 14,0 minutes et identification des 5 acides alkylsalicyliques des trois fractions insaponifiables.



**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

D'après les résultats de l'analyse GC-MS des trois insaponifiables Akbou2017 (**3 BIS**), Elkala (**7 BIS**) et Blida (**8 BIS**) des phytostérols et des dérivés alkylsalicyliques ont été identifiés. Dans le cas des dérivés silylés, le fragment diagnostic observé pour tous les dérivés présente un m/z de 180, tel qu'observé par Gomez-Caravaca et al(2010). Les dérivés C15 :0, C15 :1 et C17 :1 ont été identifiés (Figure41, Tableau 16). Concernant les phytostérols, le  $\beta$ -sitostérol était le principal phytostérol identifié, le stigmastérol et le campestérol sont également présents mais en moindre proportion (Song et al., 2000). Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits par Dhifi et al, qui rapportent la présence de  $\beta$ -sitostérol comme phytostérol principal (55,55%), suivi du cholestérol (44,45%) dans des échantillons d'huile de lentisque (Dhifi et al., 2013).

**Tableau 16** : Identification des acides alkylsalicyliques et des phytostérols des fractions insaponifiables

|                                 |          |                         |                              | Akbou (3 BIS) | Elkala (7 BIS) | Blida (8 BIS) |
|---------------------------------|----------|-------------------------|------------------------------|---------------|----------------|---------------|
|                                 | Tr (min) | m/z                     | Identification               | % aire        | % aire         | % aire        |
| <b>Acides alkylsalicyliques</b> | 11,683   | 374, 180, 165           | C15:1                        | 26,92         | 42,86          | 32,95         |
|                                 | 11,787   | 374, 180, 165           | C15:1                        | 3,97          | 4,34           | 5,04          |
|                                 | 11,851   | 376, 180, 165           | C15:0                        | 9,32          | 6,95           | 7,23          |
|                                 | 12,254   | 192, 143                | NI                           | 27,6          | 19,53          | 37,7          |
|                                 | 13,67    | 402, 180, 165           | C17:1                        | 19,72         | 16,08          | 11,8          |
|                                 | 13,765   | 402, 180, 165           | C17:1                        | 12,47         | 10,24          | 5,28          |
|                                 | 11,683   |                         |                              | 100           | 100            | 100           |
| <b>Phytostérols</b>             | Tr (min) | m/z                     | Identification               | % aire        | % aire         | % aire        |
|                                 | 26,804   | 472, 382, 343, 207, 129 | Campesterol, TMS(*)          | 2,70          | 7,37           | 3,06          |
|                                 | 27,174   | 483, 393, 207           | NI                           | 0,87          | 0,69           | 0             |
|                                 | 28,025   | 484, 394, 355, 281, 207 | Stigmastérol, TMS(*)         | 1,14          | 5,09           | 1,10          |
|                                 | 29,123   | 483, 393, 281, 207      | NI                           | 1,32          | 1,03           | 0             |
|                                 | 30,155   | 484, 394, 355, 281, 207 | NI                           | 0,52          | 0,47           | 0             |
|                                 | 30,476   | 486, 396, 381, 357, 255 | $\beta$ -Sitostérol, TMS (*) | 53,09         | 61,79          | 67,57         |
|                                 | 31,205   |                         | -                            | 4,35          | 3,76           | 3,46          |
|                                 | 32,744   | 218, 189                | Lupéol TMS                   | 11,42         | 7,63           | 9,29          |
|                                 | 33,253   | 483, 393, 365, 339      |                              | 19,06         | 7,46           | 8,91          |
|                                 | 36,330   | 483, 422, 407, 379, 281 |                              | 5,43          | 4,67           | 6,57          |
|                                 |          |                         |                              | 99,89         | 100            | 100           |

## 2.2 Évaluation de la teneur en caroténoïdes de l'insaponifiable par spectrophotométrie UV.

La teneur en caroténoïdes de la fraction insaponifiable a été évaluée par spectrométrie UV suivant la méthode de Lichtenthaler et de Wellburn (Lichtenthaler, 1983). La teneur totale en caroténoïdes a été déterminée entre 1,57 et 7,14 10<sup>-4</sup>g/g d'extrait. Mezni et al (2014), décrivent une teneur en

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

caroténoïdes de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* qui varie entre 5 à 10 mg/kg d'huile. Le rendement des insaponifiables (Elkala, Akbou 2017 et Blida) variant entre 0,47 et 1,67 %, les résultats sont conformes aux données de la littérature (Mezni, 2014).

**Tableau17** : Absorbances des insaponifiables par spectrophotomètre UV.

| Echantillons                        | $\lambda$ (665,2nm) | $\lambda$ (652,4 nm) | $\lambda$ (470nm) |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| Insaponifiable Akbou (2017) (3 BIS) | 0,087 Abs           | 0,085Abs             | 1,904Abs          |
| Insaponifiable ElKala (7 BIS)       | 0,178 Abs           | 0,182 Abs            | 1,157Abs          |
| Insaponifiable Blida (7 BIS)        | 0,141 Abs           | 0,146Abs             | 1,092Abs          |

Les équations de détermination du Chlorophylle a ; b ; Chlorophylle totale et Caroténoïdes totaux solubilisés dans 100%MeOH sont les suivants :

$$C_a = 16.72 (A_{665,2}) - 9,16 (A_{652,4})$$

$$C_b = 34.09 (A_{652,4}) - 15,28 (A_{665,2})$$

$$C_{a+b} = 1.44(A_{665,2}) + 24,93 (A_{652,4})$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 (A_{470}) - 1,63 C_a - 104,96 C_b}{221}$$

221

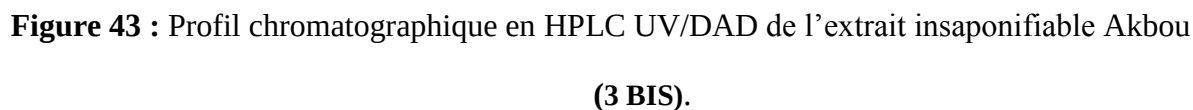
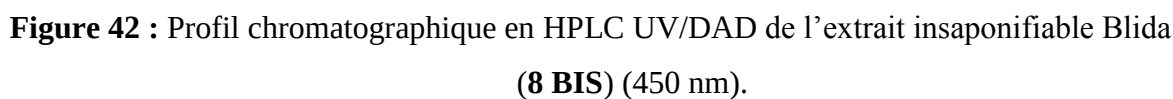
$C_a$ : Chlorophylle a,  $C_b$ : Chlorophylle b,  $C_{a+b}$ : Chlorophylle totale,  $C_{x+c}$  : caroténoïdes totaux (Hartmut et Lichtenthaler., 1987).

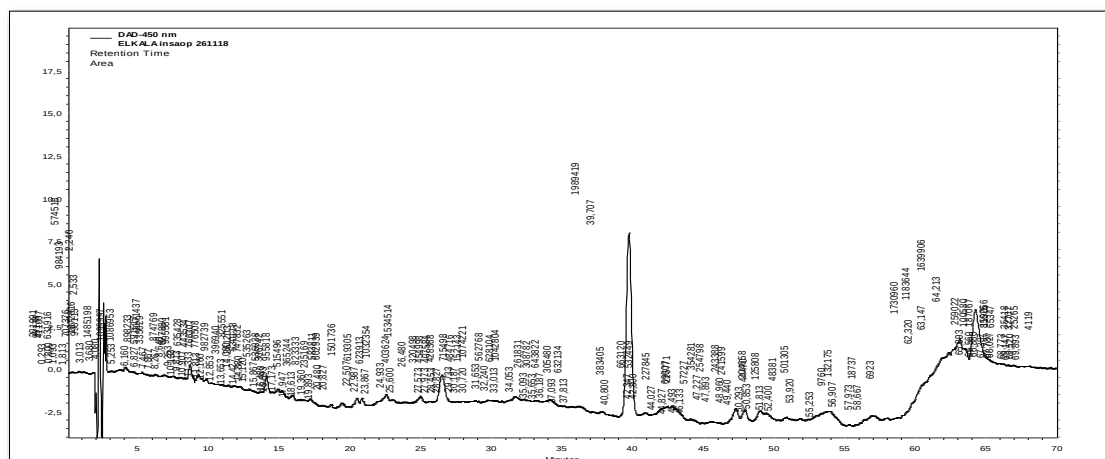
**Tableau 18** : % des Chlorophylles et des caroténoïdes dans les trois insaponifiables.

| Les extraits insaponifiables | Rendement en insaponifiable (%) | Chlorophylle a ( $10^{-4}$ g/g) | Chlorophylle b ( $10^{-4}$ g/g) | Chlorophylle Totale ( $10^{-4}$ g/g) | Caroténoïdes totaux ( $10^{-4}$ g/g) |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Akbou 2017(3 BIS)            | 1,67                            | 1,35                            | 3,14                            | 4,49                                 | 1,57                                 |
| El kala(7 BIS)               | 0,47                            | 2,61                            | 6,97                            | 9,59                                 | 7,14                                 |
| Blida(8 BIS)                 | 1,07                            | 2,04                            | 6,97                            | 9,59                                 | 6,56                                 |

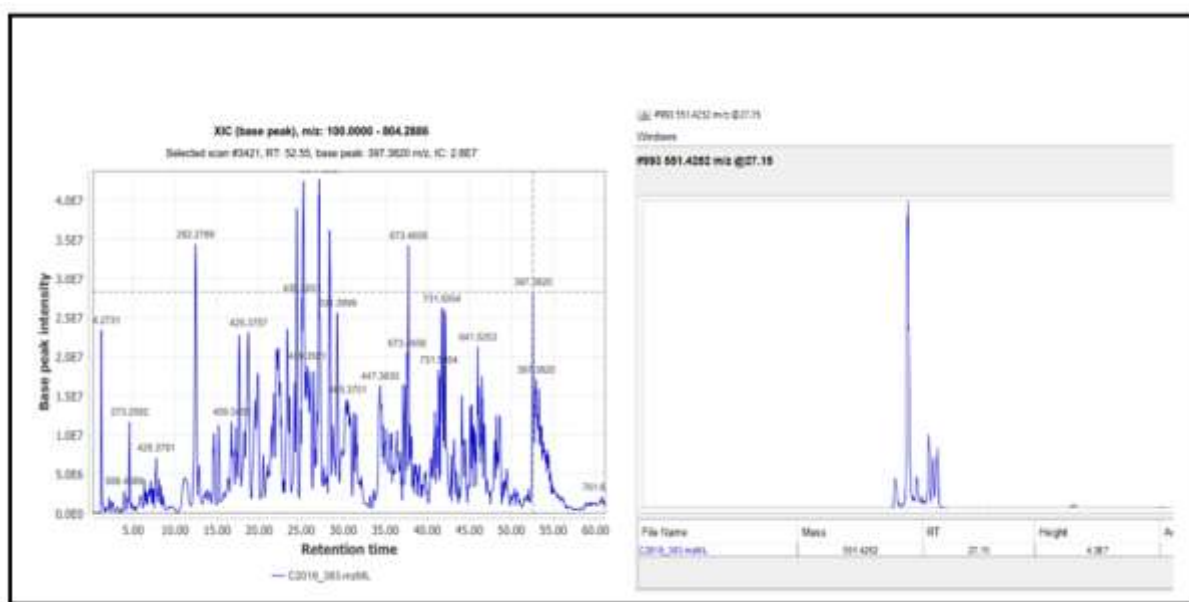
### 2.3 Profils HPLC-UV/DAD de la fraction insaponifiable de *Pistacia lentiscus* L.

Les résultats de l'analyse des insaponifiables : Akbou 2017(3BIS), Elkala (7BIS), Blida (8BIS) par HPLC-UV-DAD et UPLC-HRMS ont confirmé la présence de lutéine comme principal caroténoïde identifié avec une valeur m/z de 551,4252 correspondant à l'ion  $[M+H-H_2O]^+$  en mode de détection positive (Abate-Pella, 2017).





**Figure 44 :** Profil chromatographique en HPLC UV/DAD de l'extrait insaponifiable ElKala (7 BIS).



**Figure 45 :** Profil UPLC-HRMS et extraction du m/z 551,4252 d'extrait insaponifiable ElKala.

## 2.4 Évaluation du degré de rancissement des échantillons d'huiles de lentisque

La stabilité oxydative est un paramètre important pour l'évaluation de la qualité des graisses et des huiles animales et végétales. En effet, de nombreuses études se focalisent sur la relation entre la composition des graisses et des huiles et le degré de rancissement (Sabolova et al., 2017).

La stabilité oxydative a été évaluée à l'aide d'un Rancimat 743 à une température de 110°C. Le temps d'induction reflète la stabilité dans l'état oxydatif et peut donc être considéré comme une

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

norme de qualité. Le temps d'induction le plus élevé a été observé pour l'échantillon d'huile artisanale El Kala avec un temps d'induction de 23h7'7''. Une bonne stabilité oxydative entre 7 et 11h a été observée pour les échantillons **3, 8, 9, 12** et **13**. Une faible stabilité oxydative (< 7 heures) a été mesurée pour les échantillons **1, 4, 5, 10, 11** et **14** (Tableau 18).

Nous pouvons remarquer que pour les échantillons qui ont bénéficié d'une analyse des insaponifiables, **3, 7** et **8**, le temps d'induction a été corrélé à la teneur en caroténoïdes avec un temps d'induction plus élevé pour les échantillons **7** et **8** par rapport à l'échantillon **3** qui avec une faible teneur en caroténoïdes a montré une faible stabilité oxydative (Tableau 18).

**Tableau 19 :** Résultats de l'analyse rancimat des huiles de fruit de lentisques.

| Code      | Les huiles de lentisque | Temps induction (h) à 110°C |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>1</b>  | Bouanani                | 3h1'7'' ±0,01               |
| <b>2</b>  | Akbou 2015              | -                           |
| <b>3</b>  | Abbou 2017              | 7 h 8'9'' ±0,12             |
| <b>4</b>  | Settara                 | 2 h7'3'' ±0,06              |
| <b>5</b>  | Ouledrabeh              | 2h 6'4'' ±0,05              |
| <b>6</b>  | Sidi abdelaziz          | 11h 4'5'' ±0,09             |
| <b>7</b>  | El kala                 | 23h 7'7'' ±0,07             |
| <b>8</b>  | Blida                   | 9h5'3'' ±0,07               |
| <b>9</b>  | El wafia                | 8h7'2'' ±0,13               |
| <b>10</b> | Zazia                   | 4h3'7'' ±0,36               |
| <b>11</b> | Belkis                  | 4h3'7'' ±0,03               |
| <b>12</b> | Zahretatibaa            | 9h5'6'' ±0,08               |
| <b>13</b> | El fourssane            | 6h6'9'' ±0,04               |
| <b>14</b> | Sultane                 | *                           |
| <b>15</b> | El milia                | 4h5'7'' ± 0,12              |

NB :\* L'échantillon sultane(**14**) n'est pas analysé par manque de quantité.

## 2.5 Dosage des métaux lourds des huiles de lentisque par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

La teneur en métaux lourds des échantillons d'huiles a été évaluée au moyen de la spectrométrie d'absorption atomique (SAA), comme l'ont recommandé les organismes de normalisation (ISO). Les teneurs en plomb, cadmium, nickel, cuivre et zinc ont été évaluées. Le plomb et le cadmium sont les métaux les plus toxiques, et la réglementation européenne a fixé un maximum de 0,1 mg/kg pour la teneur en plomb des huiles végétales, mais aucune valeur n'est fixée pour le cadmium (Règlement CE 2006). La majorité des échantillons d'huile montrent un niveau élevé de

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

contamination par le plomb avec des valeurs comprises entre 1,0 et 6,0 mg/kg, ce qui est beaucoup plus élevé que la concentration maximale de 0,1 mg/kg dans les aliments. Seuls quatre échantillons présentaient de faibles teneurs en plomb : échantillons artisanaux **3** et **6** et échantillons commerciaux **10** et **14**. En ce qui concerne le cadmium, tous les échantillons sont inférieurs à la limite de détection ( $<0,023$  mg/kg), sauf les échantillons **2** et **3** dont les valeurs sont de 0,2 et 0.

**Tableau 20** : Les normes alimentaires selon le règlement Conseil Européen n° 1881/2006.

| Éléments ( $\mu\text{g/g}$ ) | Normes     |
|------------------------------|------------|
| Fe                           | $\leq 1,5$ |
| Cu                           | $\leq 0,1$ |
| Pb                           | $\leq 0,1$ |

**Tableau 21**: Résultats du dosage des métaux lourds des huiles de lentisque par (SAA).

| Code      | Les huiles de lentisque | Ni *         | Cu*         | Pb*          | Cd*          |
|-----------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>1</b>  | Bouanani                | $\leq 0,005$ | $\leq 0,03$ | 6,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>2</b>  | Akbou 2015              | $\leq 0,005$ | $\leq 0,03$ | 6,0          | 0,2          |
| <b>3</b>  | Akbou 2017              | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | $\leq 0,001$ | 0,1          |
| <b>4</b>  | Settara                 | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 1,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>5</b>  | Ouled rabah             | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 2,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>6</b>  | Sidi abdelaziz          | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,023$ |
| <b>7</b>  | El kala                 | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 5,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>8</b>  | Blida                   | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 2,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>9</b>  | El wafia                | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 1,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>10</b> | Zazia                   | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,023$ |
| <b>11</b> | Belkis                  | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 2,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>12</b> | Zahretatibaa            | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 2,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>13</b> | El fourssane            | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 2,0          | $\leq 0,023$ |
| <b>14</b> | Sultane                 | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,023$ |
| <b>15</b> | El milia                | $\leq 0,1$   | $\leq 0,03$ | 1,0          | $\leq 0,023$ |

(mg/Kg) Limite de détection (mg/Kg) : Ni : 0,005, Cd : 0,023, Pb : 0,001, Cu : 0,03.

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque****Tableau 22** : Résultats du dosage des métaux lourds des sols par (SAA) (zone de récolte des fruits de lentisque destiné à l'extraction des huiles artisanales).

| Sol (mg/Kg)           | Ni *   | Cu*   | Pb*    | Cd*    |
|-----------------------|--------|-------|--------|--------|
| Bouanani              | 3      | 38,4  | 29     | ≤0,023 |
| Elkala                | ≤0,005 | 3     | 97     | 0,1    |
| Akbou 2017            | ≤0,005 | ≤0,03 | ≤0,001 | ≤0,023 |
| Norme AFNOR NFU44-041 | 50     | 100   | 100    | 2      |

Limite de détection (mg/Kg) : Ni : 0,005, Cd : 0,023, Pb : 0,001, Cu : 0,03.

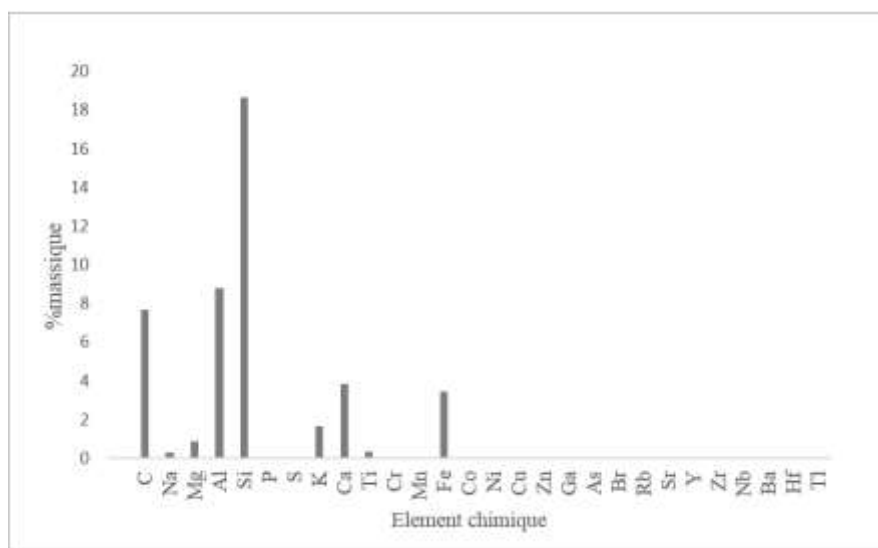
Il ressort de l'analyse du tableau 20, que les huiles artisanales présentent un taux élevé de contamination par le plomb par rapport aux autres échantillons. Pour mieux saisir la source de contamination de ces huiles, on a pris des échantillons de sol assez représentatifs de la zone de récolte des fruits de lentisque destiné à l'extraction artisanale. D'après les résultats du tableau 21, on remarque que les teneurs en plomb des sols analysés sont inférieures à la limite de contamination fixée par la norme AFNOR (NFU44-041) qui définit les limites en certains contaminants pour les sols destinés à la production de composés commercialisés dans un but alimentaire (agriculture / collecte), puisque les teneurs en plomb des sols des zones de collecte, pourraient être corrélées avec les teneurs en plomb dans les huiles correspondant (Lacoste et al 2005). Les résultats de l'analyse du sol montre bien la présence de plomb dans le sol pour les échantillons de sol Bouanani et El Kala, cependant, les échantillons de sols collectés à Akbou en 2017 ne présentent pas de contamination. Ces résultats appuient les résultats observés pour les échantillons d'huile puisque l'on observe bien une contamination au plomb pour les échantillons Bouanani (1) et ElKala (7). On peut remarquer que l'échantillon d'huile Akbou 2015 présente une contamination alors que celui de 2017 n'est pas contaminé par le plomb. Ceci peut s'expliquer par la variation de l'origine des matières premières utilisées par le producteur. Il est à noter que le sol collecté en 2017 est bien celui de la région d'où proviennent les fruits de l'échantillon d'huile Akbou 2017. D'ailleurs, on observe bien une absence de contamination pour cet échantillon, à la fois dans le sol et dans l'huile.

## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque

2.6 Analyse de la composition chimique du sol de *Pistacia lentiscus* par FRX (spectrométrie de fluorescence de rayons X)

Pour mieux comprendre le biotope et l'exigence écologique de *Pistacia lentiscus*, on a jugé utile d'analyser les sols provenant d'Akbou à Béjaia et Elkala à Eltaref par spectrométrie de fluorescence de rayons X (FRX). D'après la littérature le pistachier lentisque préfère les sols siliceux avec de faibles concentrations en phosphore et potassium conjugués avec des concentrations différentes en carbonates de calcium et en azote (Mamane, 2017). En effet, on remarque d'après les résultats présentés dans les figures 46 et 47 la richesse de deux sols analysés par FRX en silicium avec un pourcentage massique de 19% pour le sol provenant d'Akbou et 20% pour le sol provenant d'Elkala.

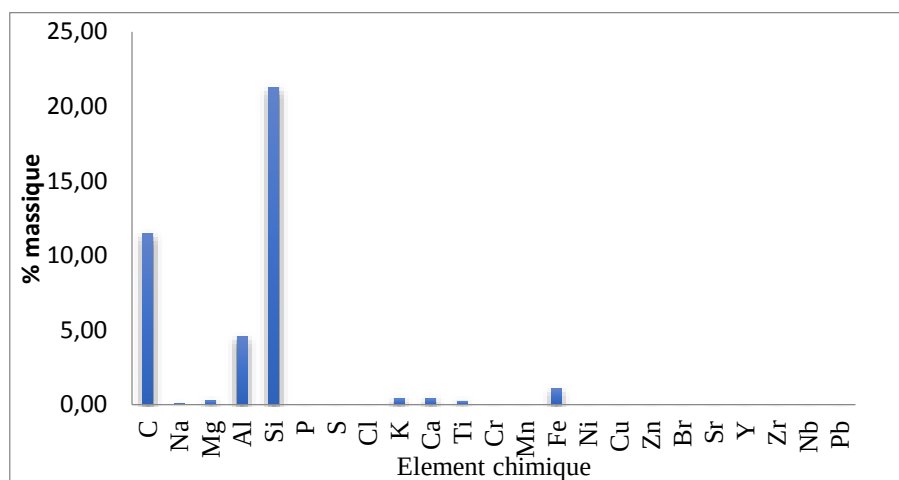
On notera que pour les analyses par FRX, les métaux lourds ne sont pas détectés car cette méthode n'est pas aussi sensible que la SAA et elle ne permet que de définir des pourcentages massiques pour les éléments chimiques.



**Figure 46:** Les éléments chimiques du sol de *Pistacia lentiscus* provenant d'Akbou par FRX.



## CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque



**Figure 47 :** Les éléments chimiques du sol de *Pistacia lentiscus* provenant d'Elkala par FRX.

Ces résultats n'apportent pas d'éléments importants sur la composition des sols hormis la confirmation de la nature siliceuse du sol. Ceci confirme les éléments décrits dans la littérature (Mamane, 2017).

**CHAPITRE I : Analyse physicochimiques des échantillons de l'huile de lentisque**

---

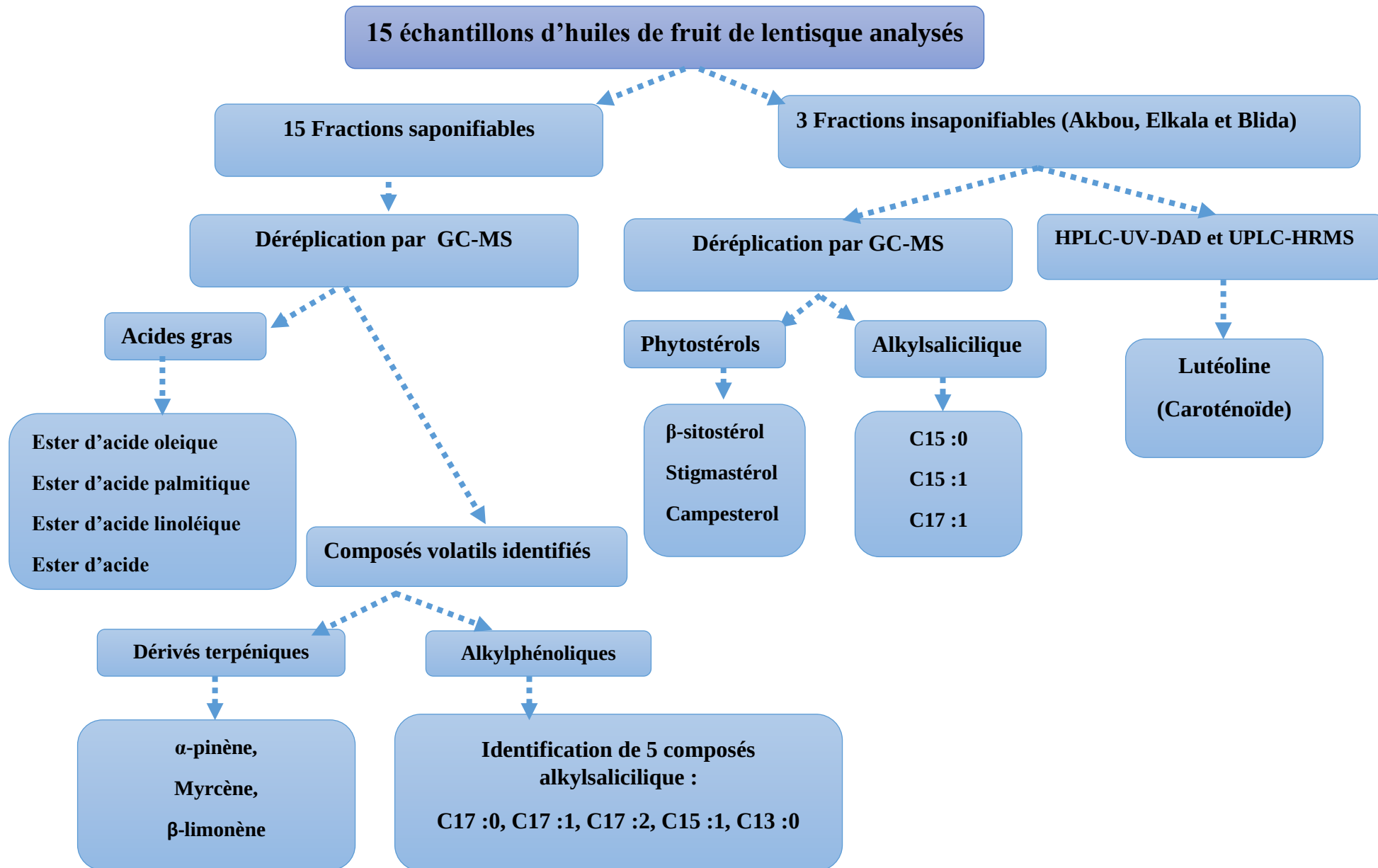
**Conclusion**

Ce travail a permis d'étudier la composition chimique de 15 échantillons d'huile de lentisque artisanaux et commerciaux et issus de coopératives bien identifiées. Le tableau récapitulatif suivant présente les principaux métabolites identifiés : acides gras, dérivés terpéniques, phytostérols, caroténoïdes. La composition des échantillons d'huile en terme d'acides gras est homogène et en accord avec les données de la littérature. Nous avons cependant mis en évidence, pour la première fois, la présence d'acides alkylsalicyliques (acides ginkgoliques). Ces dérivés sont préoccupants compte-tenu de différentes études mettant en avant une toxicité cutanée de ces dérivés. Toutefois, il serait important de quantifier ces dérivés dans les échantillons d'huile utilisés comme matière première. En effet, ces mêmes composés sont présents dans des produits phytopharmaceutiques à base de *Ginkgo biloba* et nécessitent simplement de respecter une limite maximale d'exposition, sans interdire pour autant leur usage en tant que cosmétique ni en tant que médicament.

Par ailleurs, la présence de composés terpéniques caractéristiques de *Pistacia lentiscus* L. peut être envisagée comme marqueur spécifique pour l'identification des huiles de lentisque.

Concernant les métaux lourds, nous avons pu mettre en évidence une contamination par les métaux lourds de certains échantillons. Cette contamination est liée à la contamination des sols et potentiellement la pollution atmosphérique. On a pu cependant observer que cette contamination pouvait varier selon les lots de collecte. Ceci devrait mener à limiter pour les échantillons contaminés leur utilisation en tant qu'huile alimentaire. Pour une utilisation cosmétique, cette contamination n'aura pas le même impact selon la concentration en huile dans le produit et la quantité utilisée.

Afin de mieux déterminer le risque toxicologique lié à la présence de ces contaminants, nous avons envisagés, en plus des évaluations biologiques, des évaluations toxicologiques.



## Chapitre II : ACTIVITES BIOLOGIQUE

### 1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des huiles de fruits de lentisques et des insaponifiables

L'activité antiradicalaire représente un atout important à la fois en vue d'une application cosmétique ou en complément alimentaire. En effet, l'exposition à des espèces radicalaires peut induire un stress oxydant et occasionner des dommages au niveau cutané ou par voie interne.

Le dosage des capacités antiradicalaires a donc été envisagé afin de mettre en évidence cette propriété pour nos échantillons d'huile. Compte-tenu du fait que la présence de composés phénoliques, et notamment flavonoidique, mais également des caroténoïdes, peut exercer une activité antiradicalaire, nous avons également envisager de réaliser des dosages des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes et des caroténoïdes totaux pour mettre en avant ou non une éventuelle corrélation entre la présence de ces composés et une activité antiradicalaire.

#### 1.1 Activité anti-radicalaire sur le DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différentes huiles de lentisque et des insaponifiables, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (2,2-diphényl-1- picryl-hydrayle) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Clarcke et al (2013).

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages de piégeage du radical DPPH à une concentration finale de 200µg/mL. Les huiles de lentisques testées ont présenté des valeurs de piégeage du radical DPPH variant entre 8,11±2,51 et 94,00±0,04%. En comparaison avec le standard de l'acide gallique (% d'Efficacité DPPH = 48,08± 2,84), on remarque que 60% des huiles de lentisque testées et presque 100% des insaponifiables, à la concentration de 200µg/mL, présentent un pourcentage de piégeage meilleur que le standard acide gallique (5µg/mL).

**Tableau 23 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des huiles de lentisque et des insaponifiables à 200 µg/mL.

| Nature de L'échantillon     | Code         | Nom l'échantillon                | % inhibition DPPH à 200 µg/mL |
|-----------------------------|--------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Insaponifiable              | <b>3 BIS</b> | Akbou 2017                       | 81,77±2,54                    |
|                             | <b>7 BIS</b> | Elkala                           | 81,77±2,54                    |
|                             | <b>8 BIS</b> | Blida                            | 39,86± 3,80                   |
| Huile de fruit de lentisque | <b>1</b>     | Bouanani                         | 31,52±2,17                    |
|                             | <b>2</b>     | Akbou 2015                       | 8,11±2,51                     |
|                             | <b>3</b>     | Abbou 2017                       | 93,92±0,37                    |
|                             | <b>4</b>     | Settara                          | 29,13±2,21                    |
|                             | <b>5</b>     | Ouledrabeh                       | 93,13±0,18                    |
|                             | <b>6</b>     | Sidi abdelaziz                   | 67,64±0,74                    |
|                             | <b>7</b>     | El kala                          | 23,84±2,51                    |
|                             | <b>8</b>     | Blida                            | 77,98±1,97                    |
|                             | <b>9</b>     | El wafia                         | 59,26±5,98                    |
|                             | <b>10</b>    | Zazia                            | *                             |
|                             | <b>11</b>    | Belkis                           | 11,25±2,42                    |
|                             | <b>12</b>    | Zahret-Atibaa                    | *                             |
|                             | <b>13</b>    | Sultane                          | 53,09±4,02                    |
|                             | <b>14</b>    | El fourssane                     | 19,49±3,31                    |
|                             | <b>15</b>    | El milia                         | 94,00±0,04                    |
|                             |              | Standard acide gallique (5µg/mL) | 48,08± 2,84                   |

**NB :** \* Les échantillons Zazia (10) et Zahret-Atibaa (12) ne sont pas analysés par manque de quantité.

**1.2 Activité antiradicalaire ABTS**

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> a été déterminée selon le procédé de Clarck et al (2013). On note une forte capacité de piégeage du radical ABTS pour tous les échantillons sauf pour l'huile et l'insaponifiable de l'échantillon Akbou 2017(3), et les huiles de Sidi Abdelaziz (6) et Blida (8). On peut noter qu'il n'y a pas de corrélation entre le piégeage du radical DPPH et celui du radical ABTS.

**Tableau 24 :** % Efficacité ABTS des huiles de lentisques et des insaponifiables à 200 µg/mL.

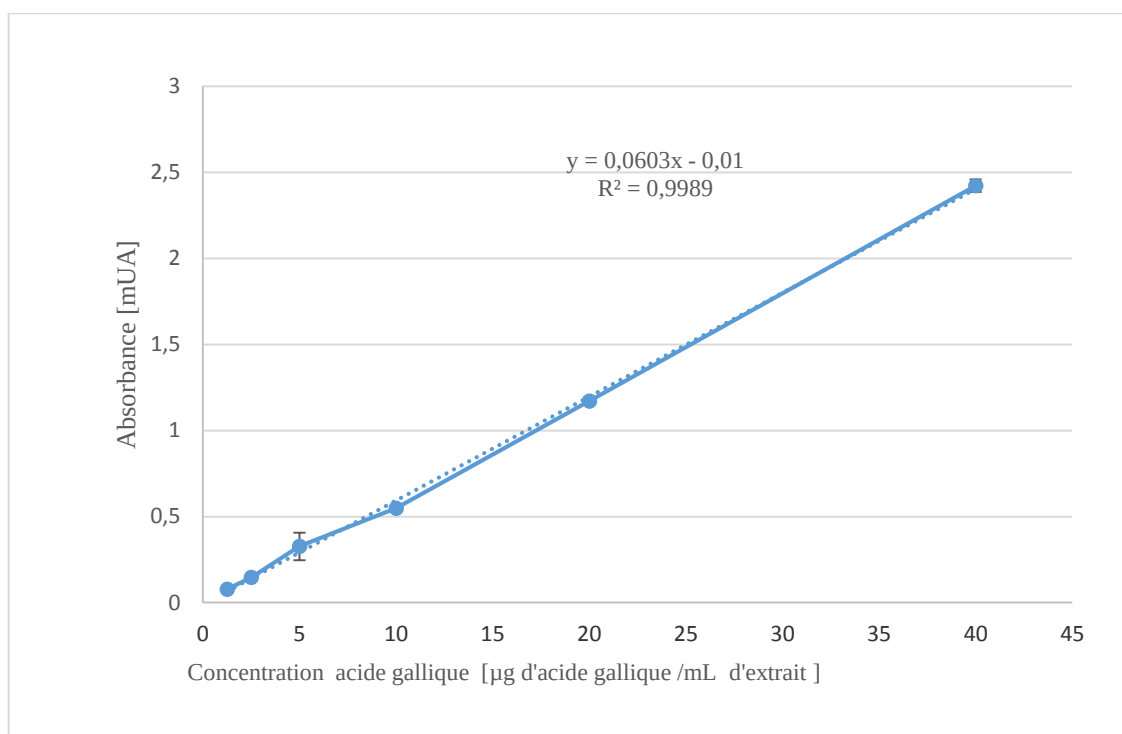
| Nature de L'échantillon       | Code  | Nom de l'échantillon | % Efficacité ABTS à 200 µg/mL |
|-------------------------------|-------|----------------------|-------------------------------|
| Insaponifiable                | 3 BIS | Akbou 2017           | 37,44± 0,29                   |
|                               | 7 BIS | Elkala               | 99,18± 0,14                   |
|                               | 8 BIS | Blida                | 99,13±0,08                    |
| L'huile de fruit de lentisque | 1     | Bouanani             | 98,54± 0,32                   |
|                               | 2     | Akbou 2015           | 100,00± 0,24                  |
|                               | 3     | Abbou 2017           | 83,30± 3,78                   |
|                               | 4     | Settara              | 99,13± 0,21                   |
|                               | 5     | Ouledrabeh           | 99,41± 0,29                   |
|                               | 6     | Sidi abdelaziz       | 76,84± 8,44                   |
|                               | 7     | El kala              | 100± 0,36                     |
|                               | 8     | Blida                | 55,19± 2,06                   |
|                               | 9     | El wafia             | 90,62± 0,84                   |
|                               | 10    | Zazia                | *                             |
|                               | 11    | Belkis               | 99,04± 0,50                   |
|                               | 12    | Zahret-Atibaa        | *                             |
|                               | 13    | Sultane              | 98,35± 1,22                   |
|                               | 14    | El fourssane         | 87,60± 1,20                   |
|                               | 15    | El milia             | 99,77± 0,16                   |
|                               |       | Standard de Trolox   | 56.43± 0.62                   |

**NB :** \* Les échantillons Zazia (10) et Zahret-Atibaa (12) ne sont pas analysés par manque de quantité. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures± Ecart type.

## 2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

### 2.1 Teneurs en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode Folin-Ciocalteu en utilisant l'acide gallique comme standard, la teneur en composés phénoliques des huiles de lentisque et des insaponifiables a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Figure 48).



**Figure 48 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique utilisée pour la détermination des composés phénoliques.

A partir de l'équation de régression  $y = 0,060x - 0,01$ , on calcule la concentration en polyphénols totaux des huiles de fruit de lentisque et des insaponifiables.

D'après l'analyse des résultats obtenus du tableau (ci-dessous), on remarque que les teneurs en composés phénoliques des huiles de fruit de lentisque sont comprises entre  $0,40 \pm 0,9$  et  $6,84 \pm 1,62$  mg équivalent d'acide gallique/g. Pour les échantillons insaponifiables d'Elkala (**7 BIS**), Akbou 2017 (**3 BIS**) et Blida (**8 BIS**), on note des teneurs en polyphénols variant entre  $2,07 \pm 2,54$  et  $6,30 \pm 0,35$  mg équivalent AG/g. On se référant à la littérature, on trouve une seule étude portant sur les composés phénoliques présents dans l'huile, celle de Bensaci et Hadj Mokhnache (2015) qui a

relevé une teneur en polyphénols de  $1,80 \pm 0,23 \mu\text{g Eq AG/mg}$  de l'huile de fruit de lentisque, ce qui est assez proche de nos résultats.

On peut comparer nos résultats avec d'autres travaux réalisés sur les autres parties de *Pistacia lentiscus*. Les études de Djedaia (2016) et Piluzza et al (2011) ont décrit respectivement des teneurs moyennes en polyphénols de  $154,34 \pm 2,5 \text{ mg AG/g}$  et  $147,68 \text{ mgEq AG/g}$  de matière sèche dans les extraits de fruits de lentisque. Par ailleurs, Bampouli et al (2015) ont noté des teneurs en composés phénoliques pour les feuilles fraîches de *Pistacia lentiscus*, variait de  $147,99 \pm 0,01$  à  $314,88 \pm 0,01 \text{ mg Eq AG/g}$

D'après ces résultats on peut conclure que les teneurs en composés polyphénoliques dans les huiles de fruit de lentisque sont très faibles par rapport aux teneurs trouvées dans les extraits de feuilles et de fruits de lentisque. Grati Kammoun et al. (1999), montrent que l'évolution de la teneur en polyphénols de l'huile est en relation avec la maturation du fruit qui passe par un maximum au début de la saison. Cette teneur tend à diminuer jusqu'à la récolte des fruits au moment de la production de l'huile, période au cours de laquelle, la présence des polyphénols devient très faible. De plus, les composés phénoliques sont globalement peu lipophiles, et cette faible teneur peut être attribué d'après Papoti et al., 2015, à la faible teneur en eau du fruit.



**Tableau 25 :** Teneurs en polyphénols totaux des huiles de lentisques et des insaponifiables.

| Nature de L'échantillon       | Code  | Nom del'échantillon | Polyphénols en mg AG/g |
|-------------------------------|-------|---------------------|------------------------|
| Insaponifiable                | 3 BIS | Akbou 2017          | 2,08±1,55              |
|                               | 7 BIS | Elkala              | 2,07±2,54              |
|                               | 8 BIS | Blida               | 6,30±0,35              |
| L'huile de fruit de lentisque | 1     | Bouanani            | 1,42±0,81              |
|                               | 2     | Akbou 2015          | 2,69±1,47              |
|                               | 3     | Abbou 2017          | 01,16±0,47             |
|                               | 4     | Settara             | 02,57±1,98             |
|                               | 5     | Ouledrabe           | 01,35±0,97             |
|                               | 6     | Sidi abdelaziz      | 01,49±0,14             |
|                               | 7     | El kala             | 00,00±0,99             |
|                               | 8     | Blida               | 03,93± 05,38           |
|                               | 9     | El wafia            | 00,41± 01,86           |
|                               | 10    | Zazia               | *                      |
|                               | 11    | Belkis              | 01,46±0,047            |
|                               | 12    | Zahret-Atibaa       | *                      |
|                               | 13    | Sultane             | 06,84± 01,62           |
|                               | 14    | El fourssane        | 04,75± 03,79           |
|                               | 15    | El milia            | 01,34±0,81             |

**NB :** \* Les échantillons Zazia (10) et Zahret-Atibaa ne sont pas analysés par manque de quantité. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures± Ecart type.

## 2.2 Teneurs en flavonoïdes totaux

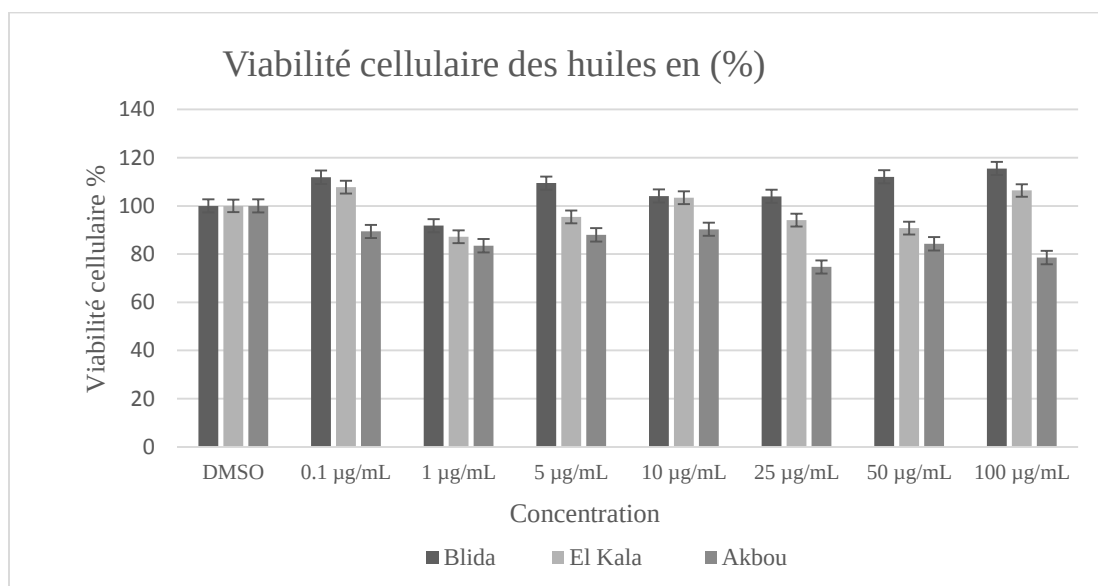
Les résultats des teneurs en flavonoïdes totaux des huiles de fruits de lentisque et des extraits insaponifiables montrent l'absence de flavonoïdes. Ces résultats sont proches de ceux présentés par Bensaci et Hadj Mokhnache (2015), qui ont trouvé une faible teneur en flavonoïdes  $0,38 \pm 0,02$  en  $\mu\text{g}$  Eq quercétine/mg d'huile de lentisque.

Ces résultats peuvent être justifiés par la nature apolaire des huiles de lentisque d'une part et par la dissolution des composés phénoliques suivant le degré de polarité d'une autre part. En effet,

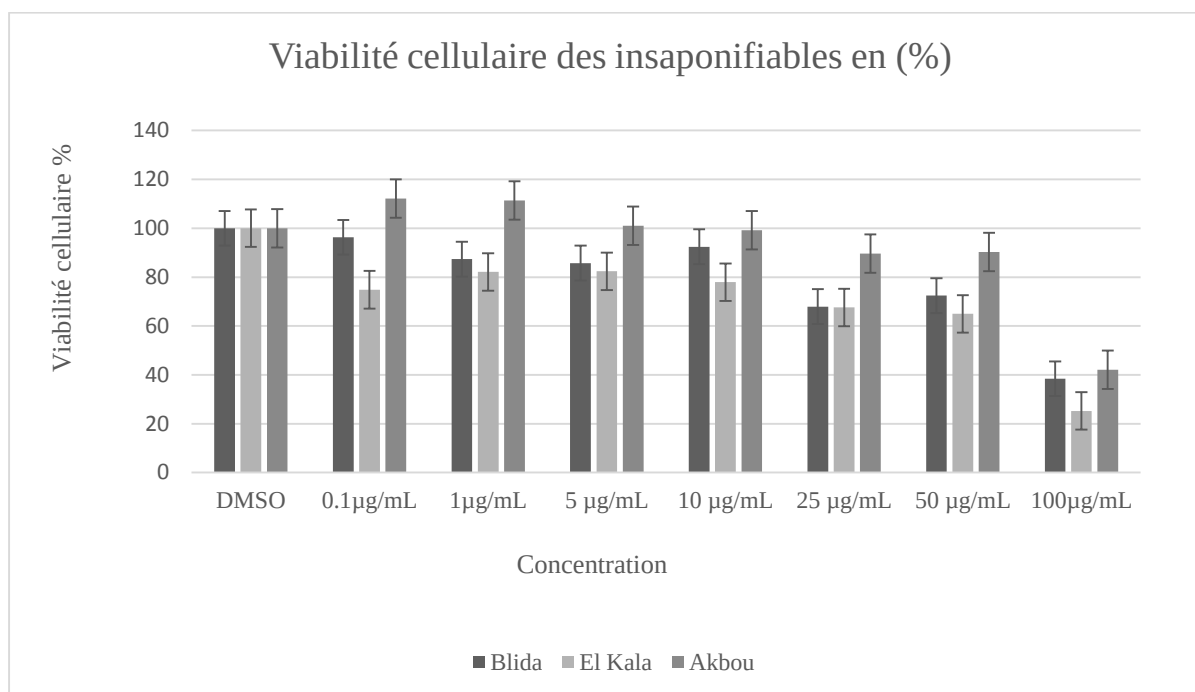
Berboucha (2008) montre que les extraits aqueux, chloroformique, et hexanique des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont les plus riches en flavonoïdes, suivis par les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle. Cette approche a été confirmée également par l'étude de Cheraft(2011), qui a montré que les flavonoïdes sont concentrés principalement dans extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* avec  $270,10 \pm 8,00$  mg Eq rutine/g d'extrait.

### 3. Évaluation cytotoxique des fibroblastes cutanés humains normaux (NHDF)

L'essai de viabilité cellulaire effectué sur les cellules NHDF révèle une faible toxicité des échantillons d'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* pour les concentrations allant de 0,1 à 100µg/mL (figure 49).Cependant, nous avons noté une perte de viabilité pour tous les échantillons insaponifiables partir de 10 µg/mL et supérieure à 40% pour les 3 échantillons à 100µg/mL (figure 50). Ces résultats peuvent être liés à la présence de métabolites identifiés tels que les caroténoïdes, les phytostérols mais aussi les dérivés alkylsalicyliques qui peuvent être plus concentrés dans la fraction insaponifiable.



**Figure 49 :** Viabilité cellulaire (%) des huiles de fruit de *Pistacia lentiscus* sur fibroblastes (NHDF).

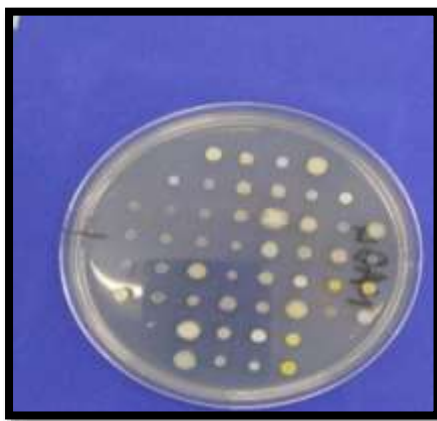


**Figure 50 :** Viabilité cellulaire des insaponifiables sur fibroblastes (NHDF).

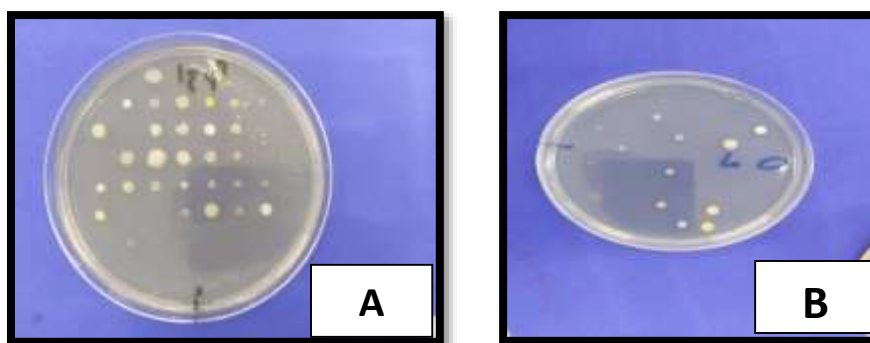
#### 4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Cette partie de notre travail a visé à évaluer l'effet antibactérien des 14 échantillons d'huiles de fruit de *Pistacia lentiscus* ainsi que les trois insaponifiables d'Akbou 2017(**3 BIS**), Elkala (**7 BIS**) et Blida (**8 BIS**). Il est à noter que l'huile de Blida n'est pas testée par manque de quantité.

Le test de criblage sur 52 souches bactériennes du panel aérobie (voir annexe), effectué sur les extraits insaponifiables et les huiles de lentisque à (200 µg /g) avec l'utilisation de l'ofloxacine comme contrôle positif et le DMSO comme contrôle négatif, n'a révélé aucun effet antibactérien. Par contre, le second screening effectué sur les 32 souches du panel anaérobie (Tableau 25), effectué pour les mêmes échantillons du panel aérobie a révélé une activité antibactérienne seulement pour deux échantillons d'huiles de lentisque (**7**), (**3**) et trois échantillons des insaponifiables (**3 BIS**), (**7 BIS**) et (**8 BIS**).



**Figure 51 :** Exemple du résultat négatif du screening de l'activité antibactérienne (panel aérobie) d'huile de lentisque.



**Figure 52 :** Résultat positif du screening de l'activité antibactérienne (panel anaérobie) d'huile de lentisque Elkala et insaponifiable Blida. (Photo A = Insaponifiable Blida (**8 BIS**), photo B = L'huile Elkala(7).

**Tableau 26** : Résultats de l'activité antibactérienne des huiles de lentisque et des insaponifiables (200µg/ml) testé sur les bactéries anaérobies.

|    | Référenc                    | Souches bactériennes              | Elkala<br>(7 BIS) | Akbou 2017<br>(3 BIS) | Blida<br>(8 BIS) | Elkala(7) | Akbou 2017<br>(3) |
|----|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------|-------------------|
| 1  | IP56.1                      | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | +                     | +                | +         | +                 |
| 2  | SA06115001                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | +                     | +                | +         | +                 |
| 3  | 1402063306                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | +                 | +                     | +                | +         | +                 |
| 4  | 1403028901                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | +                 | +                     | +                | +         | +                 |
| 5  | 1403026670                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | -                 | +                     | +                | +         | +                 |
| 6  | 1405029394                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 7  | 1406032731                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | -                 | -                     | +                | -         | +                 |
| 8  | CIP 102914T                 | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | +                 | -                     | +                | -         | +                 |
| 9  | CIP 107086                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | +                 | -                     | +                | -         | +                 |
| 10 | 1506004788                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | +                     | +                | -         | -                 |
| 11 | 1603033400                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 12 | 1611018383                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | +                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 13 | 1607071059                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | -                 | -                     | -                | -         | +                 |
| 14 | 1610100575                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | +                 | -                     | -                | -         | +                 |
| 15 | 1611014813                  | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | -                 | -                     | -                | -         | +                 |
| 16 | 1612036981                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 17 | ATCC<br>49619/CIP<br>104340 | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 18 | 1703050320                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 19 | 1703044361                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 20 | 1705075622                  | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | +                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 21 | 1709081199                  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 22 | CIP 103.227                 | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 23 | SA 1108 4768                | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 24 | UR 1201 2651                | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |
| 25 | 1308024250                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 26 | 1308025066                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 27 | 1308033490                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | +                 | +                     | -                | -         | -                 |
| 28 | 1308033077                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | -         | +                 |
| 29 | 1308049949                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 30 | 1308050230                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 31 | CIP 53 117                  | <i>Propionibacterium acnes</i>    | -                 | -                     | -                | +         | +                 |
| 32 | 1402025741                  | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | -                 | -                     | -                | -         | -                 |

(+) : L'échantillon testé de l'huile de *Pistacia lentiscus* ou de l'insaponifiable présente une activité bactéricide.

(-) : L'échantillon testé de l'huile de *Pistacia lentiscus* ou de l'insaponifiable n'a aucun effet sur

les souches bactériennes testés.

D'après l'analyse des résultats représentés dans le tableau 25, on peut tirer les observations suivantes :

- toutes les huiles ont montré une activité antibactérienne sur les souches de *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae*. Cependant les huiles ne sont pas actives sur les souches de *Streptococcus agalactiae*, cette activité est variable sur *S. dysgalactiae*.
- Les deux échantillons d'huiles de lentisque d'Akbou (3) et Elkala (7) se sont montrés actifs sur *Propionibacterium acnes* (1308033490).
- Les insaponifiables ont montré une activité antibactérienne proche de celle des huiles sauf pour les souches de *Propionibacterium acnes*, ce qui met en avant le rôle important des acides gras dans cette activité.
- L'huile d'Akbou (3) présente une activité antibactérienne contre 21 souches, par contre celui d'Ekala (7) contre 14 souches.

| Code    | Nom d'échantillons        | Nombre de souches inhibées par les huiles et les insaponifiables |
|---------|---------------------------|------------------------------------------------------------------|
| (3)     | Huile Akbou 2017          | 21 souches                                                       |
| (7)     | Huile Elkala              | 14 souches                                                       |
| (7 BIS) | Insaponifiable Elkala     | 12 souches                                                       |
| (7 BIS) | Insaponifiable Blida      | 9 souches                                                        |
| (3 BIS) | Insaponifiable Akbou 2017 | 7 souches                                                        |

## 5. Evaluation de la toxicité aiguë et subaiguë

Parmi les 14 échantillons collectés, nous avons décidé d'évaluer la toxicité de l'huile de fruit de lentisque récolté à Akbou 2017(3) au niveau de la de la coopérative Ladjoudane.

### 5.1 La toxicité aiguë

Les modifications cliniques des trois groupes expérimentaux (témoin, souris traitées avec dose D1 (2000mg/Kg), souris traitées avec dose D2 (5000 mg/Kg), ont été cliniquement et physiologiquement normaux pendant la période expérimentale. Seuls quelques signes cliniques habituellement observés comme l'anorexie, l'hypoactivité, qui sont réversibles, sont apparus chez les souris pendant une courte période. L'absence de signes cliniques graves et de souris mortes durant les 14 jours d'observation, indique que l'huile de lentisque administrée par voie orale est dépourvue de toxicité aiguë chez les souris. Donc, la dose létale aiguë approximative DL<sub>50</sub> de

l'huile de lentisque testée chez les souris mâles était estimée supérieure à 5000 mg/kg. Les mêmes observations ont été notées pour le lot de souris femelles traitées avec les deux doses : 2000 mg/kg, 5000 mg/kg. L'étude de Boukeloua et ses collaborateurs (2012), montre que la DL50 de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* par voie orale et de 37ml/Kg de poids corporel et de 2.52 ml/Kg de poids corporel par voie intra péritonéale. Ces résultats montrent la faible toxicité de cette huile.

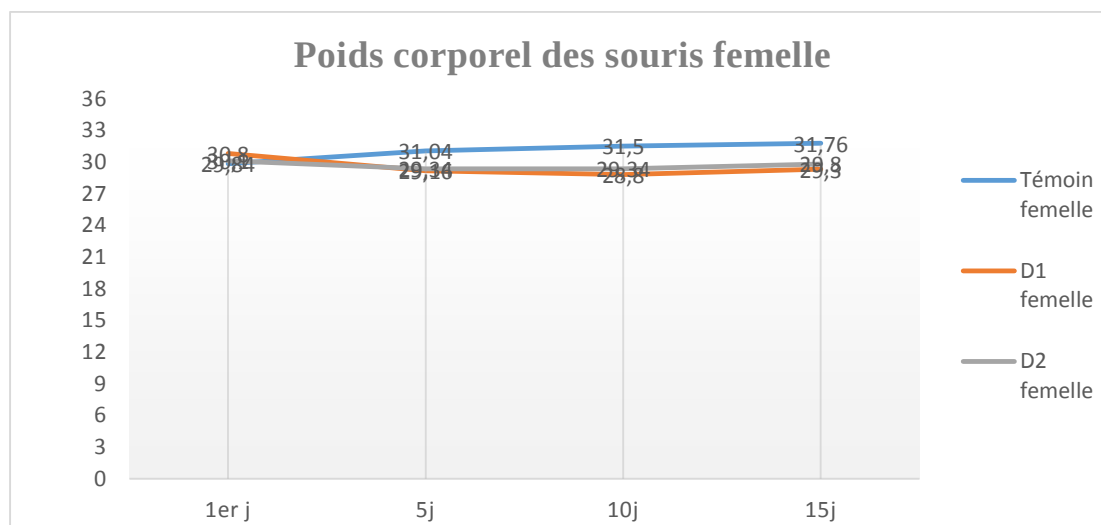
### 5.1.1 Poids corporel

Le poids corporel des souris femelles avec leurs témoins est présenté dans les Tableaux 26.

**Tableau 27 :** Poids corporel des souris femelle traitées à l'huile de fruit de lentisque comparé avec le lot témoin (toxicité aiguë).

| Jours             | Témoins     | 2000 mg/kg  | 5000 mg/kg  |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 <sup>er</sup>   | 29,84±0,859 | 30,8±0,758  | 30,1±0,725  |
| 5 <sup>ème</sup>  | 31,04±0,710 | 29,16±0,654 | 29,34±0,911 |
| 10 <sup>ème</sup> | 31,5±0,925  | 28,8±0,864  | 29,34±0,906 |
| 15 <sup>ème</sup> | 31,76±0,575 | 29,3±0,892  | 29,8±0,800  |

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=4/5), comparés avec le groupe témoin.



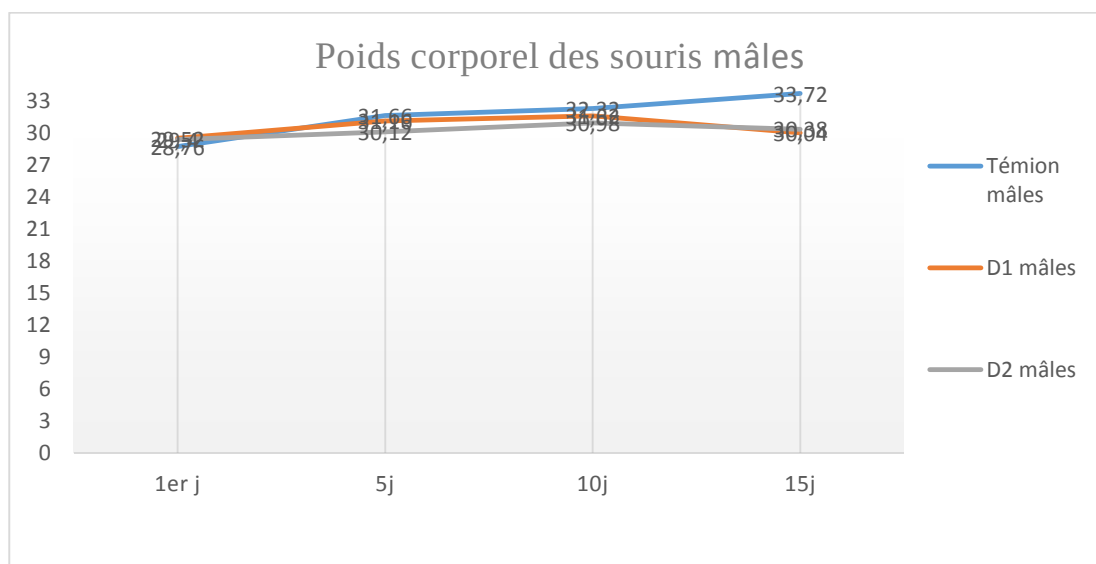
**Figure 53 :** Evolution du poids corporel chez les souris femelles traitées avec les doses de 2000 mg /Kg(D1) et 5000 mg/Kg(D2) de l'huile de fruit de lentisque d'Akbou 2017(3).

Les résultats du poids corporel des souris mâles avec leurs témoins sont présentés dans le Tableau en dessous (27).

**Tableau 28 :** Poids corporels chez les souris mâles pendant toxicité aiguë.

| Jours             | Témoins     | 2000 mg/kg    | 5000 mg/kg  |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|
| 1 <sup>er</sup>   | 29,84±0,859 | 30,8±0,758    | 30,1±0,725  |
| 5 <sup>ème</sup>  | 31,66±0,916 | 31,16±1,133   | 30,12±1,079 |
| 10 <sup>ème</sup> | 32,32±1,302 | 31,62±1,140   | 30,98±1,107 |
| 15 <sup>ème</sup> | 33,72±1,175 | 30,04±0,834 * | 30,38±0,930 |

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=4/5), (\*P<0.005) comparés avec le groupe témoin.



**Figure 54 :** Evolution du Poids corporel chez les souris mâles traitées avec les doses de 2000 mg/Kg (D1) et 5000 mg/Kg (D2) de l'huile de fruit de lentisque d'Akbou 2017(3).

Les animaux ont été pesés le jour de gavage (J0) et la mesure du poids est suivie régulièrement tout au long de l'expérience (J0, J5, J10, et J15). Au début de l'expérience, on remarque qu'il n'existe pas de différence significative entre les poids de différents groupes (mâles et femelles). Par contre, la différence est enregistrée entre les témoins et les groupes mâles et femelles. La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette réduction du poids peut être



expliquée par une réduction de la consommation de l'aliment, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée.

### 5.1.2 Poids relatif des organes

Les résultats du poids des organes des souris femelles et des souris mâles avec leurs témoins sont récapitulés dans les Tableaux 28 et 29 respectivement.

**Tableau 29** : Poids relatif des organes chez les souris femelles après un traitement de 15 jours.

| Organes | Témoins     | 2000 mg/kg  | 5000 mg/kg  |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| Foie    | 0,050±0,006 | 0,042±0,001 | 0,045±0,002 |
| Reins   | 0,011±0,001 | 0,010±0,001 | 0,014±0,004 |
| Poumons | 0,007±0,000 | 0,006±0,000 | 0,007±0,000 |
| Cœur    | 0,004±0,000 | 0,004±0,000 | 0,004±0,000 |

Effet de l'huile sur le poids relatifs des organes des souris femelles, les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=4/5), comparés avec le groupe témoin.

**Tableau 30** : Poids relatif des organes chez les souris mâles après un traitement de 15 jours.

| Organes | Témoins     | 2000 mg/kg  | 5000 mg/kg   |
|---------|-------------|-------------|--------------|
| Foie    | 0,055±0,002 | 0,056±0,003 | 0,057±0,002  |
| Reins   | 0,014±0,000 | 0,013±0,000 | 0,018±0,001* |
| Poumons | 0,006±0,000 | 0,006±0,000 | 0,006±0,000  |
| Cœur    | 0,004±0,000 | 0,004±0,000 | 0,004±0,000  |

Effet de l'huile sur le poids relatifs des organes des souris mâles, les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=4/5), (\*P<0.05) comparés avec le groupe témoin.

Après l'examen macroscopique des différents organes prélevés in-situ des différents groupes de souris, on a observé que leurs tailles et leurs formes sont normales.

D'après la lecture des résultats, on remarque que l'évolution du poids relatif des organes pendant 15 jours d'expérimentation est stable pour les différents groupes. Néanmoins, on note une augmentation du poids relatif des reins par rapport aux témoins dans la dose (5000 mg/kg) chez les souris des deux lots (mâles et femelles) traitées par l'huile de fruit de lentisque. Généralement, le changement du poids des organes internes est un indice de toxicité après l'exposition à une

substance toxique (Raza et al., 2002). Cette augmentation du poids du foie, peut être liée aussi à une congestion par réservation du sang dans le foie (Rasekh et al., 2008).

### 5.1.3 Paramètres biochimiques

L'analyse statistique des paramètres biochimiques a été enregistrée dans les Tableaux 30 et 31 respectivement.

**Tableau 31 :** Paramètres biochimiques chez souris mâles dans toxicité aiguë (n=4/5).

| Paramètres  | Contrôle       | 2000 mg/kg     | 5000 mg/kg    |
|-------------|----------------|----------------|---------------|
| <b>ALAT</b> | 261,635±8,279  | 174,306±6,937* | 231,76±2,763  |
| <b>ASAT</b> | 99,945±1,981   | 69,99±5,285    | 80,704±3,620  |
| <b>PAL</b>  | 285,97 ±12,447 | 211,89±13,588  | 281,008±8,637 |
| <b>GLUC</b> | 1,25±0,021     | 0,99±0,082     | 1,032±0,036   |
| <b>CREA</b> | 6,275±0,064    | 6,786±0,210    | 5,528±0,475   |
| <b>CHOL</b> | 1,605±0,028    | 1,338±0,0596   | 2,000±0,076   |
| <b>TRIG</b> | 2,66±0,060     | 1,626±0,092*   | 2,208±0,060   |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4/5). (\*P<0.05). **ALAT** : Alaline aminotransférase. **ASAT** : Aspartate aminotransférase. **PAL** : Phosphatase alcaline. **GLUC** : Glucose. **CREA** : Créatinine. **CHOL** : Cholestérol. **TRIG** : Triglycéride.

**Tableau 32:** Paramètres biochimiques chez les souris femelles traités par l'huile de fruit de lentisque au cours de la toxicité aiguë (n=4).

| Paramètres  | Contrôle       | 2000 mg/kg    | 5000 mg/kg     |
|-------------|----------------|---------------|----------------|
| <b>ALAT</b> | 213,66±7,690   | 191,672±3,976 | 201,288±2,174  |
| <b>ASAT</b> | 123,568±4,826  | 59,504±1,468* | 80,208 ±3,636  |
| <b>PAL</b>  | 331,264±16,672 | 423,36±13,222 | 351,864±15,988 |
| <b>GLUC</b> | 1,31±0,0139    | 1,8±0,035     | 1,765±0,0274   |
| <b>CREA</b> | 8,48±0,223     | 6,32±0,375    | 8,63±0,494     |
| <b>CHOL</b> | 1,184±0,052    | 1,248±0,031   | 1,48±0,038     |
| <b>TRIG</b> | 1,992±0,091    | 2,704±0,094   | 2,288±0,072    |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4). (\*P<0.05). **ALAT** : Alaline aminotransférase. **ASAT** : Aspartate aminotransférase. **PAL** : Phosphatase alcaline. **GLUC** : Glucose. **CREA** : Créatinine. **CHOL** : Cholestérol. **TRIG** : Triglycéride.

Les études sériques effectuées sur les souris traitées par huile de fruit de lentisque montrent une augmentation significative des paramètres PAL, TRIG et GLUC, sauf pour la TRIG du lot mâle où on a observé une diminution par rapport aux groupes témoins. Quant aux paramètres de

l'ALAT, ASAT, CREA et CHOL, on note une diminution de leurs valeurs chez les femelles pour la dose 2000 mg/kg par rapport aux témoins et des paramètres ALAT, ASAT, PAL, CHLO, TRIG chez les mâles par rapport aux témoins. Les autres paramètres ne montrent pas de changements significatifs. L'ASAT est une enzyme considérée comme un bon indicateur de la fonction hépatique (Hilaly et al., 2004) et un biomarqueur pour prédire la toxicité éventuelle (Rahman et al., 2001). En générale l'élévation des transaminases dans le sang est un indice de dommage des cellules parenchymateuses du foie (Wolf et al. 1972).

## 5.2 La toxicité subaiguë (21 jours)

L'effet de l'administration orale de l'huile de fruit de lentisque sur le comportement général des souris des deux lots mâles et femelles qui ont reçu les deux doses (2000 mg /kg et 5000 mg /kg) de l'huile de fruit de lentisque n'ont pas montré des signes de toxicité. Ni morbidité ni mortalité et aucun changement n'a été observé pendant la période expérimentale de 21 jours. Ces résultats concordent avec l'étude de toxicité subchronique chez les lapins menée par Maameri-Habibatni, 2014, sur les doses orales testées (0,5 mL/kg ; 1 mL/kg et 2 mL/kg) pour l'huile de fruit de lentisque.

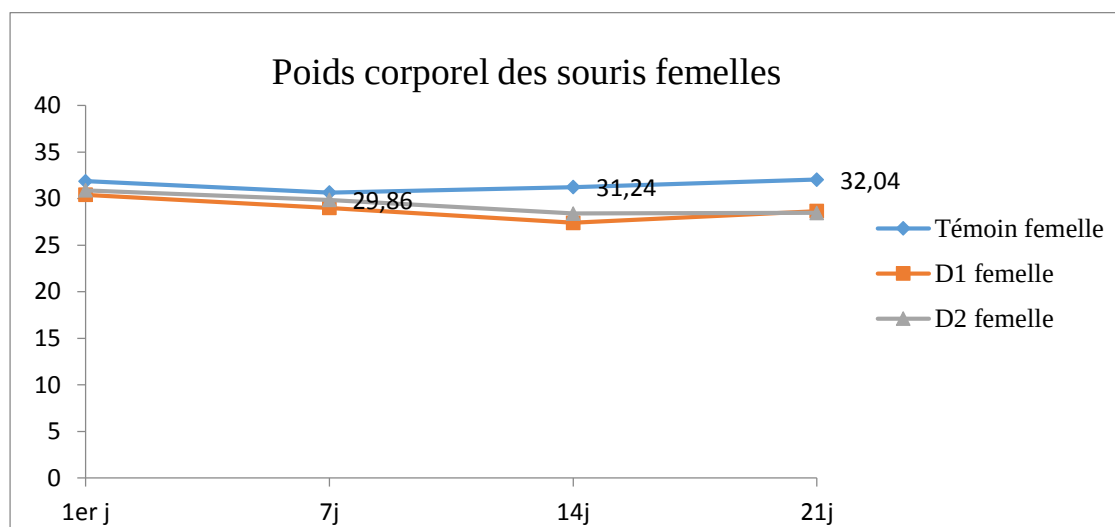
### 5.2.1 Poids corporel

Les résultats de l'évaluation pondérale obtenus sont résumés dans les tableaux 32 et 33 respectivement.

**Tableau 33 :** Poids corporel chez les souris femelles pendant toxicité subaiguë.

| Jours             | Témoins     | 2000 mg/kg   | 5000 mg/kg   |
|-------------------|-------------|--------------|--------------|
| 1 <sup>er</sup>   | 31,88±0,784 | 30,42±0,357  | 30,9±0,292   |
| 7 <sup>ème</sup>  | 30,66±0,689 | 29±0,351     | 29,86±0,308  |
| 14 <sup>ème</sup> | 31,24±0,998 | 27,4±0,888*  | 28,40 ±0,603 |
| 21 <sup>ème</sup> | 30,66±0,689 | 28,66±0,805* | 28,46±5,737* |

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=4/5). (\*P<0.05) comparés avec le groupe témoin.

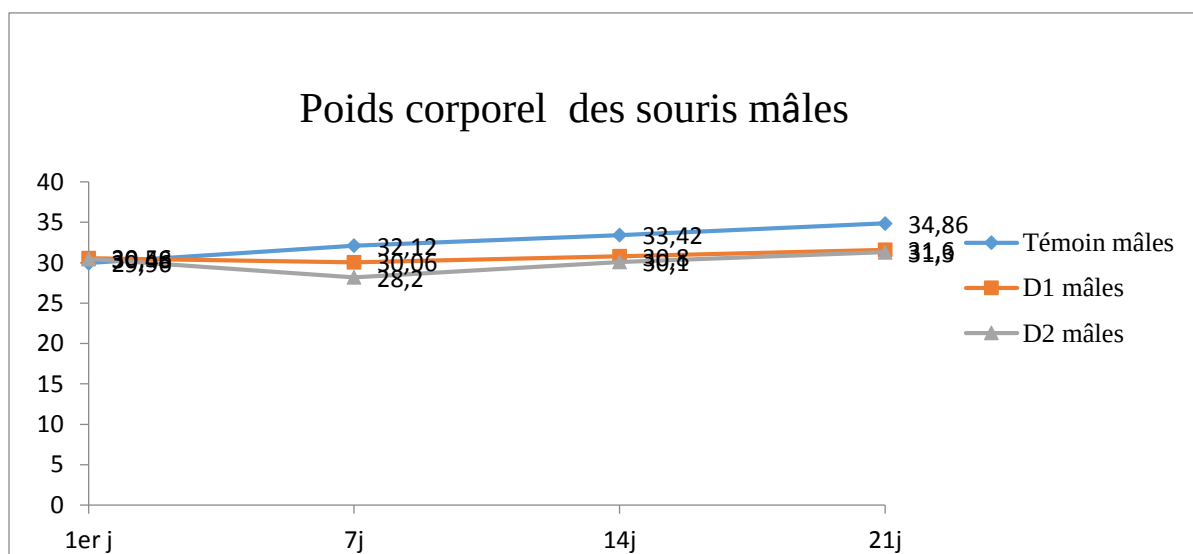


**Figure 55 :** Evolution du Poids corporel chez les souris femelles traitées avec les doses de 2000 mg /Kg (D1) et 5000 mg/Kg (D2) de l'huile de fruit de lentisque d'Akbou 2017(3).

**Tableau 34 :** Poids corporel chez les souris mâles pendant toxicité subaiguë.

| Jours             | Témoins     | 2000mg/kg     | 5000mg/kg     |
|-------------------|-------------|---------------|---------------|
| 1 <sup>er</sup>   | 29,96±0,766 | 30,56±0,581   | 30,48±0,628   |
| 7 <sup>ème</sup>  | 32,12±0,509 | 30,06±0,505   | 28,2±0,823*   |
| 14 <sup>ème</sup> | 33,42±0,456 | 30,87±0,548** | 30,1±0,468*** |
| 21 <sup>ème</sup> | 34,86±0,945 | 31,67±1,143   | 31,37±1,088   |

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=5). (\*P<0,05 ; \*\*P<0,01. \*\*\*P<0,001) comparés avec le groupe témoin.



**Figure 56 :** Evolution du Poids corporel chez les souris mâles traitées avec les doses de 2000 mg /Kg (D1) et 5000 mg/Kg (D2) de l'huile de fruit de lentisque d'Akbou 2017(3).

D'après l'analyse des résultats, on constate une diminution du poids corporel des souris des témoins pour les doses testées. La diminution du poids corporel au cours des 21 jours de traitement quotidien suggère que l'administration subaiguë et par voie orale d'huile de fruit de lentisque a des effets sur la croissance des souris. Des analyses complémentaires doivent être effectuées.

### 5.2.2 Poids relatif des organes

Les résultats du poids des organes des souris testées par l'huile de fruit de lentisque, après un traitement de 21 jours sont représentés dans les tableaux 34 et 35 respectivement.

**Tableau 35 :** Poids relatif des organes chez les souris femelles après un traitement de 21 jours par l'huile de fruit de lentisque.

| Organes | Témoins     | 2000 mg/kg   | 5000 mg/kg    |
|---------|-------------|--------------|---------------|
| Foie    | 0,047±0,000 | 0,054±0,002* | 0,052±0,000   |
| Reins   | 0,010±0,000 | 0,010±0,000  | 0,010±0,000   |
| Cœur    | 0,004±0,000 | 0,004±0,000  | 0,003±0,000** |

Effet de l'huile sur le poids relatifs des organes des rats mâles. Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4/5). (\*P<0,05. \*\*P<0,01) comparés avec le groupe témoin.

**Tableau 36 :** Poids relatifs des organes chez les souris mâles après un traitement de 21 jours par l'huile de fruit de lentisque.

| Organes | Témoins     | 2000 mg/kg   | 5000 mg/kg  |
|---------|-------------|--------------|-------------|
| Foie    | 0,059±0,004 | 0,044±0,0145 | 0,060±0,017 |
| Reins   | 0,013±0,000 | 0,010±0,003  | 0,010±0,002 |
| Cœur    | 0,004±8,16  | 0,003±0,001  | 0,003±0,000 |

Effet de l'huile sur le poids relatifs des organes des rats femelles. Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4/5) comparés avec le groupe témoin.

Après l'examen macroscopique des différents organes prélevés *in situ*, on a observé que leurs tailles et leurs formes sont normales, par contre une augmentation de la masse relative des reins chez les deux sexes de souris (mâles et femelles).

## 5.2.3 Paramètres biochimiques

Les résultats des paramètres biochimiques pour les deux lots de souris avec leurs témoins, sont récapitulés dans les tableaux 36 et 37 respectivement.

**Tableau 37 :** Paramètres biochimiques chez souris femelles traités par l'huile de fruit de lentisque pendant la toxicité subaiguë (n4/5).

| Paramètres  | Contrôle       | 5000 mg/kg     |
|-------------|----------------|----------------|
| <b>ALAT</b> | 169,896±12,859 | 121,176±3,295  |
| <b>ASAT</b> | 79,518±6,172   | 71,656±1,463   |
| <b>PAL</b>  | 262,218±6,680  | 278,668±11,310 |
| <b>GLUC</b> | 1,224±0,037    | 1,120±0,025    |
| <b>CREA</b> | 4,672±0,467    | 7,035±0,058    |
| <b>CHOL</b> | 1,026±0,035    | 1,024±0,049    |
| <b>TRIG</b> | 1,494±0,069    | 1,624±0,055    |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4). (\*P<0,05. \*\*P<0,01). **ALAT** : Alaline aminotransférase. **ASAT** : Aspartate aminotransférase. **PAL** : Phosphatase alcaline. **GLUC** : Glucose. **CREA** : Créatinine. **CHOL** : Cholestérol. **TRIG** : Triglycéride.

**NB** : absence du lot de la dose 2000 mg/kg, par insuffisance du plasma et du sang.

**Tableau 38 :** Paramètres biochimiques chez souris mâles traités par l'huile de fruit de lentisque pendant la toxicité subaiguë (n=4/5).

| Paramètres  | Contrôle      | 2000 mg/kg    | 5000 mg/kg    |
|-------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>ALAT</b> | 159,036±1,687 | 151,71±6,978  | 161,271±9,460 |
| <b>ASAT</b> | 47,5575±4,052 | 38,88±1,820   | 93,322±8,497  |
| <b>PAL</b>  | 200,616±9,640 | 213,51±10,414 | 296,565±8,088 |
| <b>GLUC</b> | 1,098±0,067   | 1,25±0,027    | 1,521±0,022   |
| <b>CREA</b> | 5,7±0,586     | 5,95±0,244    | 4,340±0,082   |
| <b>CHOL</b> | 1,008±0,029   | 1,1±0,049     | 1,512±0,040   |
| <b>TRIG</b> | 1,014±0,028   | 0,85±0,024    | 1,387±0,062   |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=4/ 5). (\*P<0,05. \*\*P<0,01). **ALAT** : Alaline aminotransférase. **ASAT** : Aspartate aminotransférase. **PAL** : Phosphatase alcaline. **GLUC** : Glucose. **CREA** : Créatinine. **CHOL** : Cholestérol. **TRIG** : Triglycéride.

Les résultats des paramètres biochimiques effectués sur les souris du lot mâle traité par l'huile de fruit de lentisque montrent une augmentation non significative des paramètres PAL, TRIG et GLUC, TRIG pour les deux doses (**2000 mg/kg** et **5000 mg/kg**). Par contre, on remarque une augmentation non significative de l'ALAT et de CREA pour la dose 5000 mg/kg et une diminution de ces paramètres pour la dose 2000 mg/kg. Quant à le lot des souris femelles, la comparaison des paramètres a été limitée sur la dose (5000 mg/kg) à cause de la faible quantité de plasma. Une augmentation non significative a été noté pour : PAL, CREA et TRIG contre une diminution non significative pour le reste des paramètres (ALAT, ASAT, CHOL et GLUC).

D'après l'analyse de ces résultats, on constate que nos résultats concordent avec l'étude de Boukeloua 2009, pour uniquement les paramètres urée et créatinine. En effet, il a montré que ces paramètres n'ont pas subi de modification significative chez les populations de lapins traités à l'huile de fruit de lentisque par rapport au contrôle. Néanmoins, on trouve que les résultats de Boukeloua, 2009 ne concordent pas avec les nôtres pour les paramètres glycémie et transaminases (une augmentation de glycémie ( $p < 0,001$ )).

En conclusion, les doses orales testées pour l'huile de fruit de lentisque dans l'étude de toxicité aiguë et sub-aiguë chez les souris testées avec les deux doses (2000 mg/kg et 5000 mg/kg), peuvent être considérées comme non toxiques. Elles n'ont pas causé de létalité, de changement dans le comportement général des animaux ainsi que pour la majorité des paramètres biochimiques.

### Conclusions et perspectives de la section II

Nos résultats sur les activités biologiques et toxicologiques sont assez prometteurs. Concernant l'activité antiradicalaire, une forte activité a été relevée pour la plupart des échantillons à la concentration de 200 µg/mL d'huile.

Concernant les activités antimicrobiennes, toutes les huiles ont montré une activité antibactérienne sur les souches de *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae*. Cependant les huiles ne sont pas actives sur les souches de *Streptococcus agalactiae*, et cette activité est variable sur *S. dysgalactiae*. Les deux échantillons d'huiles de lentisque d'Akbou (3) et Elkala (7) se sont montrés actifs sur *Propionibacterium acnes* (1308033490). Ce résultat est intéressant compte-tenu de l'application cosmétique potentielle de cette huile puisque *Propionibacterium acnes* est impliquée dans les problèmes d'acné.

Pour les insaponifiables ont montré une activité antibactérienne proche de celle des huiles sauf pour les souches de *Propionibacterium acnes*, ce qui met en avant le rôle important des acides gras dans cette activité.

Concernant la toxicité, on a pu observer une absence de cytotoxicité *in vitro* des huiles sur les fibroblastes humains, cependant, une toxicité a été observée à concentration élevée pour les insaponifiables. Ceci est plutôt encourageant concernant l'utilisation de l'huile comme ingrédient en cosmétique. Cependant, les insaponifiables ne peuvent pas être envisagés comme ingrédient en cosmétique.

Concernant les études *in vivo* par voie orale chez la souris, l'échantillon d'huile Akbou 2017 a montré une absence de toxicité aigüe et sub-aigüe, à la dose de 2g et de 5g par jour. Ce résultats est encourageant et montre que la présence d'acides ginkgoliques dans l'huile n'a pas entraîné de toxicité chez l'animal par voie orale. Cependant, il serait intéressant d'évaluer la toxicité par voie orale d'échantillons contaminés par le plomb, ce qui n'est pas le cas de cet échantillon.



**Références bibliographiques**

- 1- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K., 2014. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. Journal of Fundamental and Applied Sciences 6 (1), 77-79.
- 2- Association Française De Normalisation-Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés-AFNOR.1984. 3édition, Paris.
- 3- Application book, Soil total digestion –HRR-EN-13, MilestoneSRL-helpingChemists.05-11. ([www.milstonesrl.com/application@milstonesrl.com](http://www.milstonesrl.com/application@milstonesrl.com)).
- 4- Assimipoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. BiomedicalChromatography 19, 285-311.
- 5- Balan, K.V., Demetzos, C., Prince, J., Dimas, K., Cladaras, M., Han, Z., Wyche, J.H., Pantazis, P., 2005. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product. Chios mastic gum. In Vivo 19, 93-102.
- 6- Bachrouch, O., Msaada, K., AidiWannes, W., Talou, T., Ksouri, R., Salem, N., 2015. Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. Plant Biosystematics 149, 38-47.
- 7- Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E., Ibijbjen, J., Nassiri, L., 2015. Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. » Etude ethnobotanique, screening phtochimique et pouvoir antibactérien, Journal of applied Biosciences 86, 7966-7975.
- 8- Bakircioglu, D., Bakircioglu, Y., Yurtsever, S., 2012. Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. Food Chemistry 138, 770-775.
- 9- Belhadj, S., 2000. Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, p108.
- 10- Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopee Marocaine Traditionnelle : Medecine Arabe Et Savoirs Populaires. Editions Le Fennec, (Ed.) (Eds.), Ibis Press, Casablanca, Morocco, p764.

- 11- Belfadel, F.Z., 2009. Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* : Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques (effet cicatrisant chez le rat), mémoire de Magister, université de Constantine, p136.
- 12- Boukeloua, A., 2009. Caractérisation botanique et chimique et évaluation pharmacotoxicologique d'une préparation topique à base de l'huile de *Pistacia lentiscus* L. thèse de magister en Biologie. Spécialité : Biotechnologie végétal. Université Constantine1, p108.
- 13- Bouyahya, A., Chadon-Assemiana, I., Mouzounta, H., Bouraisa, I., Et-Touysa, A., Fellah, H., Benjouad, A., Dakkaa, A., Bakria, 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 & Products 128, 62-69.
- 14- Benhammou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T.K., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacology 2, 22-28.
- 15- Bampouli, A., Konstantina, k., Georgios, P., Vasiliki, L., Nektarios, A., Kostis, Ma., Magdalini, K., 2015. Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves extracts using UHPLC-HRMS, Journal Engineering 167 (A), 25-31.
- 16- Bereau, D., 2001. huiles et fraction insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens, thèse de doctorat, p 130.
- 17- Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Benboubetra, M., 2010. Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. Journal of Medicinal Food 13 (4), 1-9.
- 18- Bensaci, M., Hadj-mokhnache, M., 2015. Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus*. Mémoire de master en Sciences Biologiques, Université des Frères Mentouri Constantine1, p 38.
- 19- Bensalem, G., 2015. L'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) dans l'Est algérien : Caractéristique physicochimiques et composition en acides gras, mémoire de magister en sciences alimentaires, université Constantine, p 105.
- 20- Boutemine, I., Amri M, Zine-Charat A, Fitting C, Mecherara-Idjeri S, Layaida K, Sennoun N, Berkane S, Cavaillon J-M, Touil-Boukoffa C, 2018. Gastro-protective, therapeutic and

- anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats, *Journal of Ethnopharmacology* 224, 273-282.
- 21- Brenes, M., Garcia, A., Rios, J., Garcia, P., Garrido, A., 2002. Use of 1-acetoxypinoresinol to autenticatePicual olive oils, the international *Journal of Food Science and Technology* 37 (6), 615-625.
- 22- Cheurfa, M., Allem, R., 2015. Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25, 142-144.
- 23- Djedaia, S., 2016. Etude physicochimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). Thèse de doctorat en science. Spécialité : chimie Analytique et physique. Université Badji mokhtar-Annaba, p103.
- 24- Della-Penna, D., Pogson, B.J., 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 7,711-738.
- 25- Evrard, J., Pages, X.P.X., Argenson, C., Morin, O., 2007. Procédés d'obtention et composition nutritionnelles des huiles de tournesol, olive et colza. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42 (1),13-23.
- 26- Djerrou, Z., Maameri, Z., Hamdi-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., Boukeloua, A., 2010. Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 7(3), 258-263.
- 27- Djerrou, Z., 2014. Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolkfed rabbits: a comparative study with simvastatin. *Chinese Journal of Natural Medicines* 12 (8), 0561-0566.
- 28- Dhifi, W., Jelali, N., Chaabani, E., Beji, M., Fatnassi, S., Omri, S., Mnif, W., 2013. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *African Journal of Agricultural Research* 8(16), 1395-1400.
- 29- Hmimsa, Y., 2004. L'agrobiodiversité dans les agrosystèmes traditionnels de montagnes : Cas du Rif marocain. Mémoire de troisième cycle, Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc, p 100.

- 30- Julve, Ph., 2020. Base flore. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version: 27 avril 2020.  
(<http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>. visité le 4-9-2020).
- 31- Quezel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, p 611.
- 32- Maameri-Habibatni, Z., 2014. *Pistacia lentiscus* L.: Evaluation pharmacotoxicologique, thèse de doctorat en science : Pharmacologie Toxicologie. Université Constantine 1, p102
- 33- Mamane, L., 2017. Etude de *Pistacia lentiscus*-famille des Anacardiaceae, thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Paris-Descartes, p68.
- 34- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarc, S., Perrin, D., Gerardin, P., Atmani, D., 2016. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus*. Journal of Food and Drug Analysis 24, 653-666.
- 35- Mezni, F., Shili, S., Ben-Ali, N., Larbi-Khouja, M., Khaldi, A., Maaroufi, A., 2016. Evaluation of *Pistacia lentiscus* seed oil and phenolic compounds for in vitro Antiproliferative effects against BHK21 cells. Pharmaceutical Biology 54, NO. 5, 747-751.
- 36- Palevitch, D., Yaniv, Z., 2000. Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, 9-88.
- 37- Saadoun, S.N., 2002. Types stomatiques du genre *Pistacia*: *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* et *Pistacia lentiscus* L., p369.
- 38- Seigue, A., 1985. La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. Edit. Maison neuve et La rose. Paris. p138.
- 39- Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukhchina, S., Mayer, P., 2012. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. Journal of Food Chemistry 131, 434-440.
- 40- Bereau, D., 2001. Huiles et fraction insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens, thèse de doctorat, p 130.
- 41- Bouteldj, F., Kadjoudj, Z., 2013. Étude des paramètres physico-chimiques de l'huile de fruits de pistachier lentisque : *Pistacia lentiscus* L. (Drou) de Mila et de Jijel. Mémoire

- d'ingénieur d'Etat en Nutrition et en Technologies Agro-Alimentaires, I.N.A.T.A.A. Université Constantine1, p 68.
- 42- Clarke, G.,Ting, K.,Wiart,C.,Fry, J.,2013. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the M. Antioxidants 2, 1-10.
  - 43- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radical Research 31(4), 261-272.
  - 44- Hartmut, K., Lichtenthaler. 1987. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic Biomembranes, Methods in enzymology 148, 350-382.
  - 45- Jasminca, G., 2001.Determination of aliphatic alcohols, squalene,  $\alpha$ -tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. The royal society of chemistry472-475.
  - 46- Kabata-pendias, A., Pendias H., 2001. Trace elements in soils and plants.3rd Edition. CRC Press Boca Raton London, p403.
  - 47- Khachik, F., 2006. Distribution and metabolism of dietary carotenoids in humans as a criterion for development of nutritional supplements. Pure and Applied Chemistry 78(8), 1551–1557.
  - 48- Lanfranchi, F.,1999. La fabrication d'huile de lentisque (*Linsticu ou chessa*) en Sardaigne. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée.
  - 49- Lawal, A., Manganaro, J., Goodall, B., Farrauto, R., 2015. Pt based Bi-metallic Monolith Catalysts for Partial Upgrading of Microalgae Oil – United States.
  - 50- Markus, W.L., Peter, A.B., 1982. Determination of the oxidative stability of fats and determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. Journal of the American Oil Chemists' Society 163, 792-795.
  - 51- More,D.,White, J.,2005.Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, p 797.

- 52- Nijveldt, R.J., Nood, E. V., Hoorn, D. E. V., Boelens, P. G., Norren, K. V., Leeuwen, P. A., V., 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418-425.
- 53- Ollivier, D., 2003. Recherche d'adultération dans les huiles végétales : application à la qualité des huiles vierges et notamment de l'huile d'olive. *Oilseeds and facts, Crops and Lipids* 1010(4), 315-320.
- 54- O.E.C.D., 2008. Guidance 425 for the testing of chemicals, Acute Oral Toxicity –up- and down-procedure UPD, p 27.
- 55- Rampersad, S.N., 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel)* 12 (9), 12347-12360.
- 56- Sanchez-Moreno, C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology* 8, 121-137.
- 57- Tarek, A., Moussa, A., Omar, A., Almaghrabi., 2016. Fatty acid constituents of *Peganum harmala* plant using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 397-403.
- 58- Abate-Pella D, Freund, D. M, Slovin, J. P., Hegeman, A. D., & Cohen, J. D. 2017. An improved method for fast and selective separation of carotenoids by LC-MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1067, 34-37.
- 59- Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., 2008. Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 921-924.
- 60- Cheraft, N., 2011. Activité biologique in vitro des extraits de *Pistacia lentiscus* contre les radicaux ABTS•+, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> et •NO et caractérisation des fractions actives, Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister En Biologie Option : Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives. Université de Bejaïa-Abderrahmane Mira, p146.

- 61- Djerrou, Z., 2014. Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk fed rabbits: a comparative study with simvastatin. Chinese Journal of Natural Medicines 12 (8), 561-566.
- 62- Dhifi, W., Jelali, N., Chaabani, E., Beji, M., Fatnassi, S., Omri, S., Mnif, W., 2013. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. African Journal of Agricultural Research 8 (16), 1395-1400.
- 63- Djedaia, S., 2016. Etude physicochimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia lentiscus* L.).Thèse de doctorat en science. Spécialité : chimie Analytique et Physique.Université Badji mokhtar-Annaba, p103.
- 64- Hartmut,K., Lichtenthaler.,1987.Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic Biomembranes, Methods in enzymology 148, 350-382.
- 65- Franke,K.,Masaoud,M.,Schmidt,J.,2001. Cardanols from leaves of *Rhus thyrsoiflora*. Planta Medica 67 (5), 477-479.
- 66- Lacoste, H., Lechat, X., Pages, J.N., Arnaud, E., Brenne, B., Soulet, B., Camisuli, C., Birot, S., Fazeuilh, J., Escabasse,2005.,Contrôle des composés indésirables dans les huiles végétales et mise en place d'observatoires, Oilseeds and facts, Crops and Lipids 12 ( 5-6), 377.
- 67- GratiKammoun,N., Khelif, M., Ayadi, M., Rekik, H., Rekik,B.,Hamdi,M.T.,1999. Evolution des caractéristiques chimiques de l'huile au cours de la maturation des olives. Revue Ezzaitouna 5, 30-46.
- 68- Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V.,Caboni, M. F.,2010.Chromatographic techniques for the determination of alkyl-phenols, tocopherols and other minor polar compounds in raw and roasted cold pressed cashew nut oils. Journal of chromatography: A 1217 (47), 7411-7417.
- 69- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions11 (5), 591-592.
- 70- Markus, W., Laubli.,Peter, A.,Bruttel., 1982. Determination of the oxidative stability of fats and determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active

- oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. Journal of the American Oil Chemists' Society 163, 792-795.
- 71- Mecherara-Idjeri S., Hassani A., Vincent Castola V., Casanova, J., 2008. Composition and Chemical Variability of the Essential Oil from *Pistacia lentiscus* L. Growing Wild in Algeria: Part II: Fruit Oil, Journal of Essential Oil Research 20 (2), 104-107.
- 72- Mezni, F., Maaroufi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Larbi-Khouja, M., Khaldi, A., 2012. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. Journal of Medicinal Plants Research 6 (39), 5266-5271.
- 73- Sabolova, M., Johanidesova, A., Hasalikova, E., Fisnar, J., Dolezal, M., Réblova, Z., 2017. Relationship between the composition of fats and oils and their oxidative stability at different temperature, determined using the oxipres apparatus. European Journal Lipid Sciences and Technology 119, 16600454.
- 74- Papoti, V., Monopati, E., Efthimiadis, F., Zinoviadou, K. G., Adamidis, T., 2015. Olive Oil Stability in the Presence of lemon balm and rosemary. International Journal of Innovative Research and Practice 2, 1-9.
- 75- Piluzza, G., Bullitta, S., 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. Pharmaceutical biology 49(3), 240-247.
- 76- Song, Y.S., Jin, C., Park, E.H., 2000. Identification of metabolites of phytosterols in rat feces using GC/MS. Archives of Pharmacal Research 23(6), 599-604.
- 77- Trabelsi H., Cherif O. A., Sakouhi F., Villeneuve P., Renaud J., Barouh N., Boukhchina S. et Mayer P. 2012. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. Journal of Food Chemistry, 131, 434-440.
- 78- Tahrioui A., Ortiz S., Azuama, O. C., Bouffartigues, E., Benalia, N., Tortuel, D., Maillot, O., Chemat, S., Kritsanida, M., Feuilloley, M., Orang, N., Michel, S., Lesouhaitier, O., Cornelis, P., Grougnet R., Bouteffnouchet, S., Chevalier, S. 2020. Membrane –Interactive Compounds from *Pistacia lentiscus* L. Thwart *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. Frontiers in microbiology 11, 1068.



- 79- Wyllie, S., Brophy, J.J., Sarafis, V., Hobbs, M. 2006. Volatile Components of the Fruit of *Pistacia lentiscus*. Journal of Food Science and Technology 55, 1325 - 1326.
- 80- Rasekh, H.R., Nazari, P., Kamli-Nejad, M., Hosseinzadeh, L., 2008. Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. Journal of Ethnopharmacology 116, 21-26.
- 81- El Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology 91(1), 43-50.
- 82- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K., Jamil, K., 2001. Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. Human and Experimental Toxicology 20, 243-249.
- 83- Wolf, P.L., Williams, D., Tsudaka, T., Acosta, L., 1972. Methods and Techniques in Clinical Chemistry. John Wiley & Sons, USA, 132-196, 375-383.

# **ANNEXES SECTION II**

## Annexes section II

Tableau1 : Composés identifiés dans NIST – Fraction PLFE1 silylée (PDM-1)

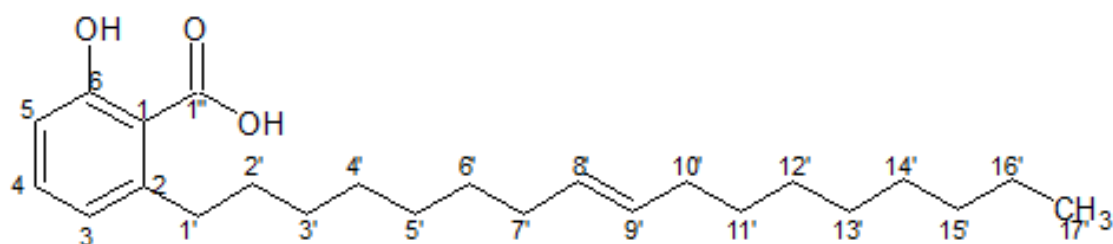
| Tr (min) | Aire    | % Aire | Composé identifié dans NIST                                                   |
|----------|---------|--------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 6,527    | 108422  | 1,50   | Palmitic Acid, TMS derivative                                                 |
| 7,362    | 523371  | 7,24   | Palmitic Acid, TMS derivative                                                 |
| 8,683    | 138275  | 1,91   | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative                                     |
| 9,077    | 309060  | 4,28   | 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative                              |
| 9,126    | 473291  | 6,55   | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative                                     |
| 10,956   | 101966  | 1,41   | Cholesterol, TMS derivative                                                   |
| 11,937   | 168150  | 2,33   | 2-Butenedioic acid, (E)-, 2TMS derivative                                     |
| 12,492   | 127802  | 1,77   | Silane, dimethyldihexyloxy-                                                   |
| 12,862   | 127290  | 1,76   | 1-Monopalmitin, 2TMS derivative                                               |
| 13,555   | 1457672 | 20,17  | Ginkgoneolicacid (2TMS)                                                       |
| 14,279   | 90667   | 1,25   | 2H-2,4a-Methanonaphthalene, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-1,1,5,5-tetramethyl-, (2S)- |
| 14,920   | 92236   | 1,28   | 1-Monooleoylglycerol, 2TMS derivative                                         |
| 16,019   | 240177  | 3,32   | Ginkgolicacid15:1 (2TMS)                                                      |
| 16,218   | 394461  | 5,46   | Ginkgolicacid15:1 (2TMS)                                                      |
| 16,303   | 1086687 | 15,04  | Hydroginkgolicacid (2TMS)                                                     |
| 17,055   | 174571  | 2,42   | 2H-2,4a-Methanonaphthalene, 1,3,4,5,6,7-hexahydro-1,1,5,5-tetramethyl-, (2S)- |
| 19,793   | 813927  | 11,26  | Retene                                                                        |
| 20,023   | 138413  | 1,92   | D-Glucuronic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester |
| 20,313   | 82785   | 1,15   | Fluanisone                                                                    |
| 20,400   | 90502   | 1,25   | 3,5-Di-tert-butylbenzoic acid                                                 |
| 24,094   | 43776   | 0,61   | 2-Palmitoylglycerol, 2TMS derivative                                          |
| 24,332   | 56967   | 0,79   | Oxybenzone                                                                    |

|        |        |      |                                             |
|--------|--------|------|---------------------------------------------|
| 30,419 | 26660  | 0,37 | .beta.-Sitosterol, TMS derivative           |
| 32,722 | 106947 | 1,48 | Lupeoltrimethylsilylether                   |
| 40,602 | 96077  | 1,33 | Urs-12-en-28-al, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.)- |
| 43,411 | 36228  | 0,50 | Urs-12-en-28-al, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.)- |
| 52,251 | 66063  | 0,91 | Betulin                                     |
| 59,658 | 53447  | 0,74 | Cycloartanol                                |

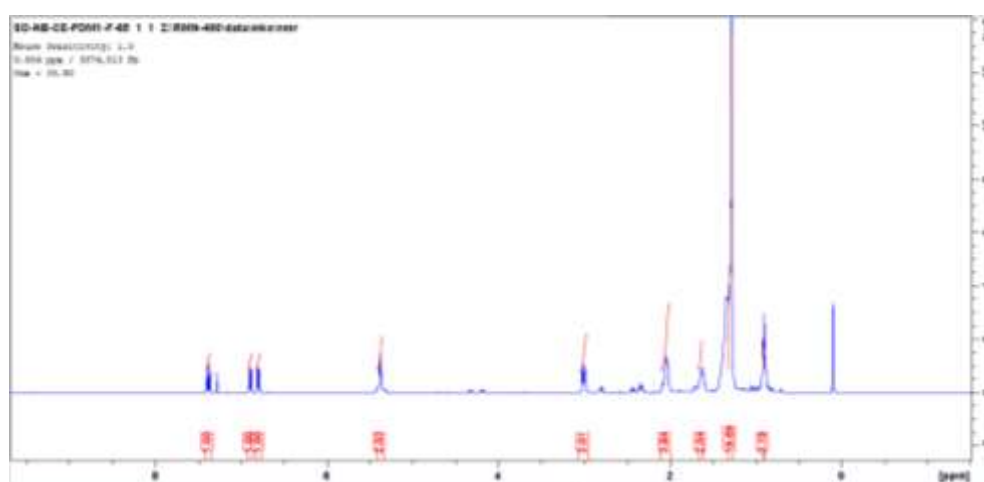
**Tableau2 : Composés identifiés dans NIST – Fraction PDM-6 silylée**

| Tr (min) | Aire   | Aire (%) | Composé identifié dans NIST                                          |
|----------|--------|----------|----------------------------------------------------------------------|
| 3,061    | 67185  | 2,62     | Cyclohexene, 4-ethenyl-                                              |
| 7,367    | 671430 | 26,23    | Palmitic Acid, TMS derivative                                        |
| 9,082    | 307558 | 12,02    | 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative                     |
| 9,130    | 689283 | 26,93    | 9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative                            |
| 9,377    | 62769  | 2,45     | Stearicacid, TMS derivative                                          |
| 9,536    | 14382  | 0,56     | Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative                                     |
| 12,871   | 38233  | 1,49     | 1-Monopalmitin, 2TMS derivative                                      |
| 13,556   | 257417 | 10,06    | Ginkgoneolicacid (2TMS)                                              |
| 14,920   | 46847  | 1,83     | 1-Monooleoylglycerol, 2TMS derivative                                |
| 16,020   | 112116 | 4,38     | Ginkgolicacid15:1 (2TMS)                                             |
| 16,210   | 57118  | 2,23     | Arabinonic acid, 2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, .gamma.-lactone, d- |
| 16,299   | 86647  | 3,39     | Hydroginkgolicacid (2TMS)                                            |
| 19,793   | 48482  | 1,89     | Glycerol, 3TMS derivative                                            |
| 20,020   | 43638  | 1,70     | 2,6-di-tert-Butyl-4-(dimethylaminomethyl)phenol                      |
| 30,419   | 30981  | 1,21     | Aromandendrene                                                       |
| 30,475   | 25367  | 0,99     | Ergosta-4,22-dien-3-one                                              |

Analyse structurale de l'acide heptadecen-8-yl salicylique  $\Delta 8$  - C17:1, isolé de la fraction apolaire PLFE1 de fruits de *P. lentiscus*



$^1\text{H}$  NMR of  $\Delta 8$  - C17:1 (solvant  $\text{CDCl}_3$ ).

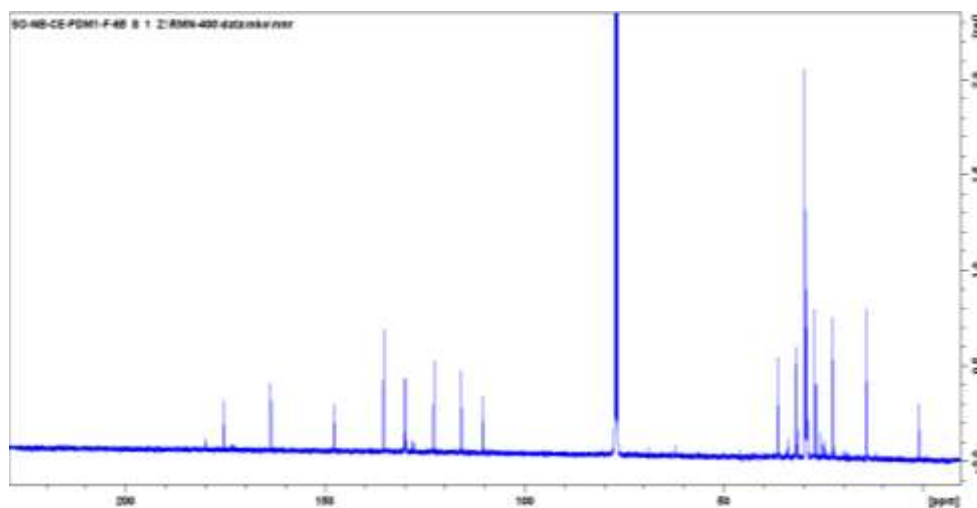


| $\delta$ (ppm) | Intégration | Multiplicité du signal | $J$ (Hz) | Attribution            |
|----------------|-------------|------------------------|----------|------------------------|
| 7,36           | 1 H         | Triplet                | 8,2      | H4                     |
| 6,88           | 1 H         | Doublet                | 8,3      | H5                     |
| 6,78           | 1 H         | Doublet                | 8,3      | H3                     |
| 5,36           | 2 H         | Triplet                | 4,6      | H8', H9'               |
| 2,98           | 2 H         | Triplet                | 7,7      | H1'                    |
| 2,04           | 4 H         | Multiplet              | -        | H7', H10'              |
| 1,63           | 2 H         | Multiplet              | -        | H2'                    |
| 1,28           | 20 H        | Multiplet              | -        | H3' – H6', H11' – H16' |
| 0,88           | 3 H         | Triplet                | 6,1      | H17'                   |

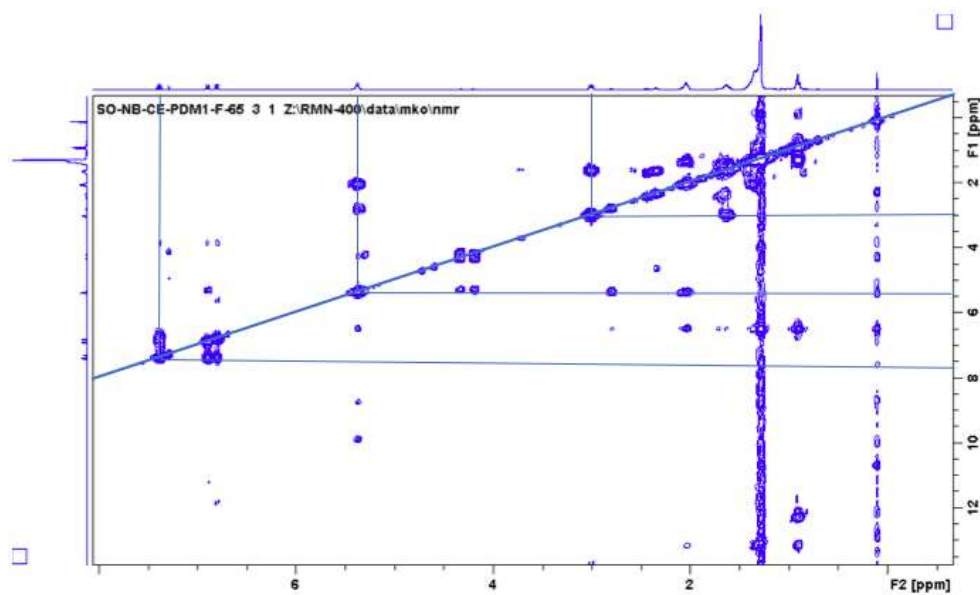
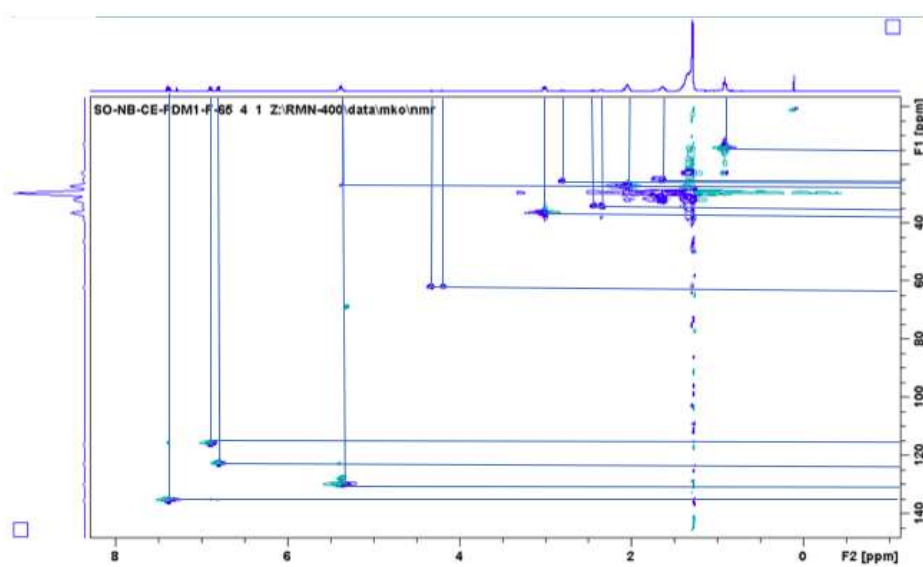
$^{13}\text{C}$  RMN de  $\Delta 8$  - C17:1,

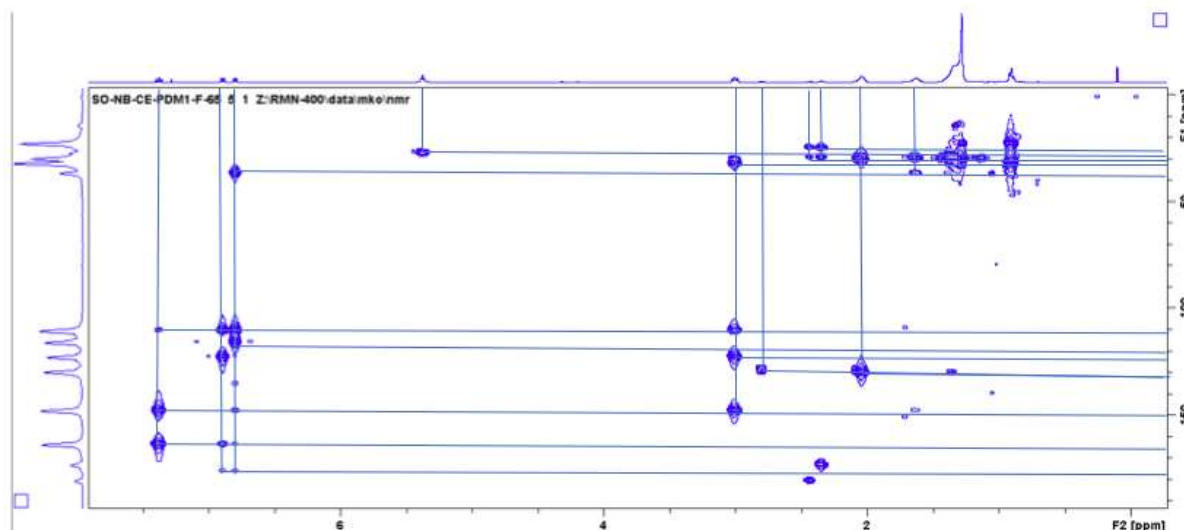
| $\delta$ (ppm) | Attribution                |
|----------------|----------------------------|
| 163,6          | C 6                        |
| 115,9          | C 3                        |
| 135,4          | C 4                        |
| 122,7          | C 5                        |
| 147,7          | C 2                        |
| 110,4          | C 1                        |
| 175,5          | C 1''                      |
| 130,0 (*)      | C 8' (*)                   |
| 129,8 (*)      | C 9' (*)                   |
| 36,5           | C 1'                       |
| 32,0           | C 2'                       |
| 29,0           | C 3' – C 6', C 11' – C 16' |
| 27,2 (**)      | C 7' (**)                  |
| 26,9 (**)      | C 10' (**)                 |
| 14,1           | C 17'                      |

$^{13}\text{C}$  RMN of  $\Delta 8$  - C17:1,



$^1\text{H} - ^1\text{H} - \text{COSY}$  of  $\Delta 8$  - C17:1,

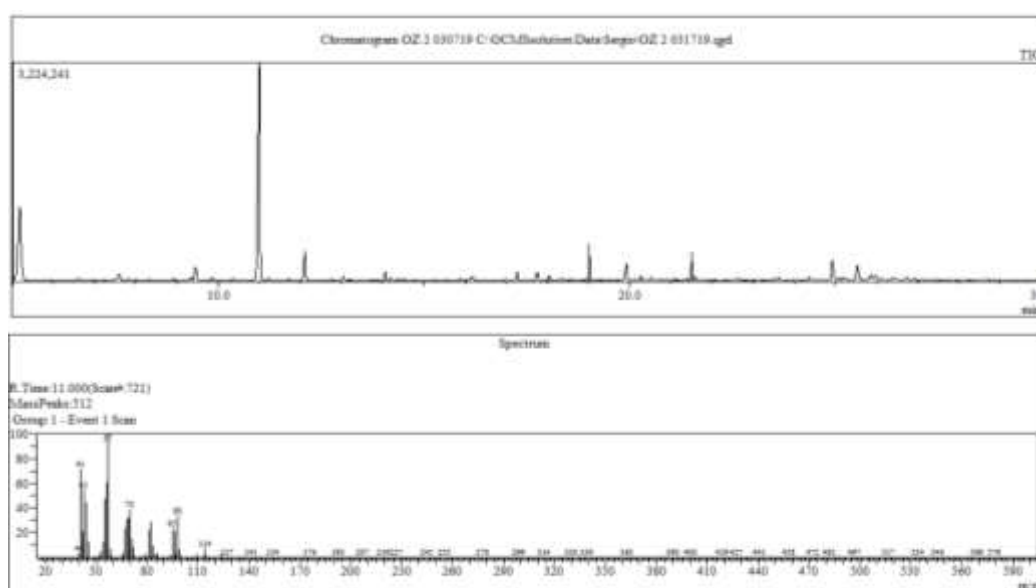
HSQC de  $\Delta 8$  - C17:1HMBC of  $\Delta 8$  - C17:1,



## ATTRIBUTIONS

| $\delta$ (ppm)              | Attribution                             |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
| 7,36 / 135,4                | C4 – H4                                 |
| 6,88 / 115,9                | C5 – H5                                 |
| 6,78 / 122,7                | C3 – H3                                 |
| 5,36 / 130,0 ; 5,36 / 129,8 | C8' - H8' (*), C9' - H9' (*)            |
| 2,98 / 36,5                 | C 1' – H1'                              |
| 2,04 / 27,2 ; 2,04 / 26,9   | C7' – H7' (**), C10' - H10' (**)        |
| 1,63 / 32,0                 | C2' – H2'                               |
| 1,28 / 29,0                 | C 3'-H3' – C 6'-H6', C11'-H11' – C 16'- |
| 0,88 / 14,1                 | C17' – H17'                             |

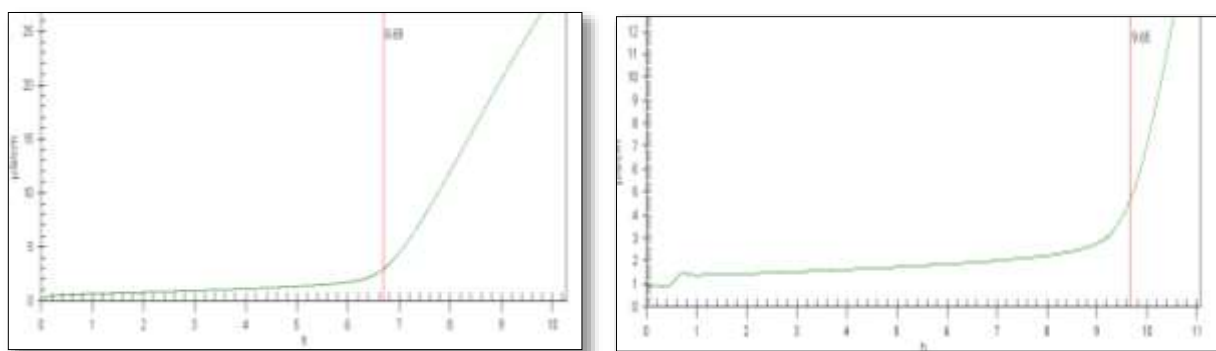
## Analyse GC-MS du produit d'ozonolyse



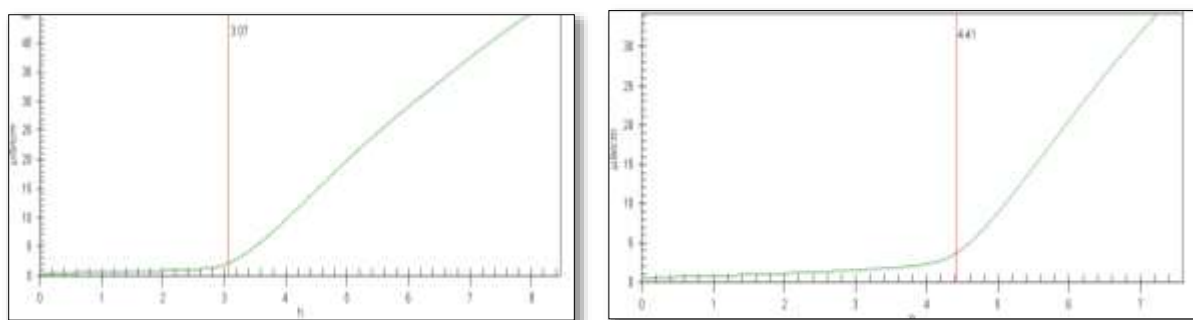
Chromatogramme MS et spectres MS du composé principal (RT 11 min).



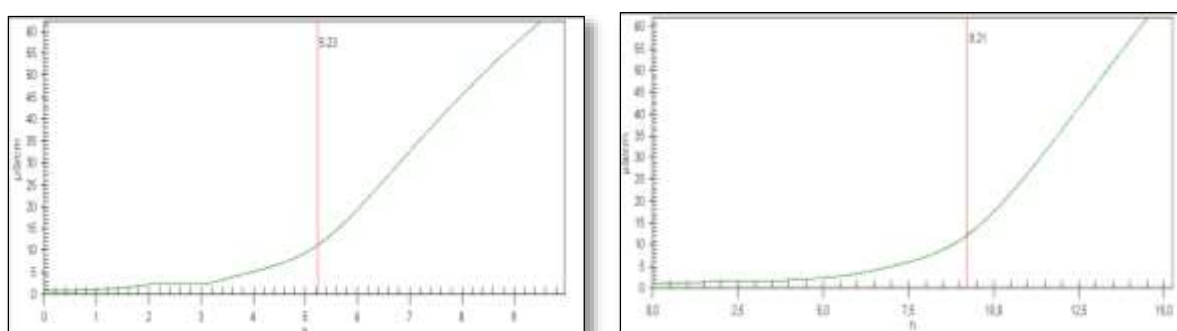
### Annexe 1: Graphes rancimat



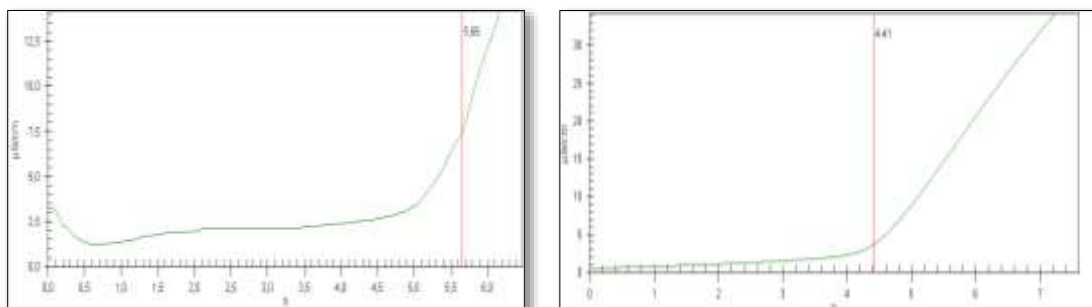
**Figure 1 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Fourssane (13) et Z. Atibaa (12).



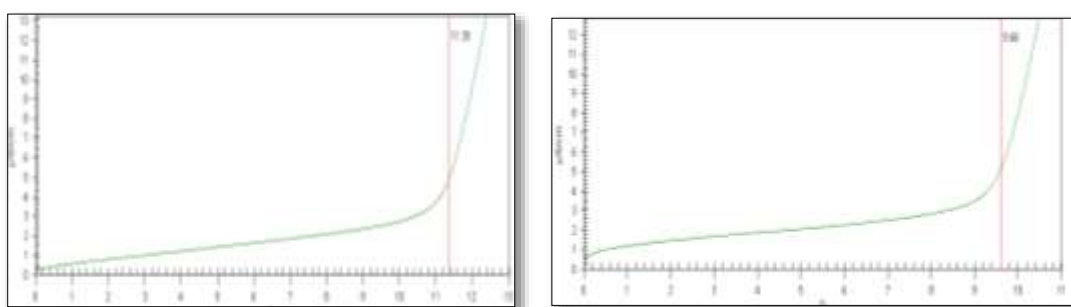
**Figure 2 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Settara (4) et Ouled rabe (5).



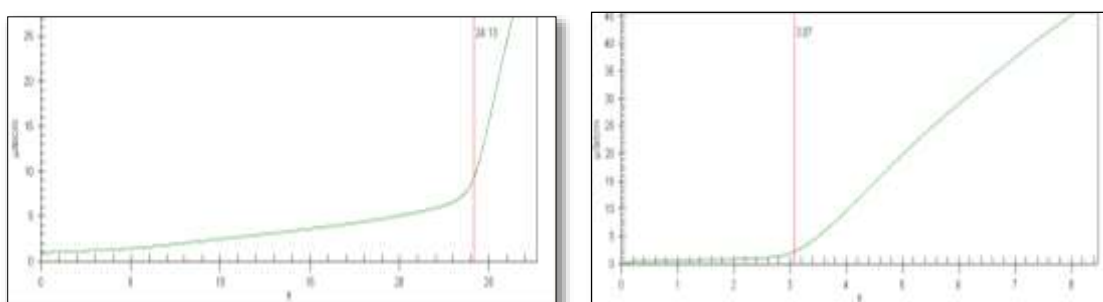
**Figure 3 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Zazia (10) et Elwafia (9).



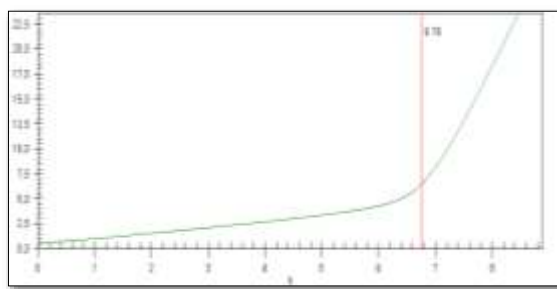
**Figure 4 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque El milia(15) et Belkis(11).



**Figure 5 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Blida(9) et Sidi abdelaziz(6).



**Figure 6 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Elkala(7) et Bouanani(1).



**Figure 7 :** Le degré de rancissement de l'huile de lentisque Akbou 2017(3).

**Annexe 2: Activité antibactérienne**

Panel anaérobie des bactéries (gram positif et gram négatif) testé pour les huiles de lentisque.

| GRAM POSITIVE                       | Référence   | MIC ofloxacin |
|-------------------------------------|-------------|---------------|
| <i>Bacillus cereus</i>              | CIP 6624    | 0,5           |
| <i>Corynebacterium minutissimum</i> | CIP 100652T | 0,12          |
| <i>Enterococcus avium</i>           | CIP 104 053 | 2             |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i>   | CIP 103.018 | 64            |
| <i>Enterococcus durans</i>          | CIP 104 999 | 2             |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        | CIP 103.214 | 2             |
| <i>Enterococcus faecium</i>         | CIP 103.014 | 8             |
| <i>Enterococcus gallinarum</i>      | CIP 105 985 | 4             |
| <i>Enterococcus hirae</i>           | CIP 5855    | 1             |
| <i>Listeria monocytogenes</i>       | CIP 103.575 | 2             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | ATCC 25.923 | 0,5           |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | CIP 53.124  | 0,5           |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>  | CIP 81.56   | 0,25          |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i>   | ATCC 43.809 | 1             |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | CIP 76125   | 1             |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>     | CIP 103.227 | 2             |

| GRAM NEGATIVE                                                 | Reference   | MIC ofloxacin |
|---------------------------------------------------------------|-------------|---------------|
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>Denitrificans</i> | CIP 71.32   | 32            |
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>Xylosoxidans</i>  | CIP 77.15   | 2             |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                                | CIP 70.34   | 2             |
| <i>Aeromonas caviae</i>                                       | CIP 76.16   | 0,06          |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                                   | CIP 76.14   | 0,06          |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                                   | CIP 74.30T  | 0,06          |
| <i>Alcaligenes faecalis</i>                                   | CIP 67.23   | 1             |
| <i>Brevundimonas diminuta</i>                                 | CIP103020   | 4             |
| <i>Burkholderia cepacia</i>                                   | CIP 80.24   | 4             |
| <i>Citrobacter freundii</i>                                   | CIP 57.32   | 0,06          |
| <i>Citrobacter koseri</i>                                     | CIP 82.87   | 0,06          |
| <i>Comamonas acidovorans</i>                                  | N331a       | n.d.          |
| <i>Comamonas testosteroni</i>                                 | N70a        | 4             |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                                 | CIP 6086T   | 0,12          |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                                   | CIP 60.85   | 0,06          |
| <i>Escherichia coli</i>                                       | ATCC25922   | 0,06          |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                                     | E282a       | 0,06          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                  | CIP 52.145  | 0,12          |
| <i>Morganella morganii</i>                                    | E342a       | 0,06          |
| <i>Ochrobactrum anthropi</i>                                  | N16a        | 0,5           |
| <i>Providencia stuartii</i>                                   | CIP 107.808 | 16            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                 | CIP 103.467 | 2             |
| <i>Pseudomonas putida</i>                                     | CIP 55.191  | 1             |
| <i>Salmonella enterica</i>                                    | CIP 58.58   | 0,06          |
| <i>Serratia marcescens</i>                                    | CIP 60.93   | n.d.          |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                           | CIP 54.90   | 2             |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                                | CIP 75.2    | n.d.          |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                                | CIP 80.27   | 0,06          |

## Identification of alkylsalicylic acids in Lentisk oil (*Pistacia lentiscus* L.) and viability assay on Human Normal Dermal Fibroblasts<sup>☆</sup>

Nabiha Benalia<sup>1,2</sup>, Abdenour Boumechhour<sup>3</sup>, Sergio Ortiz<sup>1</sup>, Cristian A. Echague<sup>1</sup>, Thorsten Rose<sup>4</sup>, Bernd L. Fiebich<sup>4</sup>, Smain Chemat<sup>3</sup>, Sylvie Michel<sup>1</sup>, Brigitte Deguin<sup>1</sup>, Saliha Dahamna<sup>2</sup> and Sabrina Boutefnouchet<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris, UMR CNRS CiTCoM 8038, Faculté de Santé, 4, av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France

<sup>2</sup> Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, Faculty of Natural and Life sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, Setif 19000, Algeria

<sup>3</sup> Extraction and Separation Techniques Team, Research Centre in Physical and Chemical Analysis (C.R.A.P.C), BP 384 Zone Industrielle de Bousmail, CP 42004 Tipaza, Algeria

<sup>4</sup> VivaCELL Biotechnology GmbH, Ferdinand-Porsche-Str. 5, D-79211 Denzlingen, Germany

Received 16 September 2020 – Accepted 10 February 2021

**Abstract** – *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) is widely distributed in the Mediterranean basin. Its fruit oil is used in traditional medicine to treat burns, skin impairments as well as inflammatory diseases as soothing massage or internal use. An increased interest is spotted lately with several commercial brands are spun portraying the benefits of this oil but with no stringent regulations to ascertain its safe use as an edible or cosmeceutical product. This work concerned the investigation of secondary metabolites presents in *Pistacia lentiscus* fruits oil using both GC-MS and HPLC-DAD-MS technics, and the evaluation of cytotoxicity on human normal dermal fibroblasts to assess safety of use as cosmetic ingredient. This study stands as the first one to report the identification of alkylsalicylic acids in fruits oil and unsaponifiable fraction of *Pistacia lentiscus* fruit oil which calls for therefore, quantification of alkylsalicylic acids, known as skin irritants, in *Pistacia lentiscus* oil, used as nutraceuticals or cosmeceuticals by manufacturers.

**Keywords:** Lentisk / *Pistacia lentiscus* L. / Anacardiaceae / ginkgolic acid / alkylsalicylic acid / cytotoxicity

**Résumé** – Identification d'acides alkylsalicyliques dans l'huile de Lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) et effet sur la viabilité cellulaire de fibroblastes dermiques humains normaux. L'espèce *Pistacia lentiscus* L. est largement répandue autour du bassin méditerranéen. L'huile de ses fruits est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les brûlures, les affections cutanées ainsi que les états inflammatoires en massage ou en usage interne. Un regain d'intérêt récent pour cette ressource à travers notamment différents produits commerciaux vantant ses propriétés médicinales a été noté, avec cependant peu de données concernant la qualité des produits distribués, en tant que cosmétiques ou aliments. Les présents travaux ont porté sur l'identification des métabolites présents dans différents échantillons d'huile par analyse GC-MS et HPLC-DAD-MS, ainsi que sur l'évaluation de l'effet de l'huile et de son insaponifiable sur la viabilité cellulaire de fibroblastes dermiques humains normaux en vue de son utilisation en tant qu'ingrédient cosmétique. Cette étude rapporte pour la première fois la présence d'acides alkylsalicyliques dans l'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* L. et de sa fraction insaponifiable, ce qui incite à envisager une quantification de ces constituants, connus comme irritants cutanés, par les fabricants de produits à visée cosmétique ou nutraceutique.

**Mots clés :** Lentisque / *Pistacia lentiscus* L. / Anacardiaceae / acides ginkgoliques / acides alkylsalicyliques / cytotoxicité

<sup>☆</sup> Contribution to the Topical Issue "Lipids and Cosmetics / Lipides et cosmétiques".

\*Correspondence: [sabrina.boutefnouchet@u-paris.fr](mailto:sabrina.boutefnouchet@u-paris.fr)

## 1 Introduction

Lentisk, *Pistacia lentiscus* L. is an evergreen shrub or tree from Anacardiaceae family, largely known as Darou, dherou or Drou in North Africa, Listincu or Chessa in Sardinia; or Mastiha tree in Greece. Its repartition covers all the Mediterranean area, from the Iberic peninsula to the Middle East. Mastic is the oleoresin obtained from the tree after incision of its trunk and is produced in abundance by the *Chia* variety occurring in the Greek Chios Island. Despite the large use of mastic for medicinal or dietary purpose (Pachi *et al.*, 2020), the application of vegetal oil obtained from fruits is still less known.

An archaeological study from the eastern Mediterranean brought evidence of fruit oil production *via* fruits' squeezing in Roman and high medieval sites in Sardinia island and Corsica. The same processing method exists also traditionally in eastern Algeria and Tunisia, but not described in the western part of Mediterranean, which may indicate the probable influence of Roman empire colonization. Lentisk oil was mainly used for lighting, treating burns and wounds, and as food dressing (Lanfranchi *et al.*, 1999; Lanfranchi and Bui, 1998; Loi, 2010). Several reports indicated the limited geographical distribution of lentisk oil users with predominance use is linked to traditional pharmacopoeia of eastern and central parts of Algeria and Tunisia for the treatment of skin, respiratory conditions and rheumatism. According to Djerrou *et al.* study, the use of *Pistacia lentiscus* fixed oil reduced the inflammatory phase, stimulated wound contraction and reduced the epithelization period to those treated with pharmaceutical grade ointment Madecassol® (Djerrou *et al.*, 2010). Maameri *et al.* combined it with honey and confirmed its superiority to accelerate wound healing *via* contraction compared to a commercial skin protector cicatryl© (Maameri *et al.*, 2012).

Chemical composition of *Pistacia lentiscus* oil has been mainly focusing on saponifiable fraction of the oil including fatty acids, phytosterols and tocopherols (Charef *et al.*, 2008; Mezni *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2012). However, an increased interest is spotted lately with several commercial brands are spun portraying the benefits of this oil but with no stringent regulations are in force to ascertain its safe use as an edible or cosmeceutical product. This emerging popularity calls for the establishment of quality indicators to ensure quality of marketed oils, reduce the risks of adulteration and/or misuse and ascertain its safe use.

Thus, in this study, we focused in Lentisk oil with an objective of two folds, the first one consists to compare fourteen oil samples in order to depict quality indicators by spotting differences in secondary metabolites profiles using both GC-MS and HPLC-DAD-MS techniques, the second one was to assess cytotoxicity on human normal fibroblast to elaborate its potential safe use in dermatological applications.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Oil samples and reagents

Artisanal samples were obtained from rural families located in the area of Jijel (Sidi abdelaziz, Settara, Ouled rabeh), Blida and Elkala (Eltaref) (see Supplementary

Material). Artisanal production consists in crushing of mature fruits collected during the period of end of autumn-beginning of winter, then submitted for maceration in cold water. In certain cases, the mixture may be heated to increase oil's yield. After filtration, the oil is separated from water by decantation to afford a yellow green viscous liquid. The obtained yields ranged between 16% and 19% (Lanfranchi and Bui, 1998). In parallel, semi-artisanal samples were obtained from two cooperatives: Ladjoudane (Akbou) and Bouannani (Jijel). These oils are prepared following the same process described earlier but extraction is realized using a hydraulic press equipped with fibre disks called "sourtins". In another part, six commercial samples were purchased in the same areas (Tabs. 1 and 2). Methanol (MeOH) HPLC grade, dimethyl-sulfoxide (DMSO), ethanol (EtOH), gallic acid, quercetin, Folin-Ciocalteu reagent,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{BF}_3$  (4%)-methanol, and hexane were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

### 2.2 *Pistacia lentiscus* L. oil composition

Fatty acids are analyzed after transesterification using  $\text{BF}_3$  into their corresponding methyl-esters (Charef *et al.*, 2008; Mezni *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2012). Briefly, 50 mg of oil are diluted in 1 mL hexane, to which 0.5 mL of  $\text{BF}_3$  (14%)-methanol is added. The mixture is kept at 60 °C during 30 minutes after which 1 mL of water added. Then, the organic phase containing the FAME mixture is separated for GC-MS and GC-FID analysis. Analyses are performed using GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Co. Kyoto. Japan) equipped with a fused silica capillary column (Rtx-5MS; 30 m  $\times$  0.25 mm inner diameter, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ , Thames Restek. UK), and an Agilent 5973N MS detector. GC-FID was performed with a Master GC-Dani, France, equipped with a HP5 column (5% Phenyl-Hexyl, 100 m, internal diameter 0.25 mm, thickness 0.2  $\mu\text{m}$ ) and a FID detector.

The following analytical conditions are used: oven temperature is programmed to start at 140 °C, hold for 1 min, then increased to 200 °C at a rate of 5 °C/min, then hold for 3 min, then increased to 215 °C (rate 5 °C/min, hold for 5 min), then increased to 240 °C at a rate of 10 °C/min, and finally hold for 10.5 min. Injector temperature is set at 270 °C; carrier gas: helium, flow, 0.95 mL/min; splitting ratio 1:20; injection volume: 1  $\mu\text{L}$ ; interface temperature: 240 °C; while for the mass spectrometry interface, the MS source temperature is set at 220 °C with an ionization energy of 70 eV. For other volatiles analysis, the oven temperature is programmed at 70 °C, hold for 5 min, then increased to 120 °C (rate 5 °C/min, hold for 2 min), then increased to 180 °C (rate 30 °C/min, hold on 12 min), and finally increased to 270 °C (rate 30 °C/min, and kept for 2 min). Fatty acids were identified by comparison of their recorded mass spectra with the NIST14 library and the calculated retention indices (RI) of corresponding FAME fatty acid methyl esters.

### 2.3 Analysis of unsaponifiable fraction

The recovery of unsaponifiable fraction for artisanal samples 3, 7, and 8 is conducted following the procedure described in AFNOR NF T 60-206. Briefly, 50 mL of 2 N

**Table 1.** Fatty acids composition of artisanal *Pistacia lentiscus* L. oil.

| Artisanal samples                | 1<br>Bouanani | 2<br>Akbou 2015 | 3<br>Akbou 2017 | 4<br>Settara | 5<br>Ouled Rabah | 6<br>Sidi Abdelaziz | 7<br>El Kala | 8<br>Blida | Mean  | SD   | RSD  |
|----------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|------------------|---------------------|--------------|------------|-------|------|------|
| % Fatty acids                    |               |                 |                 |              |                  |                     |              |            |       |      |      |
| Palmitoleic acid 16:1            | 2.38          | 1.72            | 2.07            | 3.03         | 2.02             | 2.42                | 2.1          | 2.76       | 2.31  | 0.43 | 0.18 |
| Palmitic acid 16:0               | 31.45         | 23.94           | 30.34           | 34.22        | 27.15            | 28.09               | 30.54        | 37.08      | 30.35 | 4.1  | 0.14 |
| <i>n</i> -Hexadecanoic acid 16:0 | 0.19          | 0.36            | 0               | 0            | 0.17             | 0.17                | 0            | 0          | 0.11  | 0.13 | 1.2  |
| Linoleic acid 18:2               | 15.98         | 21.33           | 17.15           | 15.98        | 14.52            | 15.24               | 16.87        | 15.98      | 16.63 | 2.07 | 0.12 |
| Oleic acid 18:1                  | 39.67         | 46.33           | 42.83           | 43.96        | 52.84            | 51.89               | 48.6         | 41.12      | 45.91 | 4.88 | 0.11 |
| Stearic acid 18:0                | 6.12          | 2.73            | 6.63            | 2.19         | 2.2              | 1.11                | 1.15         | 1.87       | 3     | 2.16 | 0.72 |
| Saturated Fatty acids SFA        | 37.76         | 27.03           | 36.97           | 36.41        | 29.52            | 29.37               | 31.69        | 38.95      | 33.46 | –    | –    |
| Unsaturated Fatty acids UFA      | 58.03         | 69.38           | 62.05           | 62.97        | 69.38            | 69.55               | 67.57        | 59.86      | 64.85 | –    | –    |
| UFA/SFA                          | 1.54          | 2.57            | 1.68            | 1.73         | 2.35             | 2.37                | 2.13         | 1.54       | 1.99  | –    | –    |

ethanolic solution of KOH are added to 5 g of oil. The mixture is then refluxed for one hour. After evaporation, 50 mL of water is added, the suspension is extracted three times with 100 mL diethyl ether ( $3 \times 100$  mL), washed with aqueous KOH (0.5 N) followed by water, then dried on anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under vacuum. Then, derivatization into silyl esters is performed. Briefly, 5 mg of unsaponifiable fraction are placed with 0.5 mL of pyridine in a 2 mL vial. Then, 0.1 mL of hexamethyldisilazane (HMDS) and 0.04 mL of trimethylchlorosilane (TMCS) are added and the reaction mixture is mixed using a vortex then centrifuged. From the supernatant of the silylated mixture, 1  $\mu\text{L}$  is directly submitted to GC-MS analysis. In this case, carrier gas is  $\text{H}_2$  with a flowrate of 1 mL/min and a split 1:20, oven is programmed increasing from 180 °C to 270 °C at 8 °C/min with a hold at initial and final temperatures of 1 and 65 min respectively (Jasmica, 2001). MS Interface temperature is set at 240 °C while MS source temperature is set at 220 °C with an ionization energy of 70 eV. The injection volume was 1  $\mu\text{L}$ .

#### 2.4 HPLC-DAD-MS identification of alkylsalicylic acids in *Pistacia lentiscus* oil.

Oil samples are analyzed on a HPLC-DAD-MS Thermo Scientific Dionex U3000 (Thermo-Dionex, Les Ulis, France) consisted of a quaternary pump (LPG-3400 SD), a thermostated autosampler (WPS-3000TSL), a thermostated column (TCC-3000SD), and a diode array detector (DAD-3000) on line with a quadrupole mass spectrometer (Surveyor MSQ plus System (Thermo-Dionex, Les Ulis, France). All oil samples were diluted in methanol (10 mg/mL). Solutions are filtered before injection on UptiDisc 0.45 M nylon filters (Interchim, Montluçon, France). 20  $\mu\text{L}$  of each solution are injected and chromatograms are recorded at 210, 280, and 320 nm. Oven temperature is set at 30 °C and the analysis is performed using a gradient elution: A ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5% formic acid) and B (ACN,

0.5% formic acid) as follows: 5% of B (0–10 min, isocratic), 5% to 100% of B (10–40 min, linear gradient), 100% of B (40–60 min, isocratic), 100% to 5% of B (60–70 min, linear gradient), 5% of B (70–75 isocratic) the flow rate is fixed at 0.5 mL/min.

#### 2.5 Alamar blue cell viability assay on Normal Human Dermal Fibroblasts

Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) are cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest Ltd., UK), 2% l-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin, (Sigma), and 100 g/ml streptomycin (Sigma). After counting the number of cells in a particle counter (Euro Diagnostics, Krefeld, Germany), NHDF are seeded in 96-well plates at a density of 8000 cells/well and incubated at 37 °C with 5%  $\text{CO}_2$  overnight. Cells are treated by 1  $\mu\text{L}$  of a 0.1, 1, 5, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  whole oil samples solution, or with 1  $\mu\text{L}$  of DMSO only (control), in 100  $\mu\text{L}$  of media. The experiment is conducted in quadruplicates. After 24 h of incubation, 10  $\mu\text{L}$  AlamarBlue<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) is added to each well. After 2 h, the fluorescence is measured with a fluorescence spectrophotometer (Polarstar, BMG, Offenbug) using 544EX nm/590EM nm filter settings. The amount of fluorescence is proportional to the number of living cells and corresponds to the cells' metabolic activity. Damaged and nonviable cells have lower innate metabolic activity and thus generate a proportionally lower signal than healthy cells. The active ingredient of AlamarBlue<sup>®</sup> (resazurin) is a nontoxic, cell permeable compound that is blue in color and virtually nonfluorescent. Upon entering cells, resazurin is reduced to resorufin, which produces very bright red fluorescence. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, thereby generating a quantitative measure of viability and cytotoxicity (Rampersad, 2012).



**Table 2.** Fatty acids composition of commercial *Pistacia lentiscus* L. oil.

| Commercial samples               | 9<br>El Wafia | 10<br>Zazia | 11<br>Belkis | 12<br>Zahrat el Atibaa | 13<br>Al Foursan | 14<br>Sultane | Mean  | SD    | RSD  |
|----------------------------------|---------------|-------------|--------------|------------------------|------------------|---------------|-------|-------|------|
| % Fatty acids                    |               |             |              |                        |                  |               |       |       |      |
| Palmitoleic acid 16:1            | 0.13          | 0           | 2.03         | 1.69                   | 2.31             | 1.28          | 1.24  | 0.97  | 0.79 |
| Palmitic acid 16:0               | 16.41         | 16.25       | 24.78        | 31.58                  | 28.42            | 22.35         | 23.3  | 6.25  | 0.27 |
| <i>n</i> -Hexadecanoic acid 16:0 | 0             | 0           | 0            | 0                      | 0                | 0             | 0     | 0     | 0    |
| Linoleic acid 18:2               | 47.46         | 44.95       | 15.46        | 17.37                  | 15.35            | 20.69         | 26.88 | 15.11 | 0.56 |
| Oleic acid 18:1                  | 28.72         | 31.35       | 54.62        | 47.58                  | 50.13            | 53.5          | 44.32 | 11.37 | 0.26 |
| Stearic acid 18:0                | 5.28          | 5.16        | 2.14         | 1.3                    | 2.15             | 1.84          | 2.98  | 1.76  | 0.59 |
| Saturated Fatty acids SFA        | 21.69         | 21.41       | 26.92        | 32.88                  | 30.57            | 24.19         | 26.28 | –     | –    |
| Unsaturated Fatty acids UFA      | 76.31         | 76.3        | 72.11        | 66.64                  | 67.79            | 75.47         | 72.44 | –     | –    |
| UFA/SFA                          | 3.52          | 3.56        | 2.68         | 2.03                   | 2.22             | 3.12          | 2.85  | –     | –    |

### 3 Results

#### 3.1 Fatty acid and volatile compounds from *Pistacia lentiscus* L. fruits oil

*Pistacia lentiscus* fruits oils from artisanal and commercial samples are mainly constituted by oleic acid (18:1), palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2), and palmitoleic acid (16:1) with a 3/2/1/0.1 ratio, being the four main fatty acids presenting more than 90% of fatty acids in these oils (Tabs. 1 and 2). These results are in accordance with data reported in the literature for Tunisian and Algerian samples (Charef *et al.*, 2008; Mezni *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2012). However, two commercial samples show very different fatty acid profiles with inversed ratio of linoleic and oleic acids, revealing probable adulteration of these two commercial products, as higher ratio of linoleic acid can be a consequence of linoleic rich oil addition such a sunflower oil (Christopoulou *et al.*, 2004). The results indicate that *Pistacia lentiscus* oils present a medium UFA/SFA ratio between 1.54 and 2.57. Mezni *et al.* reported higher UFA/SFA ratio ranging between 2.33 and 2.84 (Mezni *et al.*, 2012). In addition, other reports showed similar higher ratios as well (Charef *et al.*, 2008; Trabelsi *et al.*, 2012). These differences can be explained by differences in oil extraction protocols and systems. In fact, Charef *et al.* used Soxhlet extraction using hexane and Trabelsi *et al.* used petroleum ether by means of a Soxhlet extraction; whereas artisanal samples from this study were produced using traditional mechanical oil extraction methods.

In order to identify specific markers of *Pistacia lentiscus* oil using GC-MS, identification of other volatiles after derivatization are also examined. Monoterpenes are identified from retention times  $R_t = 5$  min to  $R_t = 15$  min (Tab. 3). Major monoterpenes are identified as  $\alpha$ -pinene, myrcene, and  $\beta$ -limonene, largely reported in *Pistacia lentiscus* fruits and oil (Wyllie *et al.*, 2006; Mecherara-Idjeri *et al.*, 2008). Myrcene is the most abundant monoterpene representing more than 50% of detected monoterpenes. Monoterpenes' fraction may represent from 2.37 to 20.43% of all the identified volatiles compounds in the artisanal samples. Regarding

artisanal samples (1–8), sample 7 (*El Kala*) presented the highest monoterpene fraction representing 20.43% of the detected compounds, *versus* only 2.36% for sample 2 (Akbou 2015) (Tab. 3). For commercial samples 9 (*El Wafia*) and 10 (*Zazia*), the monoterpenes fraction is nearly absent or not significant (0.26%), which confirms eventual adulteration of the samples, whereas other commercial samples (11–14) have a monoterpene fraction similar to those of artisanal samples which confirm their authenticity. It is interesting to note that from  $R_t = 15$  min to  $R_t = 20$  min, some sesquiterpenes could be identified by in small amount.

After 34 min, traces of alkylphenols are identified using NIST library. The major MS fragments  $m/z$  value were 108 and 120. The literature report that GC/MS-based identification of cardanols from *Rhus* species describe the hydroxytropilium ion with a  $m/z$  value of 108 as a common fragment for all the identified alkylphenols (Franke *et al.*, 2001) (Tab. 3). Alkyl side chains for identified compounds vary from 13 to 17 carbons and may present a probable unsaturation (Fig. 1). Occurrence of alkylphenols is considered a critical finding because of the irritating potential of these compounds in Anacardiaceae and Ginkgoaceae species.

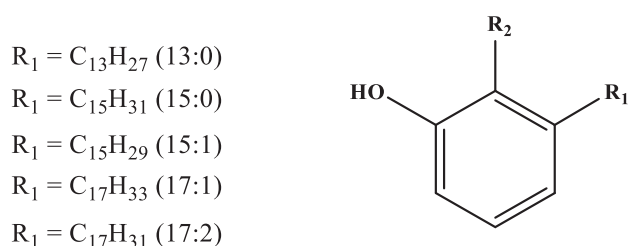
#### 3.2 *Pistacia lentiscus* L. fruits oil unsaponifiable composition

Unsaponifiable extraction was considered for artisanal samples 2, 7, and 8 following AFNOR NF T 60-206. Unsaponifiable yields were respectively 1.67, 0.47 and 1.07%. Composition of unsaponifiable fractions was analyzed using GC-MS after derivatization into silyl esters. Phytosterols and alkylsalicylic derivatives are identified using NIST library (Song *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014). Five alkylsalicylic acids were identified between 11.5 and 14 min as C15:1, C15:0 and C17:1 derivatives. In this case, the diagnosis MS fragments was 180 (Tab. 4). In respect to phytosterols, identified between 26 and 36 min,  $\beta$ -sitosterol is the main identified phytosterol, stigmaterol and campesterol are also identified but in smaller proportions.



**Table 3.** GC-MS identification of monoterpenes and alkylphenols from *Pistacia lentiscus* oil.

| Compound                 | Rt (min)   | RI (calc) | 1        | 2     | 3     | 4       | 5     | 6       | 7       | 8     | 9     | 10    | 11     | 12        | 13      | 14      |
|--------------------------|------------|-----------|----------|-------|-------|---------|-------|---------|---------|-------|-------|-------|--------|-----------|---------|---------|
|                          |            |           | Bouanani | Akbou | Akbou | Settara | Ouled | Sidi    | El kala | Blida | El    | Zazia | Belkis | Zahrat    | Al      | Sultane |
|                          |            |           | 2015     | 2017  |       |         | rabah | Abdelaz |         |       | wafia |       |        | el atibaa | foursan |         |
| <i>Monoterpenes (%)</i>  |            | 9.3       | 2.37     | 15.29 | 11.81 | 6.46    | 9.71  | 20.43   | 13.84   | 0.26  | 0     | 14.27 | 7.17   | 15.63     | 6.12    |         |
| $\alpha$ -pinene         | 5.51 948   | 1.4       | 0.3      | 2.59  | 1.24  | 0.89    | 1.44  | 2.28    | 1.4     | –     | –     | 1.81  | 0.93   | 2.69      | 1.06    |         |
| Camphene                 | 6.01 953   | –         | –        | –     | –     | –       | –     | 0.55    | –       | –     | –     | –     | 0.09   | –         | –       |         |
| b-myrcene                | 7.15 976   | 6.62      | 1.68     | 8.64  | 9.32  | 4.73    | 6.66  | 14.79   | 9.37    | 0.26  | –     | 10.13 | 4.25   | 10.29     | 3.56    |         |
| 1,3,5-cycloheptatriene,  | 8.31 1010  | –         | –        | 0.18  | –     | –       | –     | –       | 0.47    | –     | –     | 0.27  | 0.15   | 0.29      | 0.21    |         |
| 3,7,7-trimethyl-         |            |           |          |       |       |         |       |         |         |       |       |       |        |           |         |         |
| d-limonene               | 8.47 1018  | 0.63      | 0.19     | 2.24  | 0.69  | 0.39    | 0.86  | 1.06    | 0.71    | –     | –     | 0.89  | 0.53   | 1.09      | 0.52    |         |
| cyclohexene,4-methyl-3-  | 8.66 1023  | –         | –        | 0.14  | –     | –       | –     | –       | –       | –     | –     | –     | –      | –         | –       |         |
| (1-methylethylidene)-    |            |           |          |       |       |         |       |         |         |       |       |       |        |           |         |         |
| $\alpha$ –terpinolene    | 9.01 1045  | 0.34      | 0.1      | 0.47  | 0.33  | 0.23    | 0.38  | 0.57    | 0.61    | –     | –     | 0.49  | 0.17   | 0.6       | –       |         |
| trans-sabinene hydrate   | 9.42 1090  | –         | –        | 0.19  | –     | –       | –     | 0.65    | 0.85    | –     | –     | –     | 0.38   | –         | 0.49    |         |
| trans-4-methoxy thujane  | 13.9 1197  | –         | –        | 0.2   | –     | –       | –     | –       | –       | –     | –     | –     | –      | –         | –       |         |
| 4(2-methoxypropan-2-yl)- | 14.6 1210  | 0.31      | 0.1      | 0.64  | 0.23  | 0.22    | 0.37  | 0.53    | 0.43    | –     | –     | 0.68  | 0.64   | 0.67      | 0.28    |         |
| 1-methylcyclohex-1-ene   |            |           |          |       |       |         |       |         |         |       |       |       |        |           |         |         |
| <i>Alkylphenols (%)</i>  |            | 11.25     | 0        | 2.42  | 2.28  | 0       | 0     | 0       | 0.63    | 2.12  | 0     | 1.32  | 0.44   |           |         |         |
| Cardanol (17:1) m/z      | 34.88 2282 | 1.86      | 0.23     | 7.2   | 0     | 2.42    | 1.85  | 0       | 0       | 0     | 0.63  | 1.84  | 0      | 1.04      | 0       |         |
| Cardanol (15:1) m/z      | 34.94 2296 | 1.35      | 0.7      | 2.93  | 0     | 0       | 0.43  | 0       | 0       | 0     | 0     | 0.28  | 0      | 0.28      | 0.3     |         |
| Cardanol (13:0) m/z      | 35.25 2333 | 0         | 0        | 1.12  | 0     | 0       | 0     | 0       | 0       | 0     | 0     | 0     | 0      | 0         | 0.14    |         |



Alkylphenols  $R_2 = H$ , Alkyl salicylic acids  $R_2 = COOH$

**Fig. 1.** General structures of alkylphenols and alkylsalicylic acids.

### 3.3 Alkylsalicylic acids from *Pistacia lentiscus* L. fruits oil

As this is the first report demonstrating the occurrence of alkylphenols or alkylsalicylic acids in *Pistacia lentiscus* L. oil, HPLC-DAD-MS analysis was envisaged with comparison of oil samples 1–14 to the 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylic acid standard from PLFE1 fruit fraction. PLFE1 is a non-polar fraction rich in alkylsalicylic acids, is isolated from fruits of Algerian *Pistacia lentiscus* and characterized in a previous work (Tahrioui *et al.*, 2020). PLFE1 contains 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylic acid, also known as ginkgolic acid (C17:1), together with hydroginkgolic acid (C15:0). The structure of  $\Delta 8$  ginkgolic acid (C17:1) have been confirmed after isolation from the PLFE1 extract using NMR analysis, whereas the double bond position was confirmed by ozonolysis (Tahrioui *et al.*, 2020).

From HPLC-UV/DAD-MS analysis, similarity with UV spectra and  $m/z$  values in negative mode confirmed the identification of previously isolated alkylsalicylic acids in the non-polar fruit extract PLFE1. Figure 2 shows that alkylsalicylic acids derivatives are detected in oil samples between 44 and 60 min with the same distribution profile for 4 main compounds. Among the four detected derivatives, the main compounds were ginkgolic acid (C17:1) with a  $m/z$  value of 373 in negative mode, together with ginkgolic acid (C15:1) ( $m/z$  345). The C17:2 derivative and the minor C13:0 derivative are also identified ( $m/z$  respectively 370.9 and 319) with similar typical UV spectra with two characteristic  $\lambda_{max}$  at 247 and 314 nm.

### 3.4 Cytotoxic assessment on Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)

Cell viability assay performed in NHDF cells revealed only a low cellular toxicity of oil samples for all concentrations tested (0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ), however, we detected a loss of cell viability for all unsaponifiable samples at concentrations higher than 50  $\mu\text{g/mL}$ . At 100  $\mu\text{g/mL}$ , cell viability for all unsaponifiable tested samples were below 50% (Fig. 3). These results may be linked to the presence of identified metabolites in the unsaponifiable. Regarding the different identified metabolites (phytosterols, alkylsalicylic acids, carotenoids), alkyl phenols and alkylsalicylic may be the highest contributors to this cytotoxicity as dermal toxicity of these class of compounds has already been described, such as contact dermatitis. It can be noticed that loss of viability was slightly

higher for unsaponifiable fraction of oil sample 7 which is constituted of a higher proportion of alkylsalicylic acid 15:1.

## 4 Discussion

Studied artisanal and commercial samples of *Pistacia lentiscus* oils were quite homogeneous in terms of fatty acids composition with oleic acid (18:1), palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2), and palmitoleic acid (16:1) profiling a 3/2/1/0.1 ratio, although two of the seven commercial samples are found to be adulterated (Tabs. 1 and 2). Differences in trace secondary metabolites helped us identify alkylphenols derivatives as quality markers for *Pistacia lentiscus* fruit oils. HPLC-UV-DAD-MS confirmed that these alkylphenols are in fact alkylsalicylic acids after comparison with purified standards (Fig. 2). The 17:1 alkyl salicylic acid derivative is found to be the major derivative together with the 15:1 derivative. To the best of our knowledge, this is the first study to report the occurrence of alkylsalicylic acids (ASAs) in *Pistacia lentiscus* fruit oil. Previous identification of ASA in *Pistacia lentiscus* included previous authors findings of these ASAs in the non-polar fraction of the fruits particularly the 3-(heptadec-8-en-1-yl)-salicylic acid also known as ginkgolic acid ( $\Delta 8$  C17:1) where the position of the double bond is determined using ozonolysis (Tahrioui *et al.*, 2020). This class of secondary metabolites is reported in other Anacardiaceae species, such as *Anacardium occidentale*, but also in Ginkgoaceae species. Identification of alkylsalicylic acids by LC-MS and GC-MS is mainly described for *Ginkgo biloba* as quality requirements of phytopharmaceutical products requires limited amounts of ginkgolic acids (Abate-Pella, 2017). Alkylsalicylic acids could be identified in *Ginkgo biloba* leaves by GC-MS thanks to the characteristic fragmentation pattern with a typical fragment with  $m/z$  value of 180 described by Wang *et al.* for methyl esters derivatives (Wang *et al.*, 2014). Alkylsalicylic acids' profile in *Ginkgo biloba* leaves are quite different as the 15:1 ginkgolic acid, either  $\Delta 8$  or  $\Delta 10$ , is the major derivative. Wang *et al.* determined the  $\Delta 8/\Delta 10$  ratio using commercial standards on a HP-88 high polarity column, as the  $\Delta 8$  compound retention time is slightly lower. In this study, GC-MS is performed with a RTx-5 non polar column. Indeed, two isomers of the 15:1 and 17:1 alkylsalicylic derivatives could be identified, without clear identification of each isomer. The availability of the purified standard fraction PLFE1 allowed us the identification of  $\Delta 8$  17:1 derivative as the major alkyl salicylic acid compound present in *Pistacia lentiscus* fruit oil. Alkylsalicylic acids, such as ginkgolic or anacardic acids, have been described as toxic compounds responsible for cutaneous irritation or allergy (Kajiyama *et al.*, 2002; Ndjoko *et al.*, 2000). However, this cutaneous toxicity observed after consumption of *Ginkgo biloba*, is still under scrutiny. Indeed, alkyl resorcinols, such as ginkgols and cardanols, or catechol derivatives, such as urushiols from Anacardiaceae species, are highly toxic as the resorcinol and catechol moiety might be transformed into quinones responsible of severe contact dermatitis (Knight *et al.*, 1996; Aguilar-Ortigoza *et al.*, 2003; Duthil, 2005). Alkylphenols and alkylresorcinols have also been identified in *Ginkgo biloba* leaves and may be responsible for the observed toxicity. Regarding alkylsalicylic acids

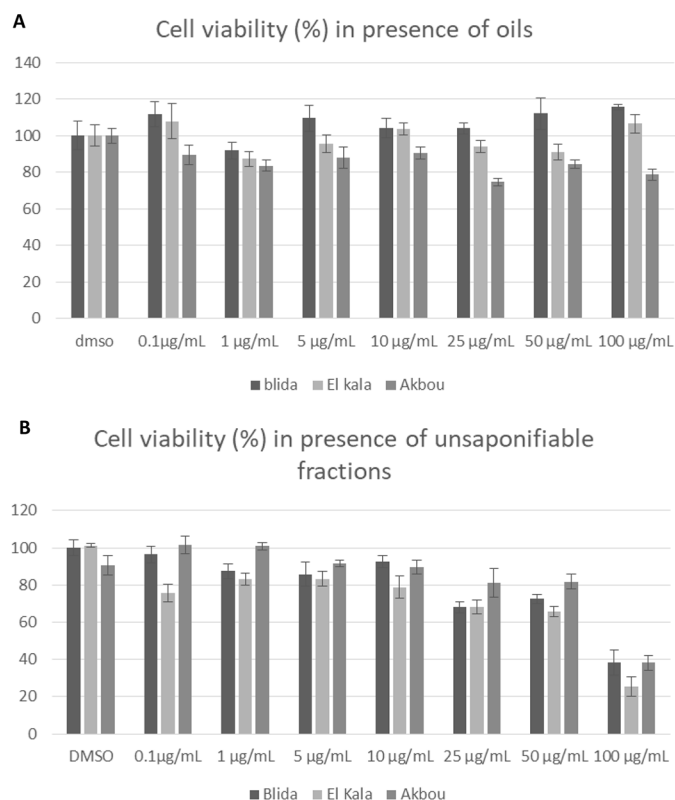


5 main identified alkylsalicylic acids: C 13:0,

ned the investigation of quality standards  
s fruits oil in commercial and artisanal  
identification of alkylsalicylic acids in  
ifiable fraction of *Pistacia lentiscus* fruit  
port of occurrence of alkylsalicylic acids  
fruits oil. As alkylsalicylic acids are skin  
otoxicity evaluation on normal dermal  
licated that the oil is not toxic even at high  
reas unsaponifiable fraction containing  
alkylsalicylic derivatives are found to be  
ns above 50 µg/mL. As quality standards  
*biloba* phytopharmaceutical products is  
5 ppm for alkylsalicylic acids is set;

such as biofilm formation or membrane (al., 2020)).

ned the investigation of quality standards  
s fruits oil in commercial and artisanal  
identification of alkylsalicylic acids in  
ifiable fraction of *Pistacia lentiscus* fruit  
port of occurrence of alkylsalicylic acids  
fruits oil. As alkylsalicylic acids are skin  
otoxicity evaluation on normal dermal  
licated that the oil is not toxic even at high  
reas unsaponifiable fraction containing  
alkylsalicylic derivatives are found to be  
as above 50 µg/mL. As quality standards  
*biloba* phytopharmaceutical products is  
5 ppm for alkylsalicylic acids is set;



**Fig. 3.** % of Cell viability (mean  $\pm$  SEM) of Normal Human Dermal Fibroblasts submitted to. (A): *Pistacia lentiscus* L. artisanal oil samples 3 (Akbou 2017), 7 (El Kala) and 8 (Blida) from 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$ , (B) Unsaponifiable fraction of *Pistacia lentiscus* L. artisanal oil 3b (Akbou 2017), 7b (El Kala) and 8b (Blida) from 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$ . (Control: DMSO).

**Table 4.** GC-MS identification of phytosterols and alkylsalicylic acids from unsaponifiable.

| Ret.Time                                 | m/z                     | Identification           | 3b Akbou   |       | 7b Elkala  |       | 8b Blida   |       |
|------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| <i>Alkylsalicylic acids silyl esters</i> |                         |                          | Area       | %     | Area       | %     | Area       | %     |
| 11.683                                   | 374, 207, 193, 180, 165 | C15:1                    | 2 021 536  | 26.92 | 2 910 483  | 42.86 | 1 416 252  | 32.95 |
| 11.787                                   | 374, 207, 193, 180, 165 | C15:1                    | 298 418    | 3.97  | 294 500    | 4.34  | 216 470    | 5.04  |
| 11.851                                   | 376, 207, 193, 180, 165 | C15:0                    | 699 594    | 9.32  | 472 092    | 6.95  | 310 660    | 7.23  |
| 12.254                                   | 192, 143                | NI                       | 2 071 988  | 27.6  | 1 325 905  | 19.53 | 1 620 353  | 37.7  |
| 13.67                                    | 402, 180, 165           | C17:1                    | 1 480 699  | 19.72 | 1 092 044  | 16.08 | 507 068    | 11.8  |
| 13.765                                   | 402, 180, 165           | C17:1                    | 936 268    | 12.47 | 695 181    | 10.24 | 227 070    | 5.28  |
| <i>Phytosterols silyl esters</i>         |                         |                          |            |       |            |       |            |       |
| 26.804                                   | 472, 382, 343, 207, 129 | Campesterol, TMS         | 1 008 566  | 2.70  | 2 728 825  | 7.37  | 739 221    | 3.0   |
| 27.174                                   | 483, 393, 207           | NI                       | 323 628    | 0.87  | 257 251    | 0.69  | 0          | 0     |
| 28.025                                   | 484, 394, 355, 281, 207 | Stigmasterol, TMS        | 427 520    | 1.14  | 1 885 985  | 5.10  | 265 877    | 1.10  |
| 29.123                                   | 483, 393, 281, 207      | NI                       | 491 899    | 1.32  | 381 210    | 1.03  | 0          | 0     |
| 30.155                                   | 484, 394, 355, 281, 207 | NI                       | 193 489    | 0.52  | 174 070    | 0.47  | 0          | 0     |
| 30.476                                   | 486, 396, 381, 357, 255 | $\beta$ -Sitosterol, TMS | 19 841 066 | 53.09 | 22 865 500 | 61.79 | 16 281 468 | 67.57 |
| 31.205                                   | 386, 281, 207           | NI                       | 1 625 896  | 4.35  | 1 392 926  | 3.76  | 834 133    | 3.46  |
| 32.744                                   | 218, 189                | Lupeol TMS               | 4 269 839  | 11.42 | 2 826 449  | 7.64  | 2 239 892  | 9.30  |
| 33.253                                   | 483, 393, 365, 339      | NI                       | 7 122 113  | 19.06 | 2 761 691  | 7.46  | 2 148 576  | 8.92  |
| 36.330                                   | 483, 422, 407, 379, 281 | NI                       | 2 030 622  | 5.43  | 1 730 922  | 4.68  | 1 584 655  | 6.58  |

therefore, quantification of alkylsalicylic acids in *Pistacia lentiscus* oil both for nutraceutical or cosmeceutical use should be envisaged by manufacturers.

## Supplementary Material

Identification of alkylsalicylic acids in Lentisk oil (*Pistacia lentiscus* L.) and 1 cytotoxicity on Human Normal Dermal Fibroblasts.

The Supplementary Material is available at <http://www.ocljournal.org/10.1051/oclj/2021009/olm>.

## Declaration of competing interest

Authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Acknowledgments.** Authors thank the funding program H2020 MSCA-RISE EXANDAS – EXploitation of Aromatic plaNts’ by proDucts for the development of novel cosmeceuticals and food Supplements – H2020-MSCA-RISE-2015 – Grant agreement No. 691247. <https://www.exandas-project.eu/>.

## Author contributions

Conceptualization, methodology, S.B.; resources, S.B., N.B., S.C., formal analysis, S.B., N.B., A.B., S.O., T.R., B.L.F., investigation, S.B., N.B., A.B., S.O., E.C., T.R., data curation, N.B., S.B., A.B., S.O., E.C., T.R., writing-original draft preparation, S.B., N.B., T.R.; writing-review and editing, S.B., N.B., B.F., S.C., supervision, S.B., B.D., S.D., B.F.; project administration, S.B., B.D., S.D.; funding acquisition, S.B., B.D., S.M., S.D., S.C., B.F.

## References

- Aguilar-Ortigoza CJ, Sosa V, Aguilar-Ortigoza M. 2003. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. *Econ Bot* 57: 354–364. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0354:TPIVAS\]2.0.CO](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0354:TPIVAS]2.0.CO).
- Baron-Ruppert G, Luepke NP. 2001. Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen’s egg test (HET). *Phytomedicine* 8(2): 133–138. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00022>.
- Belsito DV, Klaassen CD, Liebler DC, Hill RA. 2013. Safety Assessment of phytosterols as used in Cosmetics. [cir-safety.org](http://cir-safety.org).
- Charef M, Yousfi M, Saidi M. 2008. Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (Quercus), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc* 85: 921–924. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1283-1>.
- Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, Kaselimis K. 2004. Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chem* 84(3): 463–474. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00273-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00273-5).
- Djerrou Z, Maameri Z, Hamdi-Pacha Y, *et al.* 2010. Effect of Virgin Fatty Oil of *Pistacia lentiscus* on Experimental Burn Wound’s Healing in Rabbits. *Afr J Trad Compl Altern Med* 7(3): 258–263. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v7i3.54788>.
- Duthil P. 2005. Usages alimentaire et pharmaceutique de l’amande du Ginkgo. *Bull Soc Pharm Bordeaux* 144: 301–310.
- Franke K, Masaoud M, Schmidt J. 2001. Cardanols from leaves of *Rhus thyrsoflora*. *Planta Med* 67(5): 477–479. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15813>.
- Jiang L, Si ZH, Li MH, *et al.* 2017. 1H NMR-based metabolomics study of liver damage induced by ginkgolic acid (15:1) in mice. *J Pharm Biomed Anal* 136: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.033>.
- Kajiyama Y, Fujii K, Takeuchi H, Manabe Y. 2002. Ginkgo seed poisoning. *Pediatrics* 109(2): 325–327. <https://doi.org/10.1542/peds.109.2.325>.
- Knight TE, Boll P, Epstein WL, Prasad AK. 1996. Resorcinols and catechols: a clinical study of cross-sensitivity. *Am J Contact Dermat* 7(3): 138–145. [https://doi.org/10.1016/S1046-199X\(96\)90001-9](https://doi.org/10.1016/S1046-199X(96)90001-9).
- Lanfranchi F, Bui T-M. 1998. L’oléastre et le lentisque, plantes oléagineuses sauvages dans l’économie néolithique en Corse et en Sardaigne. In: *Sardinian and Aegean Chronology: Towards the Resolution of Relative and Absolute Dating in the Mediterranean*. Studies in Sardinian Archaeology, Vol. 103. Oxford: Oxbow Books Ed., pp. 1–10.
- Lanfranchi F, Bui T-M, Girard M. 1999. La fabrication d’huile de lentisque (Linsticu ou chessa) en Sardaigne. *Journal d’agriculture traditionnelle et de botanique appliquée JATBA* 41(2): 81–100. <https://doi.org/10.3406/jatba.1999.3712>.
- Loi C. 2010. Preliminary Studies about the Productive Chain of Lentisk Oil through Ethnographic Witness and Experiments, Ethnoarchaeology: Current Research and Field Methods. In: *Conference Proceedings, Rome, Italy, 13th–14th May 2010* © Archaeopress and the individual authors 2013, Archaeopress Publishers of British Archaeological Reports Gordon House, England.
- Lomonaco D, Maia FJN, Mazzetto SE. 2013. Thermal evaluation of cashew nutshell liquid as new bioadditives for poly(methyl methacrylate). *J Therm Anal Calorim* 111: 619–626. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2383-6>.
- Maameri Z, Beroual K, Djerrou Z, *et al.* 2012. Preliminary study to assess cicatrizing activity of honey and *Pistacia lentiscus* fatty oil mixture on experimental burns in rabbits. *Int J Med Arom Plants* 2 (3): 476–480.
- Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Vincent Castola V, Casanova J. 2008. Composition and Chemical Variability of the Essential Oil from *Pistacia lentiscus* L. Growing Wild in Algeria: Part II: Fruit Oil. *J Essent Oil Res* 20(2): 104–107. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699965>.
- Mezni F, Maaroufi A, Msallem M, Boussaid M, Khouja ML, Khaldi A. 2012. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. seed oils. *J Med Plant Res* 6(39): 5266–5271. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.473>.
- Ndjoko K, Wolfender JL, Hostettmann K. 2000. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in Ginkgo biloba L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chrom B* 744(2): 249–255. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00316-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00316-9).

- Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, *et al.* 2020. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. Chia, Anacardiaceae): A review. *J Ethnopharmacol*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112485>.
- Rampersad SN. 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 12: 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>.
- Song YS, Jin C, Park EH. 2000. Identification of metabolites of phytosterols in rat feces using GC/MS. *Arch Pharm Res* 23(6): 599–604. <https://doi.org/10.1007/BF02975248>.
- Tahrioui A, Ortiz S, Azuama OC, *et al.* 2020. Membrane-Interactive Compounds From *Pistacia lentiscus* L. Thwart *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Front Microbiol* 11: 1068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01068>.
- Trabelsi H, Cherif OA, Sakouhi F. 2012. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chem* 131(2): 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.083>.
- Wang M, Zhao J, Avula B, *et al.* 2014. High-resolution gas chromatography/mass spectrometry method for characterization and quantitative analysis of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* plants, extracts, and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 62(50): 2103–2111. <https://doi.org/10.1021/jf503980f>. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25383633.
- Wyllie S, Brophy JJ, Sarafis V, Hobbs M. 2006. Volatile Components of the Fruit of *Pistacia lentiscus*. *J Food Sci* 55: 1325–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03926.x>.

**Cite this article as:** Benalia N, Boumechhour A, Ortiz S, Echague CA, Rose T, Fiebich BL, Chemat S, Michel S, Deguin B, Dahamna S, Boutefnouchet S. 2021. Identification of alkylsalicylic acids in Lentisk oil (*Pistacia lentiscus* L.) and viability assay on Human Normal Dermal Fibroblasts. *OCL* 28: 22.