



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thème :

**Optimisation de l'extraction des Flavonoïdes à
activité antibactérienne et antifongique de *Pistacia
lentiscus L***

Présenté par :

Soutenu le: 19/06/2018

-Agaguena Afaf.

-Kellil Aya.

Devant le jury:

*Président : Dr Zeraib A.

MCB univ. Khenchela.

*Examinatrice : M^{me}. Boutarfa S.

MAA univ Khenchela.

*Promoteur: Mr. Rahal K.

MAA univ.Khenchela.

Promotion : Juin 2018

**Le travail a été réalisé au niveau du : laboratoire pédagogique de Microbiologie, Université
Abdess Laghrou-Khenchela**

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses personnes que nous tenons à remercier par ces quelques lignes

*La première personne que nous tenons à remercier est notre promoteur **Rahal K**, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité*

*Nous remercions aussi très vivement, **Dr Zeraïb A**. vous nous faites le grand honneur de présider ce modeste travail. Nous vous prions de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect.*

*Un tout grand merci à **M^{me} Boutarfa S**; Nous vous remercions de nos faire l'honneur de juger ce modeste travail, et Veuillez accepter nos chaleureux remerciements pour votre participation à ce jury*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Monsieur : **Laouar Nadir** et **Boussaa Abd el Halim** et la directrice de laboratoire de Abbas Laghrour Khenchela Madame **Chorfi R** et tout l'équipe du laboratoire sans exception surtout MAJIDA et SARA pour leurs aide et surtout leurs gentillesse.*

Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail, et que nous ne pouvons citer individuellement.



DÉDICACE

*Avec Nos sentiments de gratitudes les plus
profonds,*

Nous dédions ce modeste travail

*A Nos très chers parents, sans eux nous
n'aurions pas pu être ce qu'on est, en
reconnaissance de leurs efforts et sacrifices,
leurs amours et soutiens et leurs
encouragements durant toutes nos études. Qui
nous a donné confiance et sécurité*

*A nos adorables sœurs et frères pour leur
aide précieuse ; que dieu les bénissent*

*A toute la famille : **Kellil et Agaguena***

*A nos très chères amies et collègues de
promotion que je m'excuse de ne pas les avoir
citées*

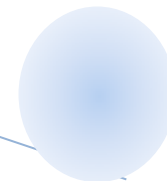


Table de matière	I
Abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VII
Introduction	01
<i>Première partie: Synthèse bibliographique</i>	
Chapitre I: Etude caractéristique de <i>Pistacia lentiscus</i>	
I.1.Position systématique et géographique	03
I.1.1.Taxonomie	04
I.1.2.Répartition géographique de <i>Pistacia lentiscus</i>	05
I.2. Description botanique	06
I.3. Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	08
Chapitre II: Métabolisme secondaire des végétaux	
II.1.Biosynthèse et types des métabolites secondaires des végétaux	
II.2. Les composés phénoliques	11
II.2.1.Généralités	11
II.2.2.Biosynthèse	12
II.2.3.Les principales classes de polyphénols	13
a- Acides phénoliques	13
b-Les flavonoïdes	14
c-Les tanins	16
II.3.Activités biologique des polyphénols	16
II.3.1.Activité antioxydante	17
II.3.2. Activité antibactérienne	18
II.3.3. Activité antifongique	18
Chapitre III: Les plans d'expériences	
III.1. Objectifs des plans d'expériences	19
a-Dégrossir un problème	20
b-Recherche d'un optimum	20
c-Modélisation d'un système	21
III.2.Le plan de surface de réponse	21
III.3.plans composites	21
a- Le plan factoriel	22

b-Les points au centre du domaine d'étude	22
III.4. plans de Box-Behnken	23
<i>Deuxième partie: Matériel et Méthodes</i>	
I. Matériel	24
I.1. Matériel végétal	24
I.2. Produits chimiques utilisés	24
I.3. Souches microbiennes testées	24
II. Méthodes	25
II.1.Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques	25
II.1.1.Recherche du meilleur solvant d'extraction	25
II.1.2. Extraction.	25
II.1.3.Dosage des Flavonoïdes	26
III. Evaluation de l'activité antibactérienne	26
III.1.Revivification des souches	26
III.2.Préparation de l'inoculum	27
IV. Activité antifongique	28
V. Analyse statistique des données	29
<i>Troisième partie: Résultats et discussion</i>	
I. la teneur des Flavonoïdes totaux	30
I.1. Analyse statistique	30
I.2. Analyse des surfaces de réponse	33
I.2.1. Effet de la température et le ratio sur l'extraction des flavonoïdes	33
I.2.2. Effet de la température et concentration solvant sur l'extraction de flavonoïdes	34
I.2.3. Effet du temps et le ratio sur l'extraction de flavonoïdes	35
II. Activité antimicrobienne	35
II.1. Analyse statistique	36
II.2. Pour <i>Bacillus cereus</i>	39
II.3. Pour <i>Staphylococcus aureus</i>	40
II.4. Pour <i>Listeria monocytogenese</i>	40
II.5. Pour <i>Escherichia coli</i>	41
II.6. Pour <i>Pseudomonas aerogenosa</i>	42
II.7. Pour <i>Aspergillus niger</i>	42
II.8. Pour <i>Botrytis cineria</i>	43

II.9. Pour <i>Cladosporium</i>	43
II.2. Analyse des surfaces de réponses d'activités	44
II.2.1. Pour <i>Bacillus cereus</i>	44
a-Effet du temps et la température sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	44
b-Effet de la température et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	45
c- Effet de temps et de concentration de solvant sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	45
d-Effet de temps et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	46
e-Effet de la température et de concentration de solvant sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	46
f-Effet de concentration de solvant et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	47
II.2.2. Pour <i>Staphylococcus aureus</i>	47
a-Effet de la température et le ratio sur l'activité anti- <i>S.aureus</i>	47
b-Effet de temps et de pourcentage de solvant sur l'activité anti- <i>S.aureus</i>	48
II.2.3. Pour <i>Listeria monocytogenes</i>	49
a-Effet de ratio et de concentration de solvant sur l'activité anti- <i>L.monocytogenes</i>	49
II.2.4. Pour <i>Cladosporium</i>	49
a-Effet de ratio et de temps sur l'activité anti- <i>Cladosporium</i>	49
II.2.5. Pour <i>Aspergillus niger</i>	50
a-Effet de température et de temps sur l'activité anti- <i>A.niger</i>	50
III- Optimisation des processus et étude de confirmation	51
Conclusion et perspectives	53
Références bibliographiques	54
Annexes	
Résumé	

Liste des Abréviations

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli.</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B.cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>P.aerogenosa</i>	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>
<i>L.monocytogénese</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>B.cinéria</i>	<i>Botrytis cinéria</i>
<i>A.niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>P.lentiscus</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
RSM	Reponse surface methodologie
GAE	Acide gallique
MeOH	Méthanol
MH	Muller Hinton
NaCl	Chlorure de sodium
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
Nm	Nanomètre
TF	teneur en flavonoïdes totaux
µl, ml	Microlitre, millilitre
Q	Quercétine
Ms	Matière sèche

Liste des figures

Figure	Page
Figure N°01: <i>Pistacia lentiscus</i> [Anacardiaceae], arbuste commun des maquis et garigues en Algérie	03
Figure N°02: Distribution de <i>Pistacia lentiscus</i> dans le bassin méditerranéen	05
Figure N°03: Aire de répartition du genre <i>Pistacia</i>	05
Figure N°04: Arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i> .	06
Figure N°05: Branches et fruits de <i>Pistacia lentiscus</i>	07
Figure N°06: Fleurs de <i>Pistacia lentiscus</i>	07
Figure N°07: Mastic de <i>Pistacia lentiscus</i>	08
Figure N°08: (Mastic Gum 500 mg)Supplément nutritionnel de Mastic et l'Huile essentielle lentisque pistachier (bio)	09
Figure N°09: Biosynthèse des métabolites secondaires	11
Figure N°10: les principales classes de flavonoïdes	15
Figure N°11: Plan composite pour l'étude de deux facteurs	22
Figure N°12: Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs	23
Figure N°13: Arbre de <i>P.lentiscus</i>	24
Figure N°14: Les Fleurs de <i>P. lentiscus</i>	24
Figure N°15: Récupération des 27 extraits et conservation a -20c°	24
Figure N°16: Repiquage des souches bactériennes bactéries	26
Figure N°17 : Standardisation d'inoculum par comptage en utilisant la cellule Mallassez	26
Figure N°18: Graphique de valeurs observées en fonction de valeurs prévues du TF	31
Figure N°19: Histogramme de la teneur des flavonoïdes selon différentes facteurs	32
Figure N°20: Diagramme de surface de réponse d'Effet de la température et le ratio sur l'extraction des flavonoïdes	33
Figure N°21: Diagramme de surface de réponse Effet de la température et concentration solvant sur l'extraction de flavonoïdes	34
Figure N°22 : Diagramme de surface de réponse Effet du temps et le ratio sur l'extraction de flavonoïdes	35

Liste des figures

Figure N°23 : Graphique de valeurs observées en fonction de valeurs prévues des champignons	38
Figure N°24 : Graphique de valeurs observées en fonction de valeurs prévues des bactéries	39
Figure N°25: Diagramme de surface de réponse Effet du temps et la température sur l'activité anti- <i>Bacillus cereuse</i>	44
FigureN°26 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de la température et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	45
Figure N°27 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de temps et de concentration de solvant sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	45
Figure N°28 : Diagramme de surface de réponse d'effet de temps et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	46
Figure N°29 : Diagramme de surface de réponse d'effet de la température et de pourcentage de solvant sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	46
Figure N°30: Diagramme de surface de réponse de l'effet de concentration de solvant et le ratio sur l'activité anti- <i>Bacillus cereus</i>	47
Figure N°31 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de la température et le ratio sur l'activité anti- <i>S.aureus</i>	47
FigureN°32: Diagramme de surface de réponse de l'effet de temps et de pourcentage de solvant sur l'activité anti- <i>S.aureus</i>	48
Figure N°33 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de ratio et de pourcentage de solvant sur l'activité anti- <i>L.monocytogenese</i>	49
Figure N°34 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de ratio et de temps sur l'activité anti- <i>Cladosporium</i>	49
Figure N°35 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de température et de temps sur l'activité anti- <i>A.niger</i>	50
FigureN°36 : Optimisation des processus d'extraction des flavonoïdes totaux et d'activités antimicrobiennes.	52

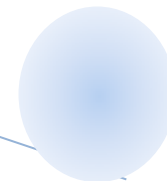
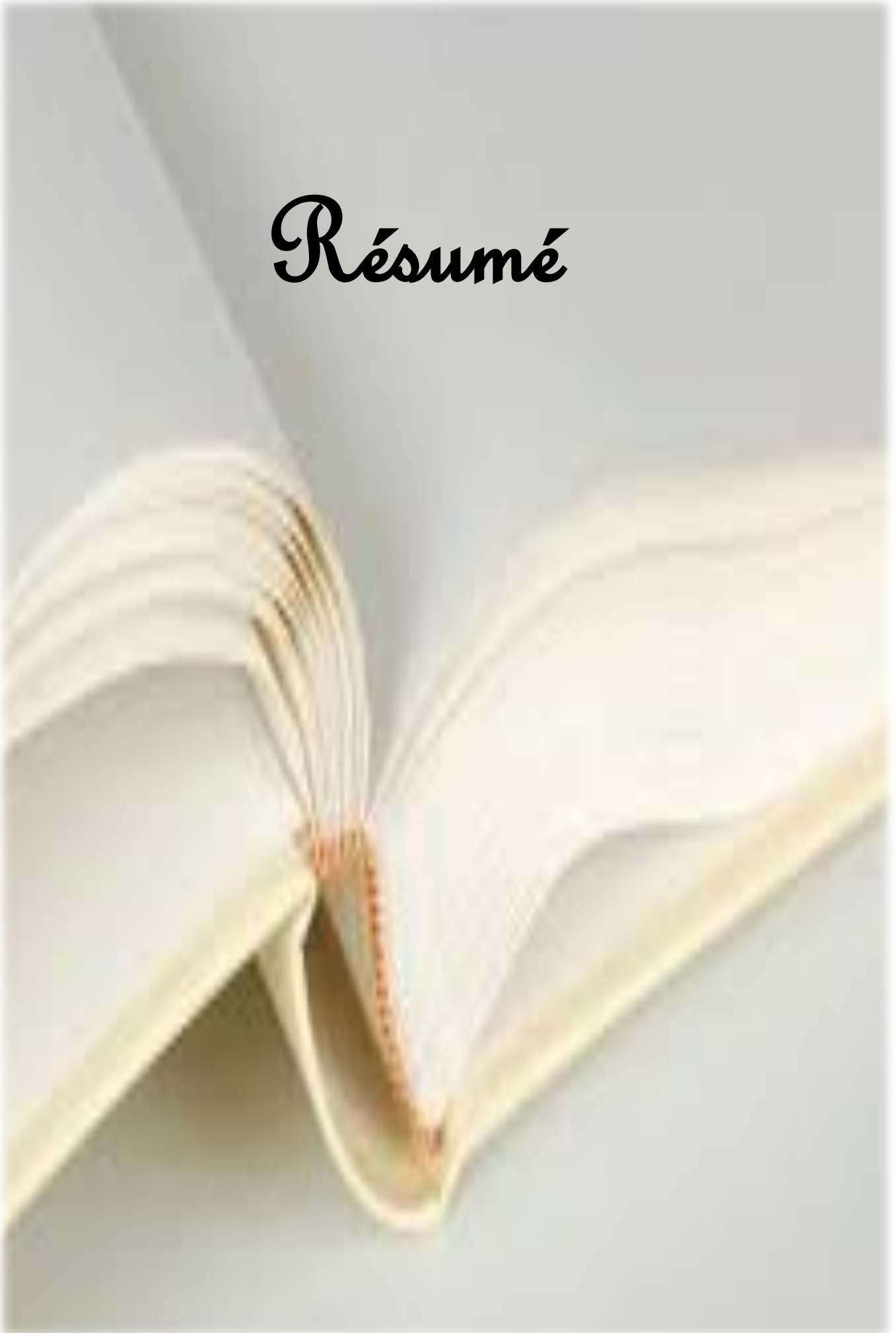


Tableau	Page
Tableau N°01 : Place du taxon dans la classification	05
Tableau N°02 : les différentes classes des composés phénoliques	13
Tableau N°03 : les souches de micro-organismes utilisées et leurs origines.	25
Tableau N°04 : Niveaux des variables choisies pour les essais	29
Tableau N°5 : Analyse de la variance des TF et défaut d'ajustement	31
Tableau N°6 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>B.cereus</i> ..	36
Tableau N°7 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>S.aureus</i> ...	37
Tableau N°8 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>L.monocytogenese</i>	37
Tableau N°9 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>P.aerogenosa</i>	38
Tableau N°10 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement d' <i>E. coli</i> .	38
Tableau N°11 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>Cladosporium</i>	39
Tableau N°12 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>A.niger</i>	39
Tableau N°13 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de <i>B.cineria</i>	40

Résumé



Résumé :

Dans ce travail nous nous sommes intéressées par optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes à partir des fleurs de *Pistacia lentiscus* et étude de leur activité antibactérienne et antifongique récolté d'une région d'El hama Wilaya de khenchela. Cependant, la méthodologie de surface de réponse (RSM) a été utilisée pour optimiser les conditions du potentiel antimicrobienne et des flavonoïdes de la poudre des fleurs de *P.lentiscus* en utilisant quatre variables indépendantes: méthanol (60% ,80% et 100%), solvant / rapport d'échantillon (1/20,1/15,1/10)), température (30, 50 et 70 C°) et durée (30, 75 et 120 min).Les résultats obtenus révèlent que l'extrait méthanolique de fleurs de *P.lentiscus* possède une teneur faible en flavonoïdes (720 µg équivalent de quercétine/g). De plus, l'évaluation d'activité biologique d'extrait méthanolique de fleurs de *P.lentiscus* montre une bonne activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et une faible activité contre les bactéries à Gram négatif ainsi qu'une importante activité antifongique. Dans les conditions optimales étaient de 63.40% de méthanol aqueux, le rapport solvant / échantillon est de 1/18, la température est de 30 ° C et le temps d'extraction est de 50.28 min les valeurs maximal de teneur en flavonoïdes totaux et activité antibactériennes et antifongique étaient de 876.18 ±94 µg EQ /gMs et de 17.06, 12.93, 10.81, 7.90, 11.42, 10.30, 21.34 et 13.66, respectivement. Sur la base de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* représente une activité antimicrobienne intéressante

Mots clés : Pistacia lentiscus, Fleurs, Optimisation d'extraction, Flavonoïdes, Méthodologie de surface de réponse, Activité antimicrobienne

Summary

In this work we are interested in optimizing flavonoid extraction conditions from *Pistacia lentiscus* flowers and studying their antibacterial and antifungal activity harvested from a region of El hama Wilaya of Khenchela. However, the response surface methodology (RSM) was used to optimize the conditions of the antimicrobial potential and flavonoids of *P.lentiscus* flower powder using four independent variables: methanol (60%, 80% and 100%) solvent / sample ratio (1 / 20.1 / 15.1 / 10)), temperature (30, 50 and 70 ° C) and time (30, 75 and 120 min). The results obtained reveal that the methanolic extract of *P. lentiscus* flowers has a low content of flavonoids (720 µg équivalent de quercétine/gMs). In addition, the biological activity evaluation of methanolic extract of *P.lentiscus* flowers showed good antibacterial activity against gram-positive bacteria and low activity against Gram-negative bacteria as well as significant antifungal activity. Under the optimal conditions were 63.40% aqueous methanol, the solvent / sample ratio is 1/18, the temperature is 30 ° C and the extraction time is 50.28 min the maximum values of total flavonoid content and activity Antibacterial and antifungal were 876.18 ±94 µg EQ /gMs and 17.06, 12.93, 10.81, 7.90, 11.42, 10.30, 21.34 and 13.66, respectively. Based on these results, we can say that leaf extract of *P. lentiscus* represents an interesting antimicrobial activity

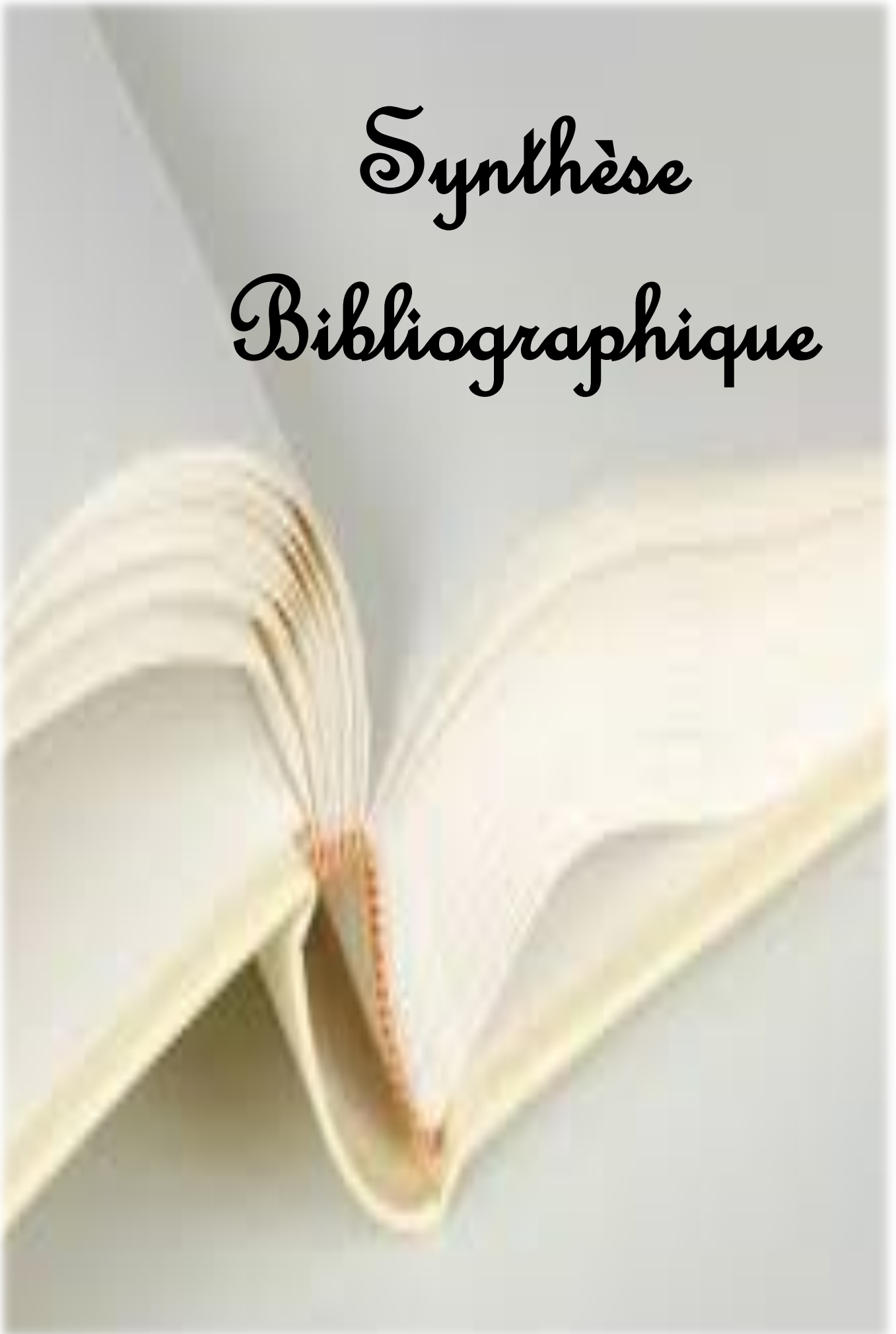
Key words: *Pistacia lentiscus*, Flowers, Extraction optimization, Flavonoids, Surface response methodology, Antimicrobial activity

الملخص

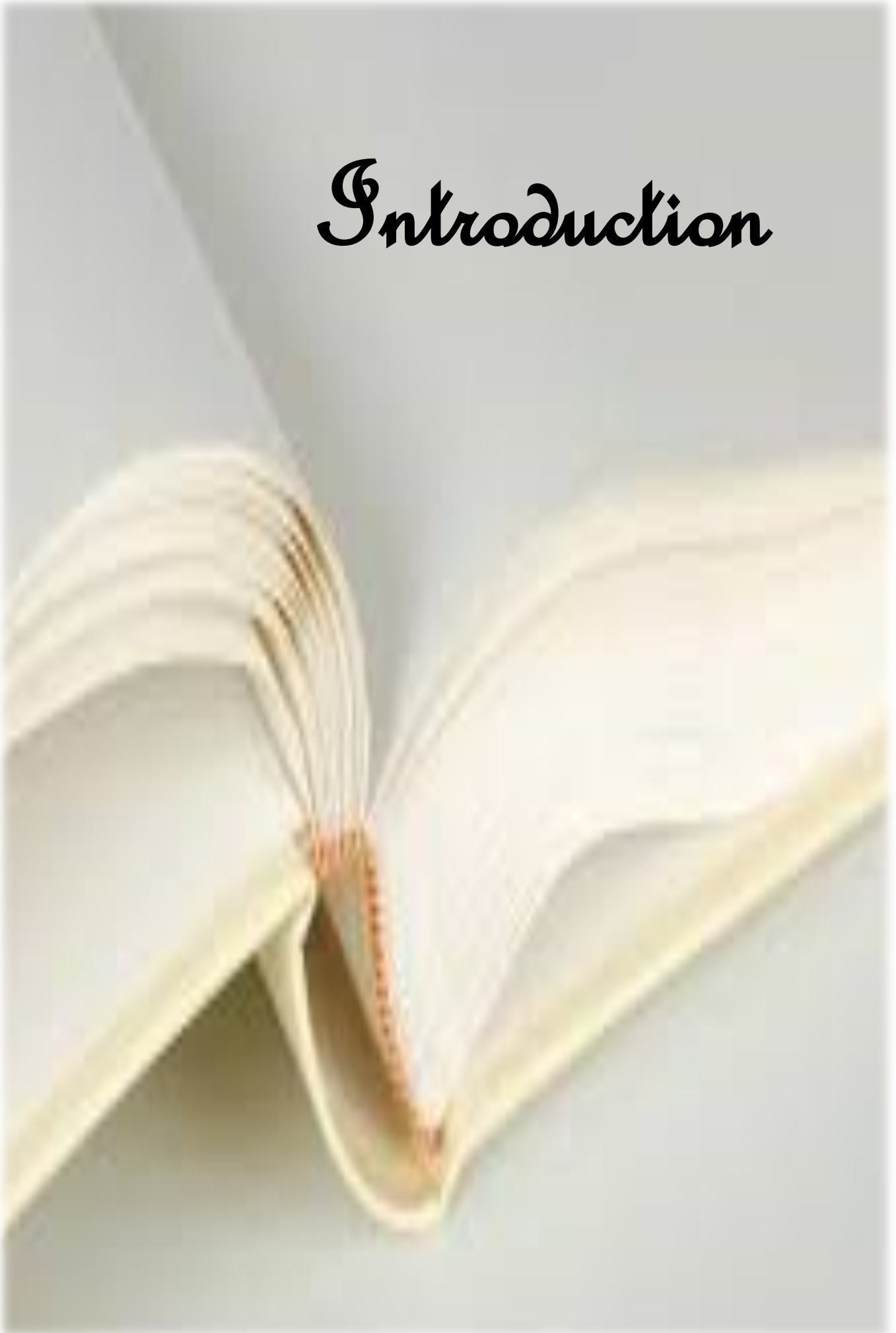
في هذا العمل، نحن مهتمون بتحسين شروط استخراج الفلافونيدات من زهور شجيرة الضرو و دراسة نشاطها المضاد للجراثيم و الفطريات الذي تم أخذ العينات من منطقة الحامة ولاية خنشلة حيث تم استخدام المنهجية الاحصائية سطح الاستجابة للحصول على الظروف المثلى الموافقة للنشاط الأمثل المضاد للبكتيريا وكمية الفلافونيدات المستخرجة من مسحوق زهور شجيرة الضرو وذلك بدراسة تأثير أربعة عوامل مؤثرة و هي: تركيز الميثانول (60%، 80%، 100%) و درجة الحرارة (30°C 50°C 70°C) و الوقت (30، 70، 120 دقيقة) و نسبة المذيبات/العينة (1/10 1/15 1/20). النتائج التي تم الحصول عليها تكشف عن ان المستخلص الميثانولي يحتوى على كمية منخفضة من مركبات الفلافونيدات 720 ميكروغرام بالإضافة الى ذلك أظهر تقييم النشاط الحيوى نشاطا مضادا للجراثيم ضد البكتيريا اجابية الجرام ونشاط منخفض ضد البكتيريا سالبة الجرام بالإضافة الى نشاط مضاد للفطريات لمستخلص الميثانول من زهور الضرو فى ضل الظروف المثلى 63.40% من الميثانول و نسبة المذيب/العينة هي 1/18 ودرجة الحرارة هي 30 ووقت الاستخلاص هو 50.28 دقيقة القيمة القصوى لكمية الفلافونيدات و النشاط مضاد للبكتيريا و مضاد الفطريات كان 94 ميكروغرام / EQ و 17.06 و 12.93 و 10.81 و 7.90 و 11.42 و 10.30 و 21.34 و 13.66 على التوالي وبناءا على هذه يمكننا القول ان مستخرج أوراق شجيرة الضرو يمثل نشاطا ذو أهمية كبيرة .

كلمات البحث : شجيرة الضرو، الاستخراج الأمثل، منهجية الاستجابة السطحية، نشاط مضاد للميكروبات.

Synthèse Bibliographique



Introduction



La région méditerranéenne abrite une diversité biologique de première importance. La plupart des espèces de la flore spontanée sont remarquablement résistantes et bien adaptées à la sécheresse et à la salinité. En Afrique du Nord, elles constituent une part très importante des ressources génétiques locales à valeurs pastorales, fourragères, alimentaires, aromatiques et médicinales **(Bensalem., 2014)**.

L'Algérie est connue par sa diversité en ressources végétales. Parmi lesquelles cet arbuste spontané qui pousse sur tout le bassin méditerranéen porte le nom de pistachier de lentisque (*Pistacia lentiscus L.*) **(Amirouche, 2008)**.

Pistacia lentiscus L est un arbrisseau appartenant à la famille des *Anacardiaceae* **(Gausson et al., 1982)**, c'est une espèce médicinale qui se développe sur tout type de sol, dans l'Algérie subhumide et semi-aride. La vaste utilisation de cette plante de la pharmacopée arabe et européenne depuis les anciens temps en médecine traditionnelle (soigner quelques irritations de la peau, la chute de cheveux et certains maux gastriques) est justifiée par sa richesse en composants chimiques ayant une odeur aromatique telle que les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins... **(Hamlat et Hassani, 2008)**.

Une des originalités majeures des végétaux, réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, en effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, **(Mekkiou, 2005)**. Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications **(Achat, 2013)**.

Introduction



L'objectif de notre travail est d'arriver à l'optimum de l'extraction de ces substances et l'évaluation du taux des flavonoïdes extraits des fleurs de *Pistacia lentiscus* et la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique; en utilisant des solvants en parallèle avec différents facteurs physicochimiques.

La présentation de nos travaux peut être répartie comme suit :

1- La première partie constitue l'étude bibliographique et subdivisée en trois chapitres :

- Chapitre I : initie le lecteur au sujet traité dans le mémoire à travers des généralités sur les caractéristiques de l'espace *Pistacia lentiscus*.
- Chapitre II : présente les différents métabolites secondaires végétaux.
- Chapitre III : se focalise sur les plans d'expériences.

2- La seconde partie traite la phase expérimentale :

Cette partie s'intéresse au matériel étudié, au corpus d'étude (échantillons) et aux modes d'extraction des Flavonoïdes du pistachier. Il a été réservé aux différentes analyses effectuées sur les échantillons

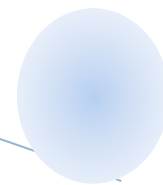
3- La troisième partie : est consacrée à la description et la discussion des résultats obtenus.

Des références bibliographiques et des annexes viennent compléter le texte élaboré en mémoire inauguré par une introduction générale et clôturé par une conclusion.



Chapitre I :

*Etude caractéristique de
Pistacia lentiscus*



Généralité :

Le *Pistachier lentisque* est connu sous l'appellation de : **Darou, dherou** ou **drou** en arabe local, **lentisque** et **arbre au mastic** en Français et **lentisk** en Anglais, c'est un arbre spontané qui pousse sur tout le bassin méditerranéen. Il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tous les types de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux. En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières (**More., White, 2005**).

Pistacia Lentiscus est particulièrement représentatif des milieux les plus chauds du climat méditerranéen que l'on retrouve en association avec l'Oléastre (olivier sauvage), la salsepareille et le myrte dans un groupement végétal nommé "l'Oléolentisque" (l'Oléolentiscetum des phytosociologues), mais également dans les boisements clairs à Pin d'Alep ou d'autres formations de garrigues basses (Chêne vert). (**Belfadel, 2009**).

I.1.Position systématique et géographique

I.1.1.Taxonomie

La famille *Anacardiaceae* a été proposée pour la première fois par Lindley en 1830 (**tableau N°1**). Les espèces de cette famille sont des arbres, des arbustes ou des lianes à feuilles alternes, composées et imparipennées (**Arbonnier, 2002**) (**figure N° 01**) que l'on rencontre surtout dans les régions tropicales à subtropicales et dans les régions tempérées de l'hémisphère N



Figure N° 01 : *Pistacia lentiscus* [*Anacardiaceae*], arbuste commun des maquis et garigues en Algérie. (01)

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de *Pistacia lentiscus*:

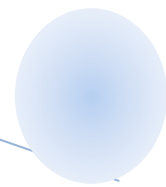


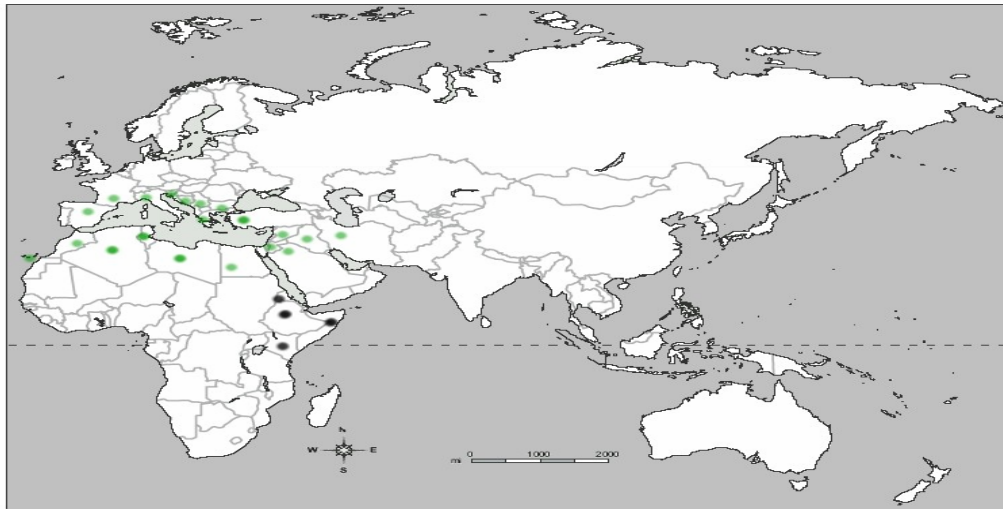
Tableau N°01 : Place du taxon dans la classification (Guignard et Dupont, 2004 ; Pell, 2004).

Rang	Nom scientifique
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophytes</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones Vraies Supérieures</i>
Sous-classe	<i>Rosidees</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>

I.1.2. Répartition géographique de *Pistacia lentiscus*

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 Canaries (Bellakhdar, 2003). Il pousse à l'état sauvage dans les garrigues et sur les sols en friche. Cet arbrisseau dioïque thermophile, préférant les terrains siliceux pauvres en potassium et en phosphore (Djerrou, 2011), se retrouve sur tout type de sol dans l'Algérie subhumide et semi-aride (Saadoun, 2002), plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2000).

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de *Pistacia lentiscus*:



● Présence de Pistachier lentisque

Figure N°02 : Distribution de *Pistacia lentiscus* dans le bassin méditerranéen (AL-Saghir, 2006)

Selon Dogan et *al.*, (2003), cette espèce est adaptée au stress hydrique consécutif et est capable de lutter contre l'érosion qui représente un facteur primordial de désertification de l'écosystème des régions méditerranéennes semi arides.

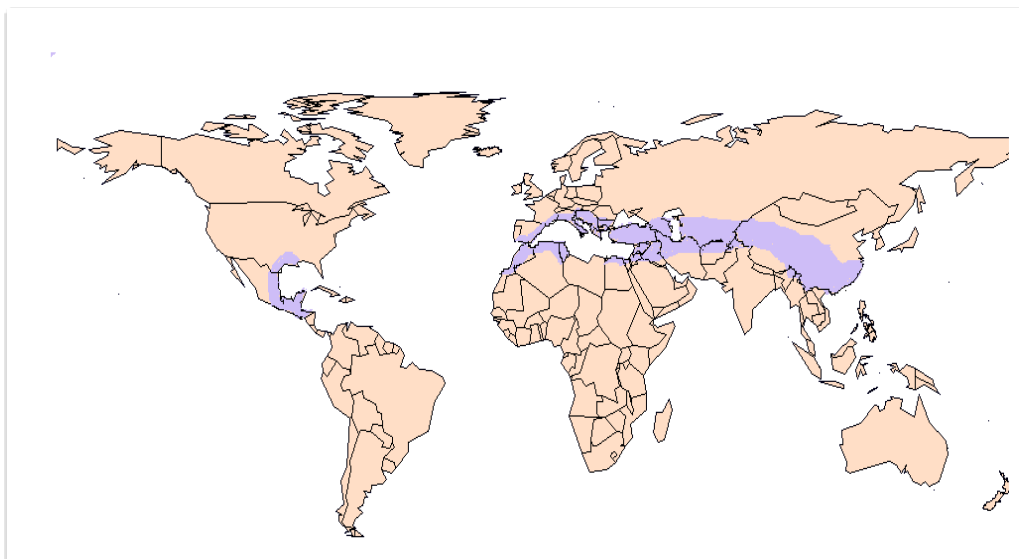


Figure N° 03 : Aire de répartition du genre *Pistacia* (Belfadel., 2009).

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de *Pistacia lentiscus*:

I.2. Description botanique

Le lentisque est en général un arbrisseau pouvant atteindre trois mètres, c'est parfois aussi un arbuste ne dépassant pas six mètres et on le trouve à des hauteurs variant entre 0 – 800 m (Sid-Ahmed ., 2014), dont les diverses parties sont décrites 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. (Belfadel ., 2009)
- ✓ **Branches :** tortueux, nombreux, assemblés en tête presque ronde. (Audouin *et al.*, 1826).
- ✓ **Fruits :**
 - ✚ *Maturité :* Octobre à Novembre.
 - ✚ *Type :* grappe de petites drupes globuleuses, d'environ 5 mm de diamètre initialement rouges avant de devenir noir à maturité.
 - ✚ *Chair :* peu développée.
 - ✚ *Graines :* une amande par noyau.
 - ✚ *Dispersion :* par les passereaux. (Botineau ., 2015).



Figure N° 04: Arbuste de *Pistacia lentiscus*. (02)

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de *Pistacia lentiscus*:

- ✓ **Port** : arbrisseau d'environ 3 m de haut atteignant parfois 5-6 m, dégageant une odeur résineuse pénétrante.
- ✓ **Feuilles** : persistantes, composée à nombre pair de folioles (jusqu'à 12) coriaces, étroites et pointues ; pétioles ailés entre les folioles (Botineau., 2015).



Figure N° 05 : Branches et fruits de *Pistacia lentiscus*. (03)

- ✓ **Inflorescences et Fleurs** : grappes de toutes petites fleurs apétales ; plante dioïque, fleurs mâles à 5 sépales et 5 étamines rougeâtres, fleurs femelles à 3 ou 4 sépales entourant l'ovaire, floraison : Mars –Mai (Botineau., 2015).



Figure N° 06 : Fleurs de *Pistacia lentiscus*. (04)

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de *Pistacia lentiscus*:

- ✓ pratiquant des incisions transversales sur l'écorce de *Pistacia lentiscus*, De fluide très visqueuse, elle finit par se concréter à l'air, et c'est dans cet état qu'elle est connue sous le nom de Mastic (**Audouin et al., 1826**).



FigureN° 07 : Mastic de *Pistacia lentiscus*.(05)

I.3. Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité (**Palevitch et Yaniv., 2000**).

La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (**Merzougui ., 2015**).

La partie aérienne de *Pistacia lentiscus*. est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques.

Les feuilles ont pourvue d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante.

Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires.

La résine obtenue de *Pistacia lentiscus* est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et Par conséquent, cliniquement, le mastic est souvent cité comme un Remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, diarrhée, infections bactériennes, ulcères gastroduodénaux et comme un agent antiseptique du système respiratoire (**Belfadel ., 2009**).

Chapitre I: Etude caractéristique de l'espèce de Pistacia lentiscus:

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 mastic de Chios induit l'apoptose (Balan et coll., 2005) et dispose d'action anti-proliférateur contre les cellules cancéreuses du côlon. L'huile essentielle de lentisque est connue pour ses vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires. (Balan et coll., 2007).

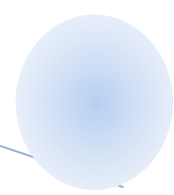


Figure N°08:(Mastic Gum 500 mg) Supplément nutritionnel de Mastic et l'Huile essentielle lentisque pistachier (bio) (06).



Chapitre II :

Métabolisme secondaire des végétaux



Généralité

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéines, lipides et acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires (**Macheix *et al.*,2005**), qui interviennent dans toutes les réactions biochimiques non strictement nécessaires à la survie de l'organisme au repos, mais permettent d'optimiser ses conditions de vie et de se défendre contre les agressions (**Suty, 2015**). Les principaux métabolites secondaires sont d'abord produits et identifiés dans les plantes, et sont également nommés comme phytochemicals, phyto signifiant plants, donc produits chimiques dérivés des plantes (**Kathirvel, 2016**).

II.1. Biosynthèse et types des métabolites secondaires des végétaux :

Les métabolites secondaires d'origine végétale sont présents dans toutes les parties des plantes ; les feuilles, les fruits, les fleurs, la tige, l'écorce et même dans les racines. Les scientifiques ont également découvert la production de métabolites secondaires dans les racines, ou elles sécrètent souvent les métabolites dans le milieu environnant, ce qui facilite la collecte (**Kathirvel, 2016**).

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultent généralement de trois voies de biosynthèse (**Figure 01**): la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate. La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse (pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl-CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (**Mayer, 2004**).

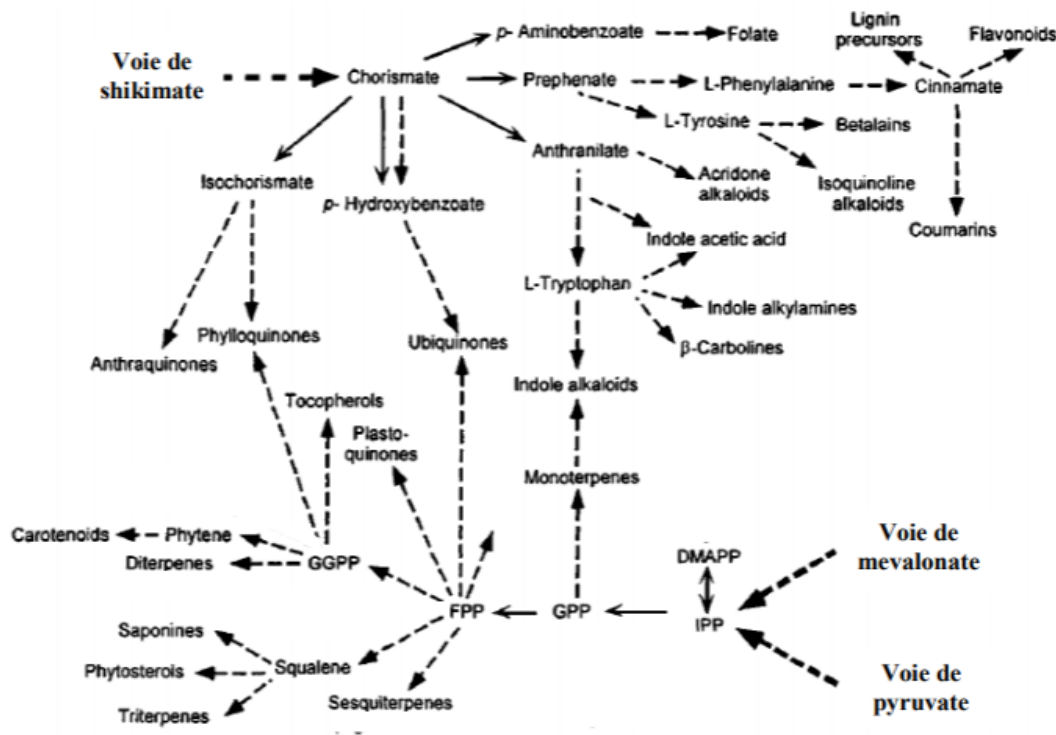


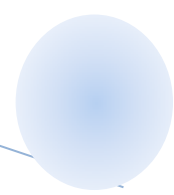
Figure N°09 : Biosynthèse des métabolites secondaires (Verpoorte, 2000).

Leur classification est basée sur la structure chimique, la composition, leur solubilité dans divers solvants, ou la voie par laquelle ils sont synthétisés. Le système de classification comprend trois groupes principaux: les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. (Kabera *et al.*, 2014).

II.2. Les composés phénoliques :

II.2.1. Généralités :

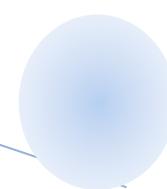
Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999). En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi *et al.*, 2003). Les principales classes de composants phénoliques sont: les Acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxy-cinnamique, acide chloro-génique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999).



II.2.2. Biosynthèse :

La biosynthèse du noyau aromatique est un processus fondamental de la biochimie végétale. Par conséquent, la définition des composés phénoliques prend en compte, à la fois des éléments structuraux et l'origine biogénétique des composés. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Le ou les noyaux aromatiques peuvent être synthétisés soit par la voie du shikimate, soit par celle de l'acétate, ce qui permet de différencier deux classes de composés phénoliques. Par ailleurs, la voie des poly-acétates intervient chez les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates. Les composés obtenus sont dits mixtes (flavonoïdes) (**KRIEF,2003**). La voie de l'acétate a été reconnue initialement par Collie, puis plus tard indépendamment et sur des bases différentes par Birch comme le résultat d'un raisonnement inductif à partir de comparaisons structurales d'un grand nombre de produits naturels principalement des phénols. L'acide acétique, d'importance connue dans la biosynthèse des graisses et des terpénoïdes, a été révélé comme une unité structurale dans les composés phénoliques par la présence d'atomes d'oxygène « marqueurs », tout comme les unités structurales des composés isoprénoïdes sont délimitées par des atomes de carbone et dans les alcaloïdes par des atomes de carbone et d'azote.

La biosynthèse phénolique de l'acide acétique peut être envisagée à deux niveaux: d'une part, la génération du principal squelette carbone-oxygène des unités acétate, et d'autre part, les modifications structurales ultérieures de ce squelette, incluant l'introduction et l'élimination de certains substituants (**Ollis,1965**).



II.2.3. Les principales classes de poly-phénols :

Tableau N°02: les différentes classes des composés phénoliques (MACHEIX *et al*, 2005)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine(exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféïque, fêrulique Scopoléline, esculétine	Pomme de terre, pomme, Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvértrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanols Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, Fleurs, fruits rouges, Pomme, raisin, Citrus Soja. Pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅) _n	Tannins		Raisin rouge, kaki

a. Acides phénoliques :

Ces composés peuvent être divisés en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxy-benzoïques, tels que l'acide gallique, sont présents dans très peu de plantes consommées par l'homme, c'est la raison pour laquelle ces composés ne sont pas actuellement considérés comme présentant un grand intérêt nutritionnel. Leur teneur en plantes comestibles est généralement très faible, à l'exception de certains fruits rouges, c'est-à-dire des mûres qui contiennent jusqu'à 270 mg / kg de poids frais.

Les acides hydroxy-cinnamiques sont plus courants que les acides hydroxy-benzoïques et constitués principalement en acides coumarique, caféique et férulique. Ces acides sont rarement présents sous forme libre, sauf dans les aliments transformés ayant subi une congélation, une stérilisation ou une fermentation. Les formes sont des dérivés glycosylés ou des esters de l'acide quinique, de l'acide shikimique et de l'acide tartrique. L'acide caféique, libre et estérifié, est généralement l'acide phénolique le plus abondant et représente entre 75% et 100% de la teneur totale en acide hydroxy-cinnamique de la plupart des fruits. L'acide férulique se trouve principalement dans la forme trans, qui est estérifiée en arabinoxylanes et hémicellulose dans l'aleurone et le péricarpe des grains. Seulement 10% de l'acide férulique est trouvé dans le son de blé (**Gutierrez et al., 2012**).

b. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, universellement présents chez les plantes supérieures, constituent le groupe le plus grand et le plus diversifié des composés phénoliques. Ils sont normalement associés à un sucre pour former un glycoside soluble dans l'eau, et sont stockés dans les vacuoles des cellules végétales. On distingue les flavones (la lutéoline, etc), les flavanones (la naringénine..), Les flavonols (le kaempférol...), les anthocyanes et les chalcones. Ils peuvent être phago-répulsifs (comme la catéchine) ou toxiques (comme la roténone) pour les insectes. La rutine est le flavonol le plus largement distribué chez les plantes et elle est considérée comme un phago-répulsif pour de nombreux insectes phytophages. Comme le criquet ; *Schistocerca americana* (Orthoptera, Acrididae), et la cochenille *Phenacoccus manihoti* (hemiptera, Pseudococcidae). Les anthocyanes constituent les pigments naturels des fleurs, des fruits et des feuilles (**Hernández et al., 2009**).

Ils sont souvent localisés dans la vacuole des cellules et sont responsables de la couleur de la plupart des fleurs et des fruits, agissant comme attractifs pollinisateurs (Pélagonidines, cyanidines, delphinidines), protégeant les plantes contre le rayonnement UV-B (kaempférol) ou agissant comme attractifs pour l'alimentation des insectes (isoquercétine) ou antiappétants (proanthocyanidines). En outre, certains d'entre eux (apigénine et lutéoline) participent en tant que molécules de signal dans l'association légumineuse Rhizobium. Beaucoup de flavonoïdes sont synthétisés par le stimulus du stress comme la blessure, la sécheresse et l'exposition aux métaux et la famine. Les flavonoïdes, en particulier les flavonols et les flavan-3-ols, ont été suggérés pour protéger les plantes contre le stress oxydatif agissant comme antioxydants. (**Calatayud et al., 2013**).

Chapitre II : métabolisme secondaire des végétaux

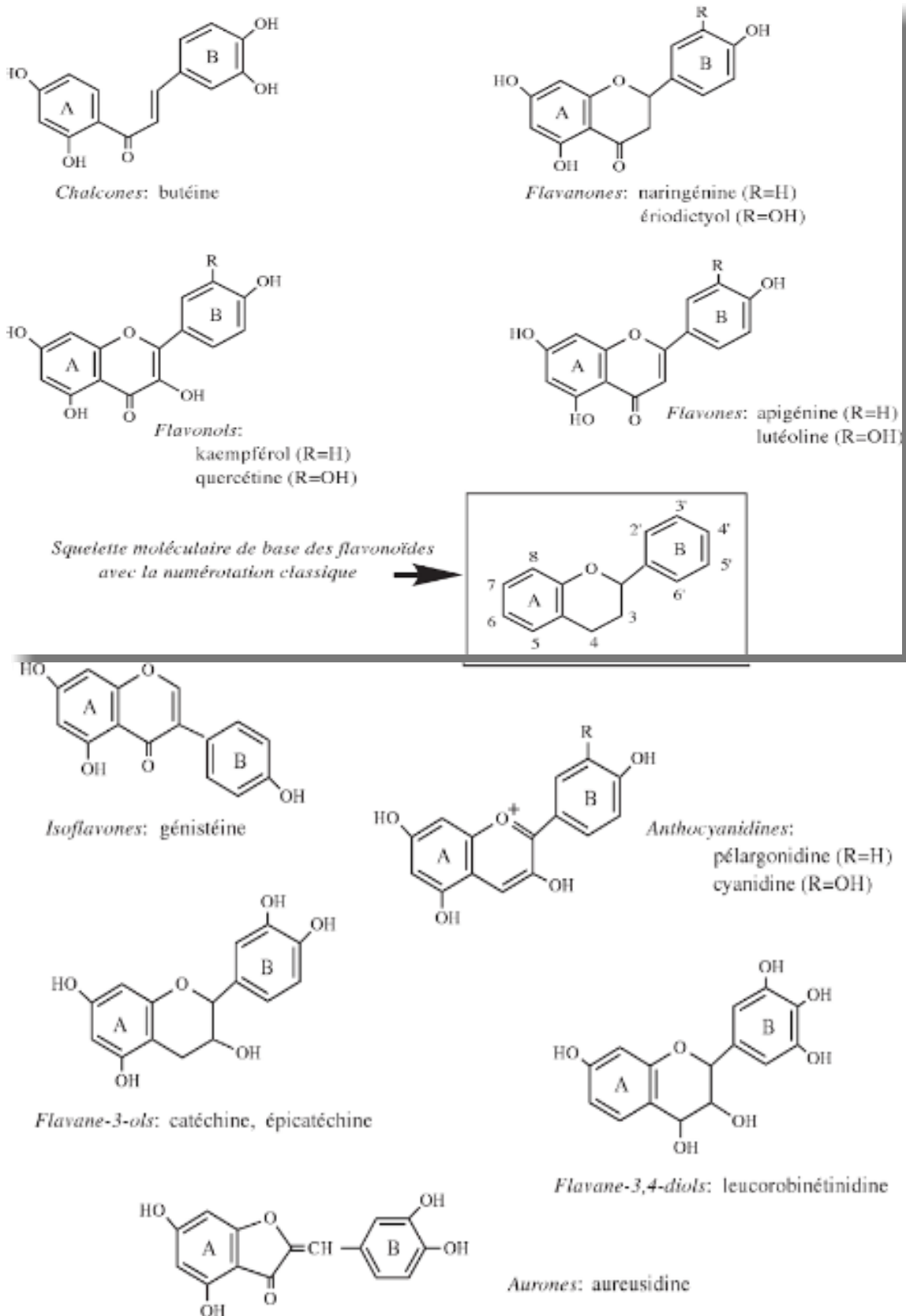
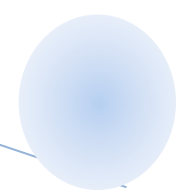


Figure N°10: les principales classes de flavonoïdes. (Macheix *et al.*, 2005)



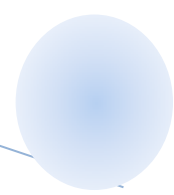
Les tanins :

Les tanins sont des oligomères solubles dans l'eau riche en groupes phénoliques, capable de lier ou de précipiter des protéines hydrosolubles ils sont communs aux plantes vasculaires, existent principalement dans les tissus ligneux, mais peuvent également être trouvés dans les feuilles, les fleurs ou les graines. Les tissus végétaux riches en tanins ont un goût très amer et sont évités par la plupart des mangeurs. Les tanins peuvent être divisés en deux groupes: les tanins condensés ou les tanins hydrolysables. Les tanins condensés sont formés biosynthétiquement par la condensation de flavanols pour former des Réseaux polymères. Les tanins hydrolysables sont des esters d'un sucre, généralement du glucose, avec un ou plusieurs acides trihydroxybenzène-carboxyliques (acide gallique). Ces substances donnent des précipités insolubles avec l'albumine, l'amidon ou la gélatine. Cette réaction avec les protéines est utilisée industriellement pour transformer les peaux d'animaux en cuir (bronzage). Inclure corilagin isolé des feuilles de sumac (*Rhus spp.*) et d'eucalyptus (*Eucalyptus spp.*) et géraniine du géranium (*Geranium spp.*) et (*Phyllanthus spp.*). La corilagine et la géraniine présentent toutes deux une activité antivirale de l'immunodéficience humaine (VIH) en inhibant la transcriptase inverse (**Brieimannet al .,2016**).

II.3. Activités biologique des polyphénols :

L'augmentation rapide des maladies dégénératives dans le monde menace le développement économique et social ainsi que la vie et la santé de millions de personnes. On estime que jusqu'à 80% des maladies cardiovasculaires, 90% des diabètes de type II et un tiers des cancers peuvent être évités en changeant le mode de vie (**Jaganathi et Crozier, 2009**).

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les composés phytochimiques, principalement les polyphénols pourraient prévenir des pathologies graves. En effet, ces composés peuvent interagir avec un grand nombre de systèmes physiologiques. Ils sont associés aux effets préventifs d'un grand nombre de pathologies comme les maladies cardiovasculaire et maladies inflammatoires. Leur rôle dans la prévention du cancer a également été mis en évidence. Ces différentes Manifestations biologiques impliquent des propriétés très variées impliquant la propriété antioxydante, antimicrobienne (**Stangl et al ., 2007**).



II.3.1. Activité antioxydante :

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et de métabolites réactifs, appelés oxydants ou espèces réactives d'oxygène (ROS), et leur élimination par des mécanismes protecteurs, appelés antioxydants. Ce déséquilibre conduit à endommager des biomolécules et des cellules importantes, avec un impact potentiel sur l'organisme entier. Le stress oxydatif peut endommager les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN des cellules et des tissus, entraînant des dommages membranaires, une fragmentation ou une réticulation aléatoire des molécules comme l'ADN, les enzymes et les protéines structurales. Ces conséquences du stress oxydatif construisent la base moléculaire dans le développement des maladies cardiovasculaires, du cancer, des maladies neuro-dégénératives, du diabète et des maladies auto-immunes (**Ratnam *et al.*, 2006**).

Il a été proposé que les polyphénols puissent agir comme antioxydants par un certain nombre de mécanismes potentiels. Le piégeage des radicaux libres, dans lequel les polyphénols peuvent rompre la réaction en chaîne des radicaux libres, ainsi que la suppression de la formation des radicaux libres par régulation de l'activité enzymatique ou des ions métalliques chélatants, impliquées dans la production de radicaux libres, sont les mécanismes les plus importants de l'activité antioxydante. L'interaction entre les composés polyphénoliques et d'autres antioxydants physiologiques est une autre voie antioxydante possible pour ces composés (**Fraga *et al.*, 2010**).

II.3.2. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne apparaît plus élevée contre les bactéries Gram-positives que contre les bactéries Gram-négatives. La faible sensibilité de ce dernier groupe de micro-organismes peut s'expliquer, dans une certaine mesure, par la présence de lipopolysaccharides chargés négativement. Bien que la barrière de diffusion étroite de la membrane externe pourrait aussi contribuer à une résistance plus élevée (**Kolodziej *et al.*, 2012**).

Helicobacter pylori, un *spirillum* Gram négatif pouvant causer une gastrite chronique, un ulcère gastrique, un ulcère duodéal et également un cancer de l'estomac, a été inhibé par la tellimagrandine I et la corilagine à une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 6,25 µg/ml. L'effet du β-lactame contre la multirésistance de *Staphylococcus aureus*, résistant à la méthicilline (MRSA), a été rétabli par la corilagine et la tellimagranine I, ainsi que par plusieurs autres polyphénols. On a observé de puissants effets contre les leishmanies, un

groupe de maladies à morbidité et mortalité étendues dans les pays en développement, en utilisant plusieurs déhydroellagitannines, l'ellagitannine hippophaénine A et plusieurs gallotannines, tandis que l'effet des proanthocyanidines était généralement moins prononcé. Des différences ont été trouvées entre les promastigotes de *Leishmania* et les *L. amastigotes* dans l'activité anti-leishmanienne de chaque polyphénols. Ces différences intrigantes peuvent être indicatives d'une activation de la fonction de macrophage leishmanicide, ce qui a conduit les chercheurs à compter sur plusieurs essais biologiques fonctionnels, y compris un test biochimique pour l'oxyde nitrique (NO), un test de lyse des fibroblastes pour la libération du facteur de nécrose tumorale (TNF- α), et un test d'inhibition de l'effet cytopathique pour les interférons (IFN), pour effectuer en profondeur enquêtes sur l'activité des tanins sur les leishmanies (Quideau, 2009).

II.3.3. Activité antifongique :

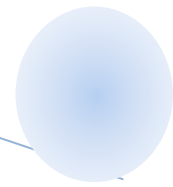
L'activité antifongique du produit d'oxydation du catéchol est très supérieure à celle du catéchol lui-même. "A savoir, l'addition d'agents réducteurs tels que l'acide ascorbique réduit l'activité antifongique du catéchol. Ceci est dû à la réduction immédiate du produit oxydé du catéchol, O-quinone, dans le catéchol d'origine. La présence d'une concentration appropriée d'inhibiteur de polyphénoloxydase (di-éthylthiocarbamate), réduit également l'activité antifongique du catéchol contre *Cochlit'obolus miyabeanus* qui a une polyphénoloxydase très active. Ceci est certainement dû à la suppression de la formation du produit oxydé du catéchol. Tous ces résultats montrent que le produit oxydé a une activité anti-fongique plus forte que le catéchol (Oku, 1993).

Ils ont étudié l'effet des tanins sur un grand nombre de Saprophytes appartenant à plusieurs genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Fusarium*...etc. Les propriétés antifongiques des tanins sont connues depuis les premières observations de Knudson. La plupart d'entre eux pourraient bien exister en présence de tanins à 0,25 % en solution, mais peu d'entre eux, à l'exception du *Penicillium* et de l'*Aspergillus*, pourraient supporter jusqu'à 2% de tanin. Les espèces de ces deux genres peuvent également utiliser le tanin (hydrolysable) comme source de carbone pour la croissance. Ainsi, *Aspergillus niger*, lorsqu'il est cultivé sur de l'acide tannique, produit initialement l'enzyme adaptative (la tannase), une estérase, qui libère l'acide gallique du substrat (Haslam, 1989).



Chapitre III :

Les plans d'expériences



Généralité

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on cherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt « y » et des variables « x_i ». Le plan d'expériences (ou plan d'apprentissage) est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou normée, l'ensemble des n expériences à réaliser. Il est représenté par une matrice X $x = (1, \dots, d)$ constituée de n lignes (correspondant aux n expériences) et d colonnes (correspondant aux d facteurs) (Franco, 2008).

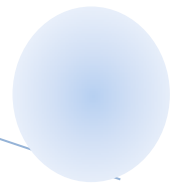
A l'époque actuelle, bon nombre de procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de facteurs difficiles à régler intuitivement. Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans aucune méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses (modèle impossible à ajuster, résultats incohérents, ...etc.), soit à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la **méthode des plans d'expérience** est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche. (Tinsson, 2010). L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise :

"obtenir un maximum d'information
en un minimum d'expériences"

Une autre vision du problème est la recherche de variations simultanées pour toutes les facteurs contrôlés afin, une nouvelle fois, d'extraire un maximum d'information en un minimum d'essais (Tinsson, 2010).

III.1. Objectifs des plans d'expériences :

Dès le départ il est très utile de distinguer les divers types d'objectifs qui sont en général visés par ces techniques et qui peuvent impliquer différentes familles de plans

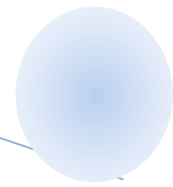


a. Dégrossir un problème :

On se trouve souvent dans une situation où l'on a des connaissances très insuffisantes ; en particulier on ne sait pas si certains facteurs ont une influence ou pas, et on ne peut pas prendre le risque de les ignorer. En général les effets des facteurs sont difficilement modélisables par des lois scientifiques connues. On définit alors des modèles empiriques dans lesquels peuvent intervenir à la fois des variables qualitatives (nature d'un ingrédient, position d'un réglage, type de procédé... etc.) et des variables quantitatives que l'on tente de représenter par des polynômes de degré 1. Comme on ne recherche qu'un modèle grossier mais économique, on néglige la plupart des interactions entre les divers facteurs. L'utilisation de plans d'expériences factoriels fractionnaires à 2 niveaux, dont le nombre de traitements est 2^k qui est peu supérieur au nombre de paramètres à déterminer ce qui permet des économies considérables par rapport à l'utilisation de plans factoriels complets (où l'on combine toutes les variantes de tous les facteurs entre elles, sous réserve que cela soit possible). Souvent le coût se trouve divisé par plus de 10, ou beaucoup plus mais ces plans comportent alors d'avantage de risques car ils ne permettent de déterminer aucune interaction et se prêtent mal à une réalisation séquentielle de l'expérimentation. (Linder, 2005).

b. Recherche d'un optimum :

Dans un processus complexe, comportant souvent un nombre élevé de facteurs (réglage d'une installation industrielle, la recherche de rendement optimal d'une réaction chimique...etc). L'optimum peut porter sur la valeur moyenne de la réponse et sa dispersion, sur la sensibilité à des facteurs parasites (robustesse d'un procédé), ou sur une fonction plus globale qui est souvent une fonction coût. La démarche utilisée est en générale séquentielle, car on ne sait pas où se situe l'optimum on a intérêt à procéder par petits plans successifs en réutilisant une partie des résultats déjà obtenus. Là encore, les plans fractionnaires à 2 niveaux sont très utilisés. Lorsqu'on se trouve au voisinage de l'optimum on raffine le procédé : on diminue le pas, ou (et) on multiplie le nombre de niveaux. On peut ainsi utiliser un plan adapté à un modèle de degré 2 (la méthode de surface de réponses par exemple) pour préciser le minimum, d'un maximum, ou encore d'un point seuil (un « col »). (Linder, 2005).



c. Modélisation d'un système :

On peut se trouver principalement dans deux types de situations, si les modèles reposent sur des bases théoriques il s'agit généralement de trouver un modèle de régression non

linéaire, si l'on n'a pas d'indication théorique suffisante pour postuler un modèle, alors on utilise un modèle de régression multilinéaire empirique ; le terme « régression multilinéaire » signifie que les coefficients inconnus de modèle interviennent linéairement, et non pas que le modèle est linéaire par rapport au variable (facteurs). Ce modèle est l'analogue d'un développement en série de Taylor d'une fonction dérivable. (Linder, 2005).

L'économie apportée par les plans d'expériences est alors plus faible que celle permise par des plans exploratoires ou par des plans basés sur des modèles théoriques connus, mais elle peut rester importante. La méthodologie des plans d'expériences permet généralement de mieux poser le problème grâce à une démarche rationnelle et coopérative, et ainsi d'améliorer la qualité du modèle : son pouvoir prévisionnel. Le résultat sera d'autant meilleur et le plan sera d'autant plus efficace que l'on aura mieux utilisé les connaissances préliminaires, bien analysé les phénomènes, utilisé des relations analytiques basées sur des connaissances scientifiques (Linder, 2005).

III.2. Le plan de surface de réponse :

Ces plans utilisent des modèles polynomiaux du second degré. Nous étudions les plus importants plans de ce type : les plans composites, les plans de **Box-Behnken** et les plans de **Doehlert**, Les plans hybrides, Les plans de **D-optimaux**. Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans pour surfaces de réponse est un modèle du second degré avec interactions d'ordre 2 :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

III.3. plans composites :

Les plans composites se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet ou fractionnaire complété par des points au centre pour vérifier la validité du modèle PDAI (termes du premier degré et termes d'interactions). Si les tests de validation sont positifs (la réponse mesurée au centre du domaine est statistiquement égale à la réponse calculée au même point), l'étude s'achève le

plus souvent, mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré.

Les essais supplémentaires sont représentés par des points d'expériences situés sur les axes de coordonnées et par de nouveaux points centraux. Les points situés sur les axes de coordonnées sont appelés les *points en étoile*. Les plans composites présentent donc trois parties (Figure 10). (Goupy et Creighton, 2006).

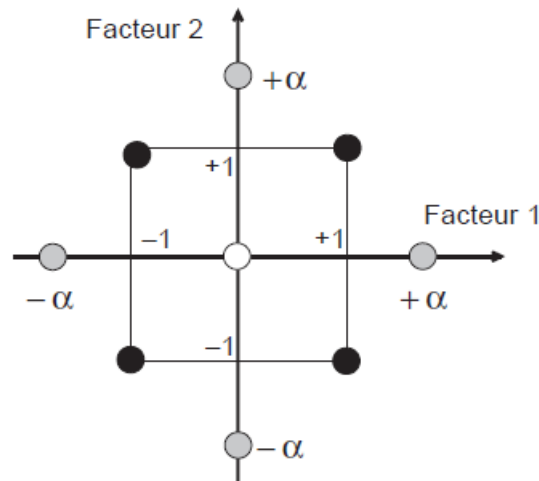


Figure N°11 : Plan composite pour l'étude de deux facteurs. Les points factoriels sont en noirs, Les points en étoile sont en gris clair, les points centraux sont en blanc.

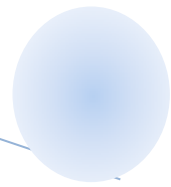
a. Le plan factoriel : c'est un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux par facteurs. Les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude.

Le plan en étoile : les points du plan en étoile sont sur les axes et ils sont, en général, tous situés à la même distance du centre du domaine d'étude.

b. Les points au centre du domaine d'étude: On prévoit toujours des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude, et cela aussi bien pour les plans factoriels que pour les plans en étoile. (Goupy et Creighton, 2006).

Le nombre total n d'essais à réaliser est la somme des essais du plan factoriel (nf), des essais du plan en étoile (na) et des essais au centre ($n0$). Le nombre n des essais d'un plan composite est donné par la relation : $n = nf + na + n0$.

Le nombre de niveaux est 5 pour chacun des facteurs et seulement 3 lorsque l'on a un plan composite à faces centrées (Goupy et Creighton, 2006).



III.4. plans de Box-Behnken :

Box et Behnken ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1 , 0 et $+1$. Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des k premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués. Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. Pour quatre facteurs ce plan est construit sur un hypercube à quatre dimensions. On place les points expérimentaux non pas aux sommets du cube ou de l'hypercube, mais au milieu des arêtes ou au centre des faces (carrés) ou au centre des cubes. Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère ou sur une hypersphère suivant le nombre de dimensions. On ajoute des points au centre du domaine d'étude. Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est illustré par la figure 9.2. Le cube possède 12 arêtes. On a l'habitude d'ajouter des points d'expériences au centre du domaine d'étude, en général trois. Le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs possède donc $12 + 3$ essais, soit 15 essais. On pourra remarquer qu'avec 4 points au centre au lieu de 3, on obtient un plan qui répond au critère de presque-orthogonalité (Goupy et Creighton ,2006).

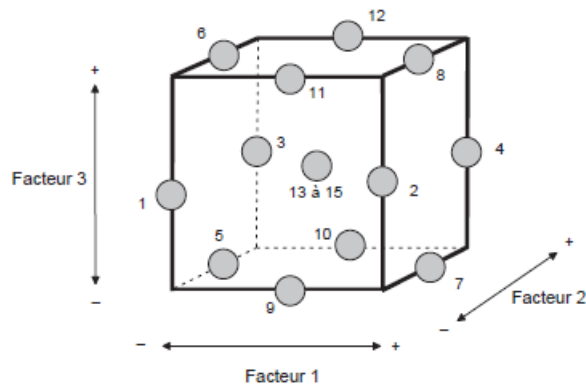


Figure N°12: Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs.

Il y a douze points d'expériences au milieu des arêtes du cube et trois points au centre.

Matériels et méthodes



I. Matériel:

I.1. Matériel végétal

Des fleurs fraîches de *P. lentiscus* ont été récoltées de la région **Hammam Essalihine** (Aquaes Flavianaes à l'époque romaine, Fontaine-Chaude à l'époque coloniale) situé dans la commune **d'El Hamma**, au mois D'Avril 2018 au stade pleine floraison. Elles sont d'une couleur plus ou moins marron groupées en racèmes en grappe de fleur apétales.



Figure N°13 : Arbre de *Pistacia lentiscus*

figure N°14: Les Fleurs de *P. lentiscus*

Les fleurs sont lavées et séchées à l'étuve à 60°C pendant 24h. Après séchage les fleurs sont récupérées de l'étuve et broyées en poudre à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisées et mises dans des sachets bien fermés et étiquetés, et conservés dans un verre hermétique à -20 °C jusqu'à l'analyse.

I.2. Produits chimiques utilisés

➤ Solutions :

- Eau physiologique.
- Méthanol.
- Ethanol.
- L'eau distillée.
- Nitrate de sodium NaNO₃ (5% préparé dans l'eau distillée).
- Hydroxyde de sodium NaOH (1M Préparée).
- Chlorure d'aluminium AlCl₃.

I.3. Souches microbiennes:

Les groupes différentes de microorganismes : bactéries, champignons, moisissures retenus pour cette étude sont représentés dans le (**tableau N°03**) ;Ils sont conservées à 4°C dans des boite pétri contenant le milieu solide Gélose Nutritive jusqu'à l'utilisation.

Tableau N°03: les souches de micro-organismes utilisées et leurs origines.

Souche	Code	Groupe
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Gram +
<i>Bacillus Cereus</i>	ATCC 11778	Gram +
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	Gram +
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Gram -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27893	Gram -
<i>Botrytis cinerea</i>	BC1	-----
<i>Aspergillus niger</i>	Isolé localement	-----
<i>Cladosporium sp</i>	Isolé localement	-----

II. Méthodes

II.1.Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques

II.1.1. Extraction :

une prise d'essai de 1g de poudre est mise à macérer dans un volume de méthanol avec différentes concentration de (70% ,60%,85%,100%) puis placer dans bain marie (30 ,75,120 min) à température varié (30,50,70 C°) selon 27 expériences. L'extrait a ensuite été centrifugé, après filtré sur un papier filtre N°1 et conservé dans le réfrigérateur -20 C°, à l'abri de la lumière.

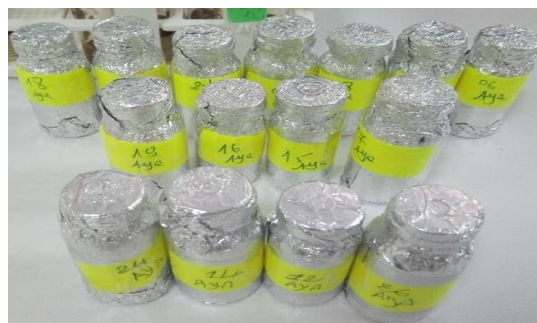


Figure N°15: Récupération des 27 extraits et conservation a -20c°.

II.1.2. Dosage des Flavonoïdes :

La méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium a été utilisée pour mesurer la teneur en flavonoïdes des extraits de *Pistacia. lentiscus*. Il a été étudié selon la méthode de (Nguyen et Eun ,2011) avec des modifications mineures. 50 μ .L D'extrait+ 950 μ .L H₂O après ajouter 50 μ .L Nitrate de soude après 5 min on ajoute 100 μ .L de Al Cl₃ après 6 min on ajoute **500 μ .L NaOH +1ml H₂O** . L'absorbance est mesurée à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

III. Evaluation de l'activité antibactérienne :

III.1.Revivification des souches

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24heures. Puis chaque souche a été repiquée en stries sur la surface des boîtes de pétries pré-coulés en gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées après incubation de 24 heures à 37 °C qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

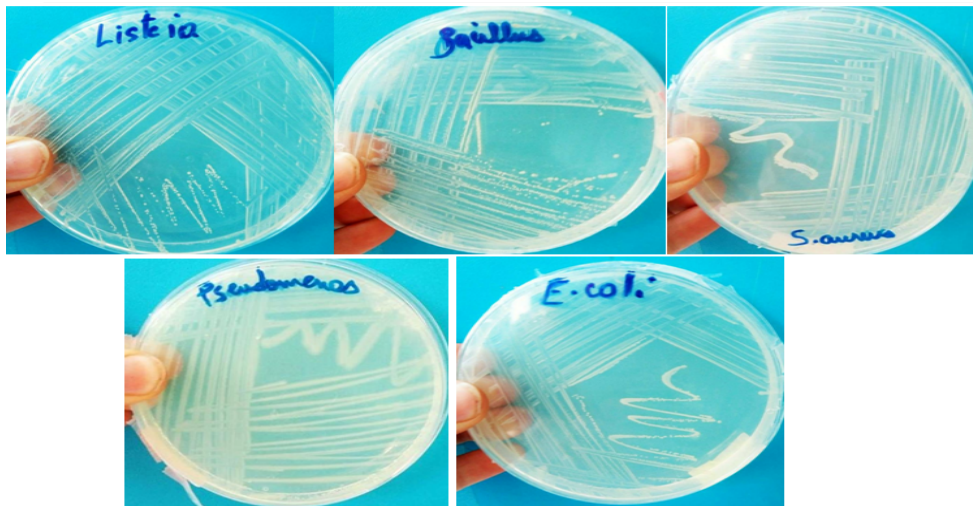
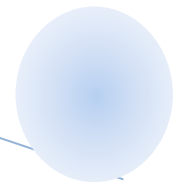


Figure N°16: Repiquage des souches bactériennes bactéries.



III.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir de colonies viables fraîchement identifiées dans un tube à essai stérile contenant de 10ml d'eau physiologique stérile. La turbidité est ajustée à l'aide d'un vortex et comparé à 0.5 Mac Farland.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés selon la méthode de diffusion en milieu solide sur milieu gélosé de Mueller-Hinton Agar (**Kirby-Bauer et al., 1966 in Maloueki et al., 2013**). Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre ont été utilisés. Ils ont été préalablement imprégnés avec 20 μ l des extraits de plantes, ils ont été déposés ensuite à la surface d'un milieu solideensemencé avec une suspension bactérienne (à l'aide d'un écouvillon stérile L'opération doit se faire en tournant la boîte de pétri d'un angle de 90° à chaque fois, les stries doivent être serrés) les boîte de 60 mm de diamètre sont incubées à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 h. Après incubation, on mesure les diamètres des éventuelles zones d'inhibition observées autour des disques. Les diamètres D des halos d'inhibition formés autour des disques traduisant l'activité antibactérienne sont mesurés à l'aide de **logiciel (imagej)**

La lecture :

Selon les diamètres observés, les bactéries ont été classées en non sensibles ($D \leq 8$ mm), moyennement sensibles ($9 < D \leq 14$ mm), sensibles ($15 < D \leq 19$ mm) et très sensibles ($D > 20$ mm)(Ponce et al. 2003). Le témoin négatif correspond à un disque imprégné d'eau distillée et le témoin positif est la gentamicine (10 mg/disque).

IV. Activité antifongique :

Sur une boîteensemencée par la souche à tester, et qui a été incubée à 37°C pendant 5 jours. 10 ml de l'eau distillée contenant de Tween 20 sont mis sur la surface de la boîte. La colonie fongique est rincée soigneusement par la solution de Tween 20, en faisant des mouvements circulaire de la boîte de Pétri afin d'obtenir le nombre maximal de spores.

La suspension sporale est ensuite récupérée stérilement dans un tube à essai stérile.L'inoculum est standardisé à une concentration de $1-2.10^5$ spore /ml par un comptage enutilisant la cellule de Mallassez, les spores ont été observés sous un microscope optique àgrossissement (**x40**). (**Meghazi., 2012**).

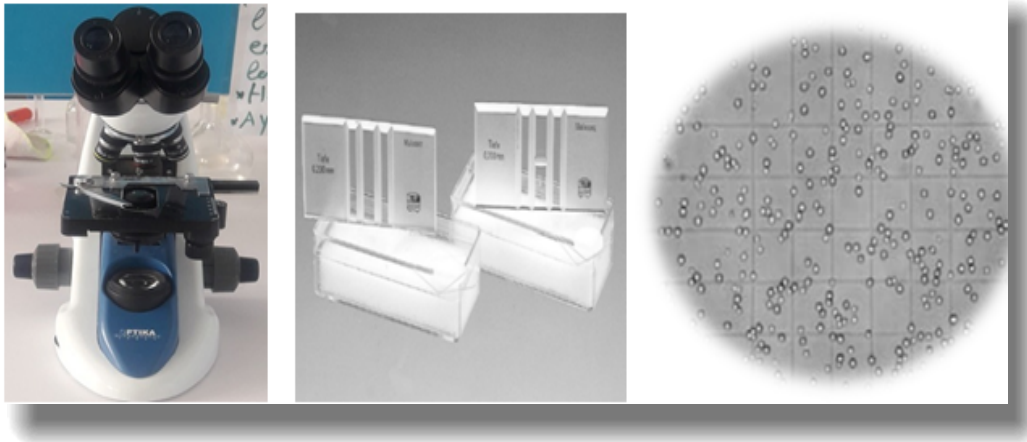


Figure N°17: Standardisation d'inoculum par comptage en utilisant la cellule Mallassez.

L'ensemencement, le dépôt des disques, l'incubation et la lecture des résultats, se fait par les mêmes techniques utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne.

V. Analyse statistique des données

Les paramètres d'extraction ont été optimisés en utilisant la méthodologie de surface de réponse (RSM) dont 4 variables de conception : le ratio solide/ liquide (X1), la température d'incubation (X2), le temps (X3) et pourcentage de solvant(X4) sont appliqué à trois niveaux (-1 ,0 et +1) (**tableaux N°04**).La procédure de régression de surface de réponse (RSREG)des logiciels d'analyse statistique (SAS) et de conception (version 7.0.5) ont été utilisés pour analyser les données expérimentales un modèle mathématique polynomial **Box-Behnken Goupy, (2006)**

Les variables	-1	0	+1
X₁ Température (c°)	30	50	70
X₂ Time (min)	30	75	120
X₃ s/l ratio	0.1	0.15	0.20
X₄ Solvant %	60	80	100

Tableau N°04 : Niveaux des variables choisies pour les essais.

Le plan de Box-Behnken comprend 27 essais dont l'essai centré (0, 0, 0, 0) est répété trois fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction. Les données expérimentales ont été ajustées à un modèle polynomial de second ordre et les coefficients de régression obtenus. Le modèle polynomial de second ordre généralisé utilisé dans l'analyse de surface de réponse était le suivant:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

Où a_0, a_i, a_{ii} et a_{ij} sont les coefficients de régression pour termes d'interception, linéaires, quadratiques et d'interaction, respectivement, et X_i et X_j sont les variables indépendantes.



Résultats et Discussion

Introduction

L'optimisation par plans d'expérience est moins coûteuse et consomme moins de temps par rapport aux méthodes classiques car plusieurs paramètres sont testés simultanément avec un nombre d'expériences minimale d'une manière à trouver les interactions entre les variables (**Montgomery, 2001**). Ils offrent une grande quantité d'information à partir d'un nombre réduit d'essais (**Bas et Boyaci, 2007**). Les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes du *Pistacia lentiscus* dépendaient du pourcentage de solvant, de la température d'extraction, l'évolution du temps d'extraction et le rapport solide/liquide.

À l'aide des équations prédictives de RSM l'activité antibactérienne et antifongique totale a été déterminée après extraction des flavonoïdes dans des conditions optimales. Les valeurs expérimentales et prédites ont été comparées afin de déterminer la validité du modèle. Les conditions d'extraction optimales ont été estimées par analyse de régression et tracés de surface de réponse tridimensionnelle (3D) des variables indépendantes et de chaque variable dépendante

I. la teneur des Flavonoïdes totaux :

I.1. Analyse statistique :

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits (exprimés en mg EQ/g MS) des fleurs de *Pistacia Lentiscus* obtenues à partir des 27 expériences sont répertoriées dans le (**tableau A Annex1**). Les données expérimentales ont été utilisées pour calculer les coefficients de l'équation polynomiale du second ordre, et le (**Tableau A Annexe II**) résume les coefficients de régression obtenus. L'analyse de la variance des teneurs en flavonoïdes totaux a montré une différence très hautement significative ($p > 0,0001$) (**Tableau N°5**) et a également montré qu'il y avait un manque d'ajustement non significatif du modèle, ce qui prouve que le modèle polynomial du second ordre représentait adéquatement les données expérimentales. Le coefficient de déterminations multiples (R^2) pour les réponses des teneurs en flavonoïdes totaux étant de 0,97. Cela signifie que le modèle calculé a pu expliquer 97 % des résultats dans le cas des flavonoïdes totaux.

discussions et Résultats

Tableau N°5 : Analyse de la variance des TF et défaut d'ajustement

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	798867,49	57062,0	27,0547	<,0001***
Résidus	12	25309,64	2109,1	.	.
Défaut d'ajustement	10	24941,536	2494,15	13,5513	0,0706
Erreur pure	2	368,105	184,05	.	.
Total	26	824177,14	.	.	.

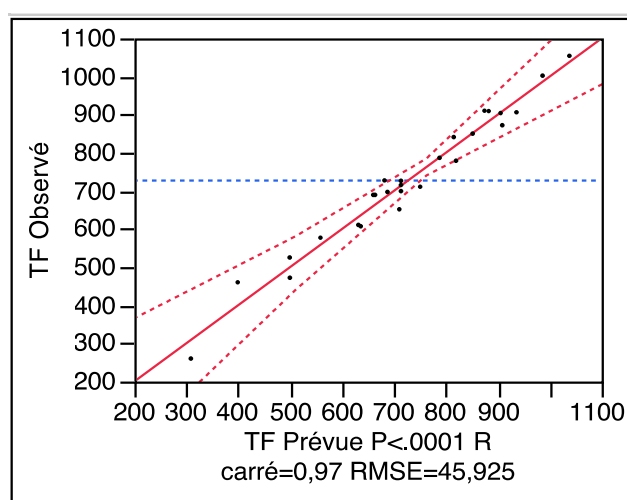


Figure N°18: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévus du TF

En outre, La valeur R^2 ajustée a été obtenue à partir de R^2 après l'élimination des termes modèles inutiles. Dans cette étude, la valeur R^2 ajustée était également très élevée (0,99) très proches des valeurs R^2 ce qui indique une grande importance de modèle. La fiabilité des modèles a également été renforcée par l'absence de tout manque d'ajustement ($p > 0,05$) Les résultats expérimentaux étaient précis et fiables.

La teneur en flavonoïdes totaux moyenne des 27 combinaisons choisies des variables indépendantes, vari de 260 à 1054 ug EQ/gMs (**Tableau Annexe I**). Les résultats montrent que la teneur en flavonoïdes est maximale lorsque la concentration du méthanol est de 100% (**figure.. a**). une augmentation de la teneur ont flavonoïde a été observée lorsque la température d'extraction est passé de 30 à 50 C° (**figure...b**) suivi d'une diminution significative après 50 C°, et pour tous les autres Facteurs restées (**figure c, d respectivement**), le TF étaient statistiquement différents avec une tendance

discussions et Résultats

décroissante par rapport au ratio et le temps. Ceci explique l'influence des paramètres étudiés sur le taux d'extraction des flavonoïdes



Figure 19: Histogramme de la teneur des flavonoïdes selon différents facteurs

La signification de chaque coefficient, qui à son tour pourrait indiquer les modèles d'interaction entre les variables, a été vérifiée par les valeurs P, plus la valeur P est petite, plus le coefficient correspondant est important. On peut observer à partir du **(Tableau Annexe II)** que les termes linéaires du temps d'extraction de ratio s/l, du solvant et les termes quadratique de sol ainsi que les interactions température -s/l et température-solvant étaient significatifs ($p < 0,05$) Après le retrait des facteurs non significatifs, la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation :

$$YTF = 713.43 - 53 X_2 + 228.91 X_3 + 40.14 X_4 + 61.30 X_4^2 + 109.75 X_2 * X_3 + 60.22 X_1 * X_4$$

Il existe très peu de travaux portant sur les flavonoïdes des fleurs du genre *Pistacia lentiscus*. Mais Si on compare nos résultats avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en flavonoïdes est nettement inférieure à celle trouvée par l'étude effectuée qui rapporte une teneur qui se lève à 30.52 ± 1.10 mg/ml en flavonoïdes, de même que

Atmani et al.(2009) qui concluent que *Pistacia lentiscus* est riche en tanins et pauvre en flavonoïdes (12.93 ± 1.69 mg Eq Quercetin/g d'extrait éthanolique), de même que **Vaya et Mahmood (2006)** qui ont obtenue dans l'extrait éthanolique des feuille une teneur de 504 mg/kg extrait. On peut conclure que les variations de teneur en flavonoïdes sont régies par la composition chimique des extraits, qui est déterminée par le type d'organe utilisé.

L'extraction des composés phénoliques du matériel végétal est influencée par leur structure chimique, la méthode d'extraction, la taille des particules formant l'échantillon, le temps et les conditions de stockage ainsi que la présence d'interférents (**Naczk et Shahidi, 2004**). Le solvant est l'un des paramètres pouvant affecter l'extraction des polyphénols (**Trosznska et al., 2002**). L'extraction peut être effectuée par plusieurs solvants tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. En outre, les solvants aqueux donnent le meilleur. les rendements d'extraction par rapport aux solvants absolus (**Spigno et al., 2007**).

I.2. Analyse des surfaces de réponse :

Les surfaces de réponse 3D sont utilisées pour prédire visuellement les réponses futures et pour déterminer les valeurs de facteur qui optimisent la fonction de réponse. La meilleure façon d'exprimer l'effet de n'importe qu'elle variable indépendante sur l'extraction de flavonoïde est de générer des surfaces de réponse du modèle, en faisant varier deux variables dans la gamme expérimentale étudiée et en maintenant les deux autre variables à leur valeurs centrales (Niveau 0).

I.2.1. Effet de la température et le ratio sur l'extraction des flavonoïdes :

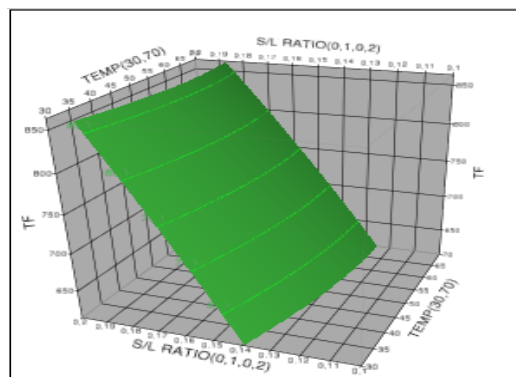


Figure N°20: Diagramme de surface de réponse d'Effet de la température et le ratio sur l'extraction des flavonoïdes

Le rendement des TF augmente avec la diminution de ratio de 1/14-1/20 et une légère corrélation négative de température, donc il a été observé que l'effet de la température n'avait aucune influence sur la teneur en flavonoïdes par contre celui de ratio qui a une grande influence. La teneur maximale TF pourra être obtenue avec une température et un ratio d'extraction de 70°C et de 1/20 min respectivement.

I.2.2. Effet de la température et concentration solvant sur l'extraction de flavonoïdes :

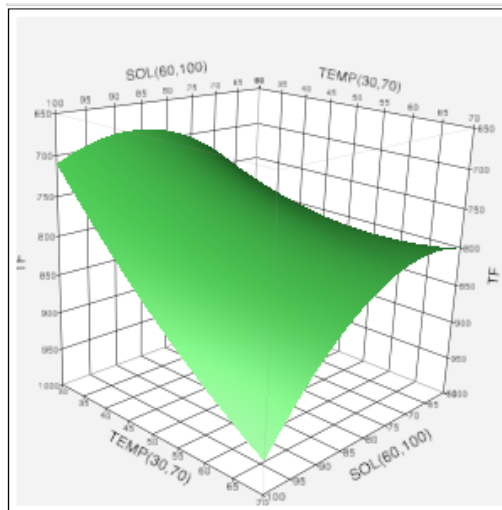


Figure N°21: Diagramme de surface de réponse Effet de la température et concentration solvant sur l'extraction de flavonoïdes

Le rendement des TF augmente avec l'augmentation de % de solvant 80 à 100% avec une légère corrélation négative de température. Donc, l'effet de % de solvant avait une influence importante sur le rendement ainsi que la température. Sous ces conditions, la teneur maximale TF pourra être obtenue avec une température et un % de solvant d'extraction de 30°C et de 87% respectivement.

I.2.3. Effet du temps et le ratio sur l'extraction de flavonoïdes :

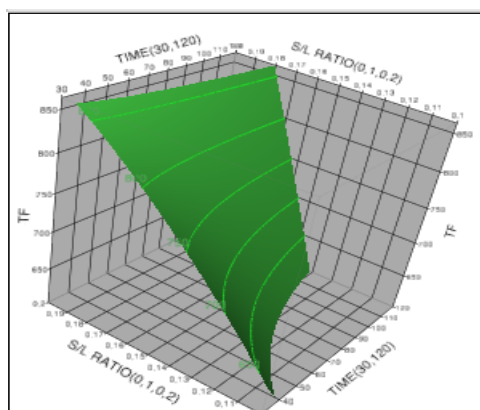


Figure N°22: Diagramme de surface de réponse Effet du temps et le ratio sur l'extraction de flavonoïdes

Le rendement des TF augmente avec diminution de ratio de 1/10 à 1/20 avec augmentation de temps de 40 à 120 min. Donc l'effet de ratio et du temps avait une influence importante sur la teneur TF. La teneur maximale TF pourra être obtenue avec un ratio et un temps d'extraction de 1/20 et 120min et min respectivement.

L'écart trouvé entre les résultats obtenus et les données des différents auteurs sont tout à fait justifiés. En effet Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par extraction avec des solvants organiques (**Vermerris et Nicholson, 2006**). les conditions d'extraction ainsi que les origines des échantillons et la saison de collecte régissent ces variations (**Ranalli et al., 2006**). Les différences peuvent aussi être attribuées à l'origine géographique ou aux facteurs climatiques.

II. Activité antimicrobienne :

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *Pistacia lentiscus* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton pour les bactéries et les champignons

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de huit germes pathogènes qui sont : *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.cereus* et *L.monocytogénese*, *A.niger*, *Cladosporium* et *B.cineria*. Selon 27 expériences les résultats sont répertoriés dans le **Tableau A(Annex1)**. Les résultats ont montré des sensibilités différentes aux extraits

II.1. Analyse statistique :

Les données expérimentales ont été utilisées pour calculer les coefficients de l'équation polynomiale du second ordre, et le (Tableaux Annexe II) résume les coefficients de régression obtenus. L'analyse de la variance d'activités antibactérienne et anti-fongique des (*B.cereus* , *S.aureus*, *L.monocytogenese* , *A.niger* et *Cladosporium*) a montré une différence très hautement significative ($p < 0,05$) pour *S.aureus* et *A.niger* ($p=0.0003$), **Tableau N°6**, ce qui prouve que le modèle polynomial du second ordre représentait adéquatement les données expérimentales. Le coefficient de déterminations multiples (R^2) de (*B.cereus* , *S.aureus*, *L.monocytogenese* , *A.niger* et *Cladosporium*) étant de (0,82 , 0,91 , 0,82 , 0,91 et 0,82) respectivement .Cela signifie que le modèle calculé pour *B.cereus* , *L.monocytogenese* et *Cladosporium* a pu expliquer 82% des résultats dans le cas des activités, et Les coefficient de déterminations multiples (R^2) de *S.aureus* et *Aspergillus* a pu expliquer 91% des résultats dans le cas des activités ainsi que les autres souches (*E-coli* , *P.aerogenosa* et *B.cereus*) le test d'Anova n'a révélé aucune différence significative donc ce model ne peut être appliquer sur ces souches . En outre, la valeur de R^2 ajusté pour les souches *B.circuse* , *S.aureus* , *L.monocytogenese* , *A.niger* et *Cladosporium* (0,99,098,0,98,097,0,99,0,98,0,99 et 0,94) « tableau2 » était également très élevée, ce qui indique une grande importance de modèle. La valeur R^2 ajustée a été obtenue à partir de R^2 après l'élimination des termes modèles inutiles. Dans cette étude, la valeur R^2 ajustée était très proches des valeurs R^2 . La fiabilité des modèles a également été renforcée par l'absence de tout manque d'ajustement ($p > 0,05$) Les résultats expérimentaux étaient précis et fiables

Tableau N°6 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de *B.cereuse*

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	146,77534	10,4840	3,9850	0,0107*
Résidus	12	31,57026	2,6309	.	.
Défaut d'ajustement	10	24941,536	2494,15	13,5513	0,0706
Erreur pure	2	368,105	184,05	.	.
Total	26	178,34560	.	.	.

discussions et Résultats

Tableau N°7 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de S.aureus

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	93,78824	6,69916	8,4950	0,0003***
Résidus	12	14,00000	0,78860	.	.
Défaut d'ajustement	10	8,3237250	0,832372	1,4610	0,4735
Erreur pure	2	1,1394667	0,569733		
Total	26	103,25143	.	.	.

Tableau N°8 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de L.monocytogenese

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	92,51544	6,60825	3,8906	0,0118*
Résidus	12	20,38232	1,69853	.	.
Défaut d'ajustement	10	18,256925	1,82569	1,7180	0,4234
Erreur pure	2	2,125400	1,06270		
Total	26	112,89776	.	.	.

Tableau N°09 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de P.aerogenosa.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	92,51544	6,60825	3,8906	0,0118*
Résidus	12	20,38232	1,69853	.	.
Défaut d'ajustement	10	18,256925	1,82569	1,7180	0,4234
Erreur pure	2	2,125400	1,06270		
Total	26	112,89776	.	.	.

Tableau N°10 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement d'E.coli.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	12,890375	0,92074	0,6391	0,7896
Résidus	12	17,288625	1,44072	.	.
Défaut d'ajustement	10	16,646425	1,66464	5,1842	0,1724
Erreur pure	2	0,642200	0,32110		
Total	26	30,179000	.	.	.

Tableau N°11 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de Cladosporum sp

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	482,83309	34,4881	3,9271	0,0114*
Résidus	12	105,38411	8,7820	.	.
Défaut d'ajustement	10	93,85744	9,38574	1,6285	0,4396
Erreur pure	2	11,52667	5,76333		
Total	26	588,21720	.	.	.

discussions et Résultats

Tableau N°12 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de A.niger

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	941,1436	67,2245	8,6824	0,0003***
Résidus	12	92,9109	7,7426	.	.
Défaut d'ajustement	10	84,899675	8,48997	2,1195	0,3629
Erreur pure	2	8,011267	4,00563		
Total	26	1034,0545			

Tableau N°13 : Analyse de la variance et défaut d'ajustement de B.cineria

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob.>F
Modèle	14	86,69184	6,19227	2,2797	0,0800
Résidus	12	32,59586	2,71632	.	.
Défaut d'ajustement	10	25,975792	2,59758	0,7848	0,6786
Erreur pure	2	6,620067	3,31003		
Total	26	119,28770			

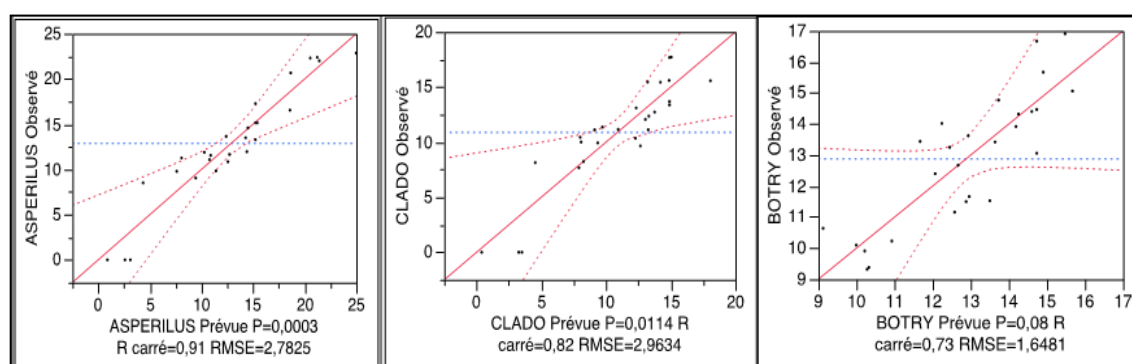


Figure N°23 : Graphique de valeurs observées en fonction de valeurs prévues des champignons

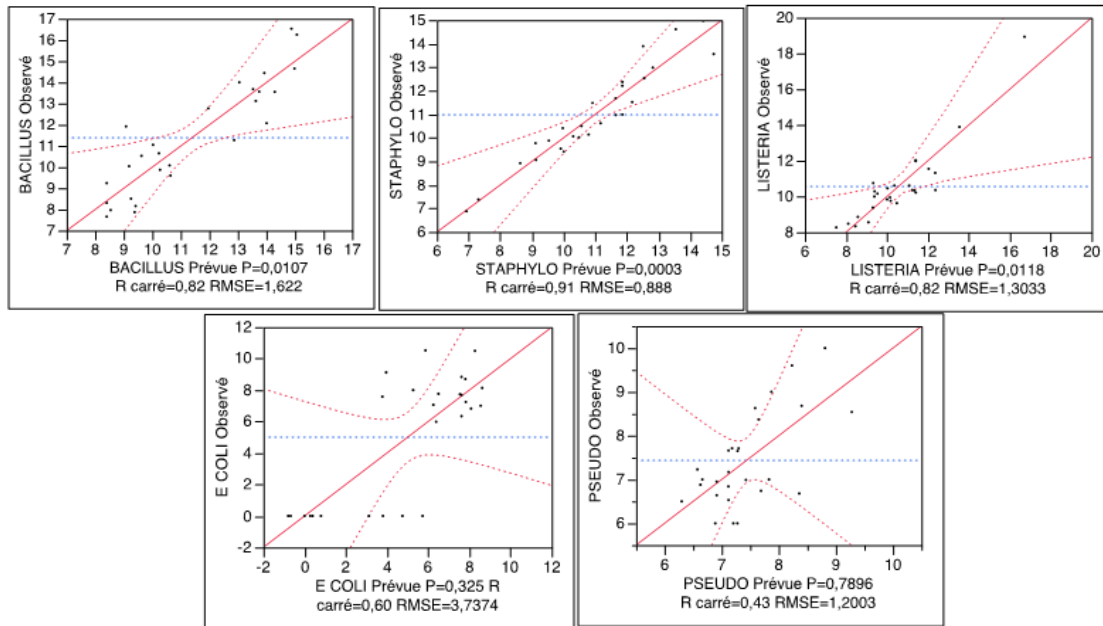


Figure N°24: Graphique de valeurs observées en fonction de valeurs prévues des bactéries

II.2. Pour *Bacillus cereus*

Les termes interaction temps-température, s/l-température, température –solvant, temps –solvant, ratio-solvant ainsi que les termes quadratiques du temps et ratio était cependant significatifs ($p < 0,05$). (**Tableaux Annexe II**) Après le retrait des facteurs non significatifs, la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation:

$$YAB = 8.40 + 2.69X_1X_2 + 2.5X_1X_3 + 1.85X_1X_4 + 1.85X_2X_4 - 1.80X_3X_4 + 2.18X_1^2 + 1.83X_3^2$$

Les résultats de la présente étude de l'activité et les mesures des zones d'inhibition sont présentés dans (**Tableau Annexe I**), ils indiquent la présence des zones d'inhibition autour des disques d'antibiogrammes où l'effet inhibiteur le plus prononcé est obtenu est de 16.53 mm-16.25mm avec les extraits ayant des teneurs en flavonoïdes de 460 et 696.97 $\mu\text{g/gMs}$ respectivement ou la teneur 460 et 696.97 a été obtenu dans les conditions de température, temps, ratio et solvant $30^\circ\text{C}, 75\text{min}, 1/10, 80\%$ et $30^\circ\text{C}, 30\text{min}, 1/15$ et 80% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée présente une sensibilité *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de

fleur de *Pistacia lentiscus*, cette résultat est plus important que celui obtenue par **Iratni (2016)** qui révéla une zone d'inhibition de $12,31 \pm 0,17\text{mm}$

II.3. Pour *Staphylococcus aureus* :

Les termes liniers de ratio avec les termes d'interactions de la température -ratio s/l, temps-solvant, ainsi que les termes quadratiques du solvant et ratio avaient un effet significatif ou Après le retrait des facteurs non significatifs, la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation:

$$YAS = 11.85 + 0.78X_3 + 0.99X_1X_3 + 1.43X_2X_4 - 2.37X_3^2 + 1.58X_4^2$$

Les résultats de la présente étude de l'activité et les mesures des zones d'inhibition sont présentés dans (**Tableau Annexe**) ils indiquent la présence de zones d'inhibition aux tours des disques d'antibiogrammes ou l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenue est de 14.61mm, 14.98mm avec l'extrait a des teneurs de flavonoïdes de 786.36 et 710.61 respectivement, ou les teneurs 786.36 et 710.61 ont été obtenues dans les conditions de température, temps, ratio et solvant (50°C, 120min, 1/15, 100% et 30°C, 75min, 1/15 et 60%) respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée présente une sensibilité *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus*, Si on compare les résultats avec ceux de la bibliographie on trouve qu'elle est supérieure à celle trouvée par l'étude effectuée Selon **Debbabi et al., (2017)** qui révèle que les différents extraits aqueux des feuilles ont une activité inhibitrice sur la croissance *in vitro* de souches bactériennes testées *S. aureus* à diamètre égale 9.7 ± 0.6 mm et 8.3 ± 0.5 ainsi que **Benhemou.N (2006)** qui révèle que *S. aureus* voir une légère sensibilité (diamètre d'inhibition : 10 ± 1.00 mm) Mais ces résultats restent faibles comparativement avec ceux de **Magiatis P (1999)** obtenue par l'huile extraite des feuilles qui sont arrivées à une zone de $\pm 20\text{mm}$

II.4. Pour *Listeria monocytogenese*:

Le terme linier du temps, ratio, solvant avec les deux termes quadratiques du temps et du ratio étaient significatifs ($p < 0,05$) (**Tableaux Annexe II**) Après le retrait des facteurs non significatifs, la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation :

$$YAL = 11.41 - 0.86X_2 - 0.92X_3 + 1.24X_4 - 2.34X_3X_4 - 1.38X_1^2 - 1.33X_2^2$$

Les mesures des zones d'inhibition présentées dans (**Tableau Annexe I**) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenu est de 13.89 mm-18.93mm avec les extraits de taux de flavonoïdes de 850 et 577 respectivement ou les teneurs 850 et 577 ont été obtenues dans les conditions de température, temps, ratio et solvant 50°C, 30min, 1/15, 100% et 50°C, 75min, 1/10, 100% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée est très sensible *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus*. Les résultats obtenus comparativement avec ceux de **Djenane et al., (2011)** ont montré que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* a exercé un effet inhibiteur vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* CECT 935, avec un diamètre de zone d'inhibition de $19,75 \pm 3,2$ mm étaient fiables contrairement avec celle obtenue par **Benhammou.N et al.,(2008)** qui ont obtenu des zones d'inhibition maximale de 10mm

II.5. Pour *Escherichia coli* :

Le (**Tableaux Annexe II**) résume les coefficients de régression obtenus. Seul le terme d'interaction celui de température –solvant qui il y avait un effet significatif ($p < 0,05$) la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée dans par équation:

$$YAE = 7.61 + 4.37 X_1 X_4$$

Les mesures des zones d'inhibition présentées dans (**Tableau Annexe I**) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenu est de 10.49 mm-10.52mm avec les extraits de taux de flavonoïdes de 909 et 906 respectivement ou les teneurs 909 et 906 ont été obtenues dans les conditions de température, temps, ratio et solvant 70°C, 75min, 1/15, 100% et 50°C, 75min, 1/20, 60% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée présente une sensibilité faible *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur *Pistacia lentiscus* de **Bammou et al., (2015)** ont étudié le pouvoir antibactérien des extraits de *Pistacia lentiscus*, et selon leurs résultats, ils ont enregistré que les extraits des feuilles n'ont aucun effet sur *E. coli*, même résultat obtenu par **BENHEMOU.N (2006)** qui révèle que les extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *P.lentiscus*, n'a aucun effet sur *E. coli*. En revanche, même que **Debbabi et al.,(2017)** qui ont trouvés que tous les extraits et l'huile essentielle sont inefficaces contre *S.enteritidis* et *E.coli*

II.6. Pour *Pseudomonas aerogenosa* :

Le (Tableaux Annexe II) résume les coefficients de régression obtenus. Tous les termes liniers, quadratiques et d'interaction étaient tous non significatif ($p > 0,05$) la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation :

$$YAP = 7.12$$

Les mesures des zones d'inhibition présentées dans (Tableau Annex1) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenu est de 9.60 mm-10mm avec l'extrait à des taux de flavonoïdes de 786.36 et 710.60 respectivement qui ont été obtenus dans les conditions de température, temps, ratio et solvant 50°C , 120min, 1/15, 100% et 30°C , 75min, 1/15 et 60% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée ne présente aucune sensibilité faible *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus*. Si on compare les résultats avec ceux de la bibliographie est inférieur à celle trouvée par l'étude effectuée selon Benrokiya et Aouour .K(2015), La plus grande surface d'inhibition est enregistrée par la souche *P.aeruginosa* (70mm), suivie par *S. aureus* (42mm), *E.coli*(33mm) et *S.blanc* (25mm) avec l'extrait MeOH des feuilles et même celle trouvée par Bouharb *et al.*,(2014), La zone d'inhibition trouvée est de $12,66 \pm 0,477$ mm. En revanche nos résultats restent faibles comparativement avec ceux de, Cheurfa (2016) illustré que l'extrait hydro alcoolique de *Pistacia lentiscus* exerce un effet inhibiteur faible sur *S.aureus* et *P. aeruginosa*(11.50 ± 0.9 ; 10.00 ± 0.5 mm),

II.7. Pour *Aspergillus niger* :

Les termes linier de température, ratio et solvant aussi le terme d'interaction de la température et du temps ainsi que coefficient quadratiques du solvant présente des effets significatifs ($p < 0,05$) Après le retrait des facteurs non significatifs, la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation :

$$YAA = 15.22 - 3.80X_1 - 2.86X_3 - 1.94X_4 + 7.38X_1X_2 - 6.03X_4^2$$

Les mesures des zones d'inhibition présentées dans (tableau A) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenu est de 22.37 mm-22.85 mm avec l'extrait à des

taux de flavonoïdes de 260 et 696.97 respectivement qui ont été obtenue dans les condition de température, temps, ratio et solvant 50C°, 120min, 1/10, 80% et 30C°, 30min, 1/15, 80% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée est extrêmement sensible *vis-à-vis* ces extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus* ces résultats sont important comparativement avec ceux effectué par **CHEKOUA et al.,(2015)** sur les huiles de *Pistacia lentiscus* qui n'a trouvé aucun sensibilité vis-à-vis *Aspergillus niger* et même que les résultat obtenue avec **MEGHAZLN (2012)** qui a révélé aucune zone d'inhibition 0.00 mm

II.8. Pour *Botrytis cineria*:

D'après le (Tableaux Annexe II)touts les termes linier du température ,ratio et solvant et tous les terme d'interaction sauf celle de ratio-solvant ainsi qu'au terme quadratique du température et ratio étaient tous non significatif ($p > 0,05$) contrairement au effet significatif ($p < 0,05$) des termes linier du temps, terme interaction ratio-solvant et quadratiques de time et du solvant , la relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation:

$$YAB = 14.73 - 0.94X_2 + 2.05X_3X_4 - 1.85X_2^2 - 2.23X_4^2$$

Les mesures des zones d'inhibition présenté dans (tableau A) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenue est de 16.67 mm-16.91 mm avec l'extraits a des taux de flavonoïdes de 726 et 525 respectivement qui ont été obtenue dans les condition de température, temps, ratio et solvant 50C°, 75min, 1/15, 80% et 70C°, 75min, 1/10 et 80% respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée présente une sensibilité considérable *vis-à-vis* des extraits des flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus*

II.9. Pour *Cladosporium* :

Le(Tableaux Annexe II) résume les coefficients de régression obtenus. Les termes linier de la température et ratio et tous les termes d'interaction et quadratique étaient tous non significatif ($p > 0,05$) sauf celle d'interaction du temps-ratio et quadratique du solvant qui avait un effet significatif ($p < 0,05$). La relation entre les variables indépendantes testées et la réponse a été expliquée par équation:

$$YAC = 14.90 - 2.43X_2 - 3.88X_4 + 4.97X_2X_3 - 3.50X_4^2$$

discussions et Résultats

Les mesures des zones d'inhibition présentées dans (**Tableau Annex1**) indiquent que l'effet inhibiteur le plus prononcé obtenu est de 17.67 mm-17.70 mm avec l'extrait de flavonoïdes de 699 et 472 respectivement qui ont été obtenus dans les conditions de température, temps, ratio et solvant (50/50,75/75,1/15-1/10,80/60) respectivement. Cela signifie que cette souche bactérienne étudiée présente une sensibilité considérable *vis-à-vis* des extraits de flavonoïdes de la poudre de fleur de *Pistacia lentiscus*.

La taille de la zone d'inhibition, dépend essentiellement de la capacité de diffusion, dans le milieu gélosé, des différents composés contenus dans l'extrait végétal brut. Cette capacité est associée à la polarité des substances diffusibles (**Carneiro et al., 2008**).

II.2. Analyse des surfaces de réponses d'activités :

II.2.1. Pour *Bacillus cereus* :

a) Effet du temps et la température sur l'activité anti-*Bacillus cereus* :

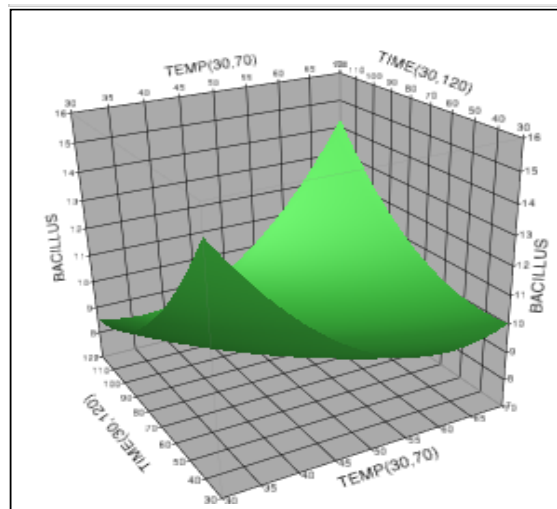


Figure N°25: Diagramme de surface de réponse Effet du temps et la température sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereus* augmente avec l'augmentation de la température et diminue avec la diminution du temps, donc il a été observé que l'effet de la température n'avait aucune influence sur l'activité, par contre le temps peut influencer sur l'activité. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec une température et un temps d'extraction de 30°C et de 30 min respectivement.

b) Effet de la température et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*:

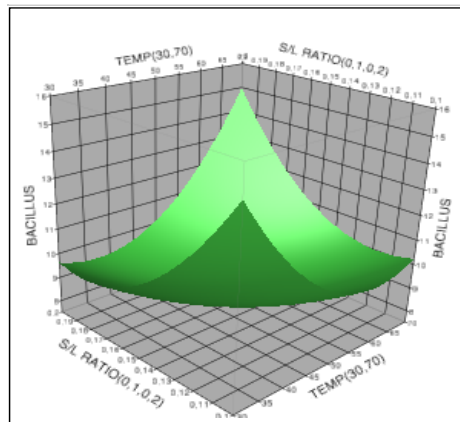


Figure N°26 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de la température et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereus* augmente avec augmentation de température et diminution de ratio, donc il a été observé que la température et le ratio influencent de la même façon sur l'activité. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec une température et un ratio d'extraction de 70 C° et de 1/20 respectivement.(Figure..c)

c) Effet de temps et de concentration de solvant sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

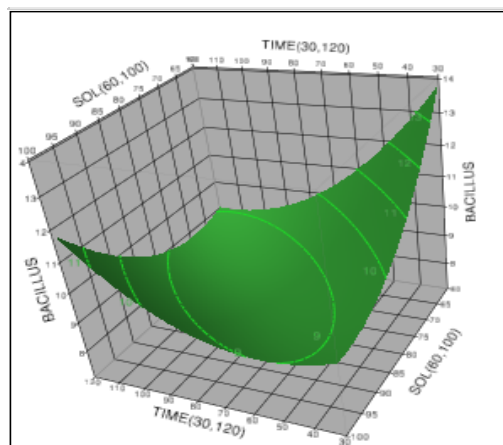


Figure N°27 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de temps et de concentration de solvant sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereus* augmente avec diminution de temps et diminution de % de solvant, donc il a été observé que l'effet de la temps avait une influence sur l'activité

par rapport au solvant. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec une tempe et un % de solvant d'extraction de 30 min et de 60% respectivement.

d) Effet de tempe et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

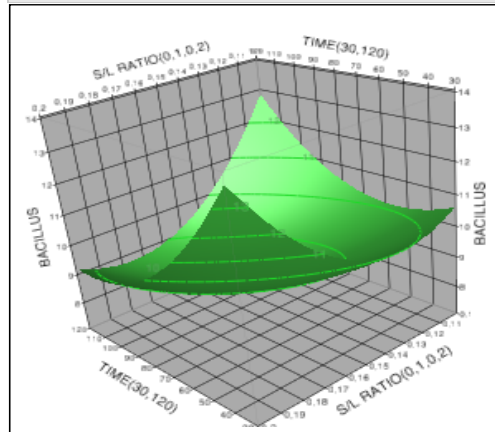


Figure N°28 : Diagramme de surface de réponse d'effet de temps et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereuse* augmente avec augmentation de temps et augmentation de ratio, donc il a été observé que l'effet de la tempe avait une influence sur l'activité par rapport au ratio. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec une tempe et une ratio d'extraction de 30 min et de 1/20 respectivement.

e) Effet de la température et de concentration de solvant sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

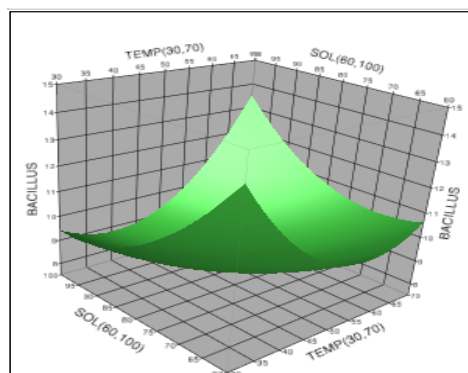


Figure N°29 : Diagramme de surface de réponse d'effet de la température et de pourcentage de solvant sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereus* augmente avec augmentation de % de solvant et augmentation de température, donc il a été observé que l'effet de % de solvant et de la

température avait une même influence sur l'activité. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec une température et % de solvant d'extraction de 70C° et de 100% respectivement.

f) Effet de concentration de solvant et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

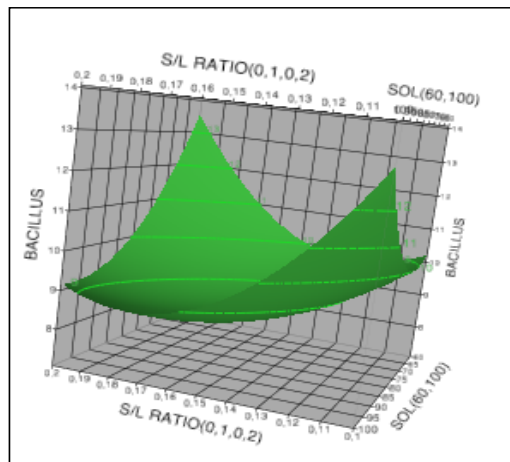


Figure N°30: Diagramme de surface de réponse de l'effet de concentration de solvant et le ratio sur l'activité anti-*Bacillus cereus*

L'activité anti-*Bacillus cereus* augmente avec diminution de % de solvant et diminution de ratio, donc il a été observé que l'effet de % de solvant avait une grande influence sur l'activité que le ratio. L'activité anti-*Bacillus* maximale pourra être obtenue avec un % de solvant d'extraction et de ration de 60% et 1/20 respectivement.

II.2.2. Pour *Staphylococcus aureus*

a) Effet de la température et le ratio sur l'activité anti-*S.aureus*

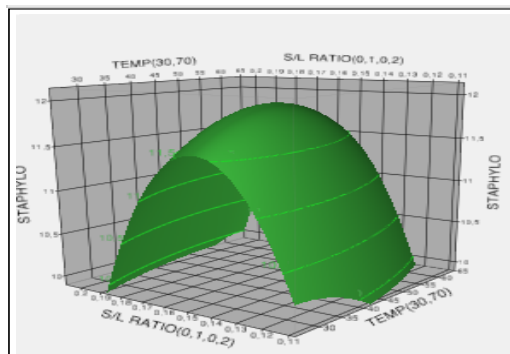


Figure N°31: Diagramme de surface de réponse de l'effet de la température et le ratio sur l'activité anti-*S.aureus*

L'activité anti- *S.aureus* augmente avec augmentation de température et une augmentation de ratio , donc il a été observé que l'effet de ratio avait une grande influence sur l'activité que celui de la température .L'activité anti- *S.aureus* maximale pourra être obtenue avec une température d'extraction et de ratio de 48C° et 1/20 respectivement.

b) Effet de temps et de pourcentage de solvant sur l'activité anti-*S.aureus*

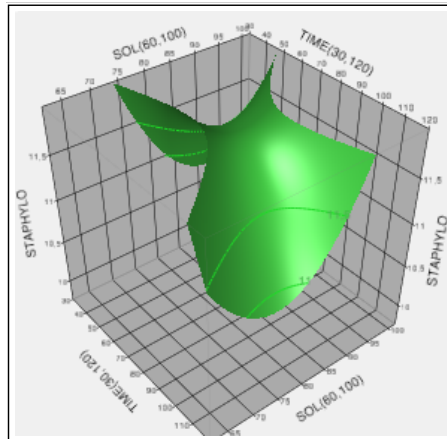
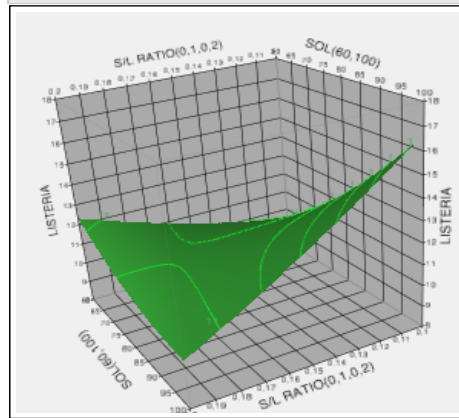


Figure N°32: Diagramme de surface de réponse de l'effet de temps et de pourcentage de solvant sur l'activité anti- *S.aureus*

L'activité anti- *S.aureus* augmente avec diminution de temps et une augmentation de %de solvant , donc il a été observé que l'effet de % de solvant avait une grande influence sur l'activité que celui de la temps .L'activité anti- *S.aureus* maximale pourra être obtenue avec une temps d'extraction 30min et 60% respectivement.

II.2.3. Pour *Listeria monocytogenes*

- a) Effet de ratio et de concentration de solvant sur l'activité anti-*L.monocytogenes*



FigureN°33: Diagramme de surface de réponse de l'effet de ratio et de pourcentage de solvant sur l'activité anti-*L.monocytogenes*

L'activité anti-*Listeria* augmente avec l'augmentation de ratio et une augmentation de % de solvant, donc il a été observé que l'effet de % de solvant avait une grande influence sur l'activité que celui de ratio. L'activité anti-*Listeria* maximale pourra être obtenue avec un % de solvant et un ratio de 100% et 1/10 respectivement. (Figure..33)

II.2.4. Pour *Cladosporium*

- a) Effet de ratio et de temps sur l'activité anti-*Cladosporium*

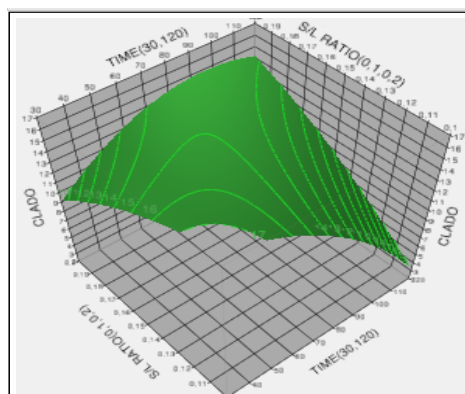


Figure N°34 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de ratio et de temps sur l'activité anti-*Cladosporium*

L'activité anti-Cladosporium augmente avec l'augmentation de ratio et une augmentation de % de solvant, donc il a été observé que l'effet de temps avait une grande influence sur l'activité que celui de ratio. L'activité Cladosporium maximale pourra être obtenue avec une ratio et de temps de 1/10 et 30 min respectivement.

II.2.5. Pour *Aspergillus niger*

a) Effet de température et de temps sur l'activité anti-*A.niger*

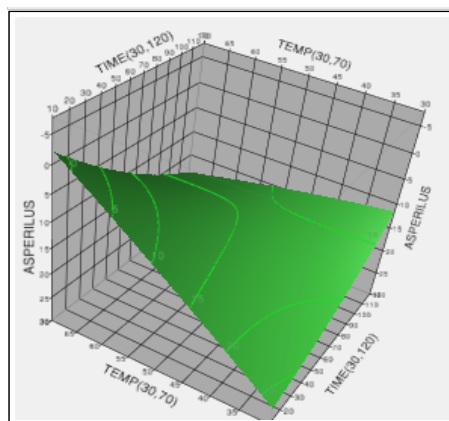


Figure N°35 : Diagramme de surface de réponse de l'effet de température et de temps sur l'activité anti-*A.niger*

L'activité anti- *A.niger* augmente avec diminution de température et légère corrélation de temps, donc il a été observé que l'effet de température avait une grande influence sur l'activité que celui de temps. L'activité anti- *A.niger* maximale pourra être obtenue avec une température et de temps de 30C° et 30 min respectivement.

L'examen des résultats pour les extraits de *Pistacia lentiscus* nous montre clairement que les extraits méthanolique des fleurs de la plante exercent un effet remarquable sur l'ensemble des souches. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette plante contient des composants antibactériens actifs extractibles par ce solvant. La taille de la zone d'inhibition, dépend essentiellement de la capacité de diffusion, dans le milieu gélosé, des différents composés contenus dans l'extrait végétal brut. Cette capacité est associée à la polarité des substances diffusibles (Carneiro et al., 2008) Il apparaît que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereuse*, *listeria monocytogenese*, (gram positive) sont les bactéries les plus sensibles aux extraits méthanoliques des fleurs par rapport aux autres souches (GRAM négatif) *Escherichia coli* et *Pseudomonas*

aerogenosa. Ceci peut être attribué à la différence structurale entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives (David et Sudarsanam., 2013). Notons

aussi que les extraits éthanoïques de fleurs de *Pistacia lentiscus* montre un grand effet sur les souches fongique *Aspergillus niger*, *Cladosporium* et *Botrytis cineria*.

III- Optimisation des processus et étude de confirmation

En utilisant la fonction de désirabilité qui comprenait l'activité antimicrobienne et la teneur totale en flavonoïdes les plus élevées, tout en conservant un minimum de pourcentage de solvant, un rapport solvant / échantillon, temps et température, il était possible d'optimiser le processus d'extraction. Les conditions d'extraction optimales pour la présente étude étaient le méthanol aqueux de 63.40%, le rapport solvant / échantillon de 1/18, la température de 30 ° C et le temps d'extraction de 50.28 min, les teneurs en flavonoïdes totaux étant de 876.18ugEQ/g et les activités antimicrobiennes des souches étudiées *B.cereus*, *S.aureus*, *L.monocytogenese*, *E-coli*, *P.aerogenosa*, *A.niger*, *Cladosporium* et *Botrytis cineria* sont 17.06, 12.93, 10.81, 7.90, 11.42, 10.30, 21.34 et 13.66 respectivement.

discussions et Résultats

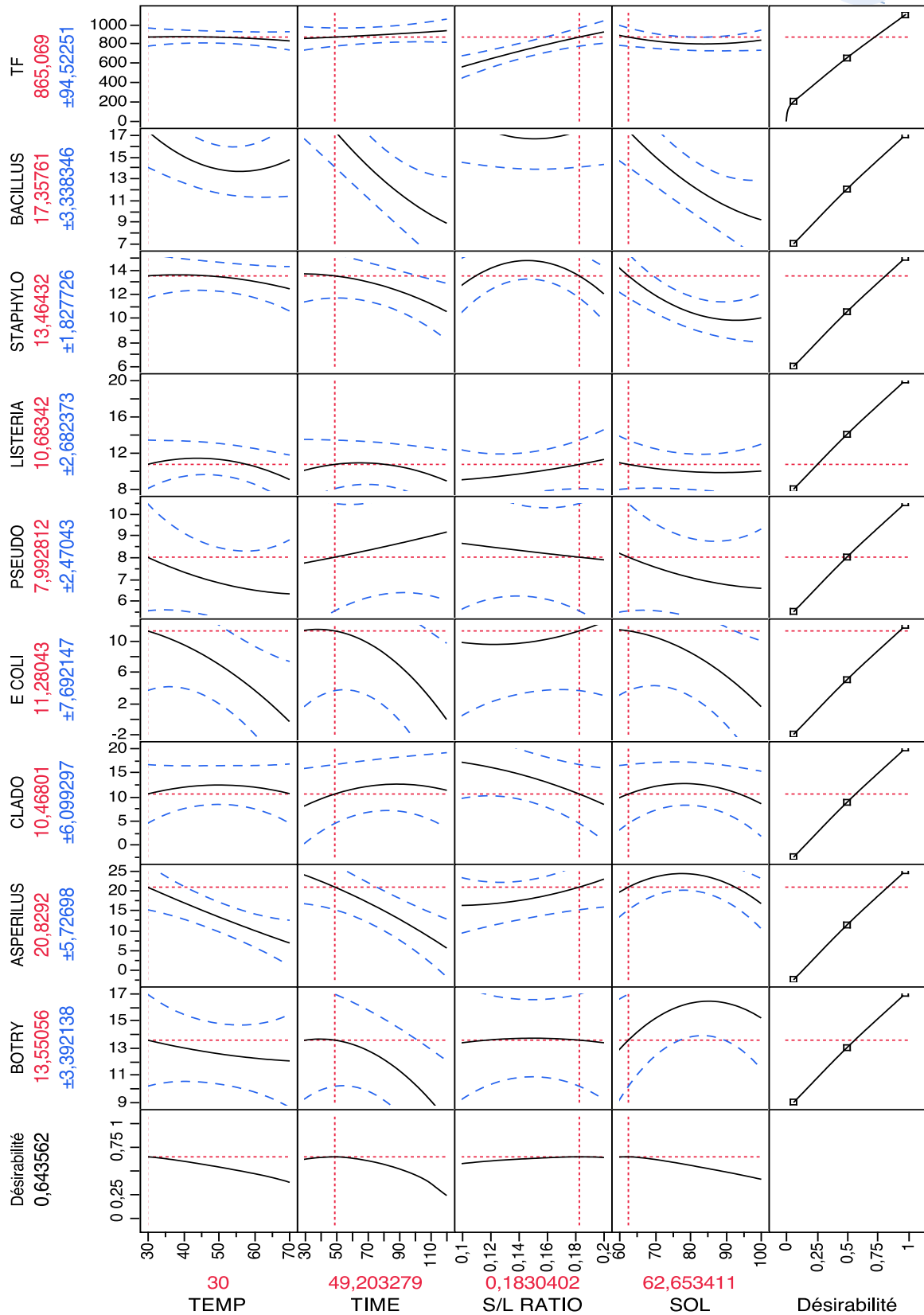
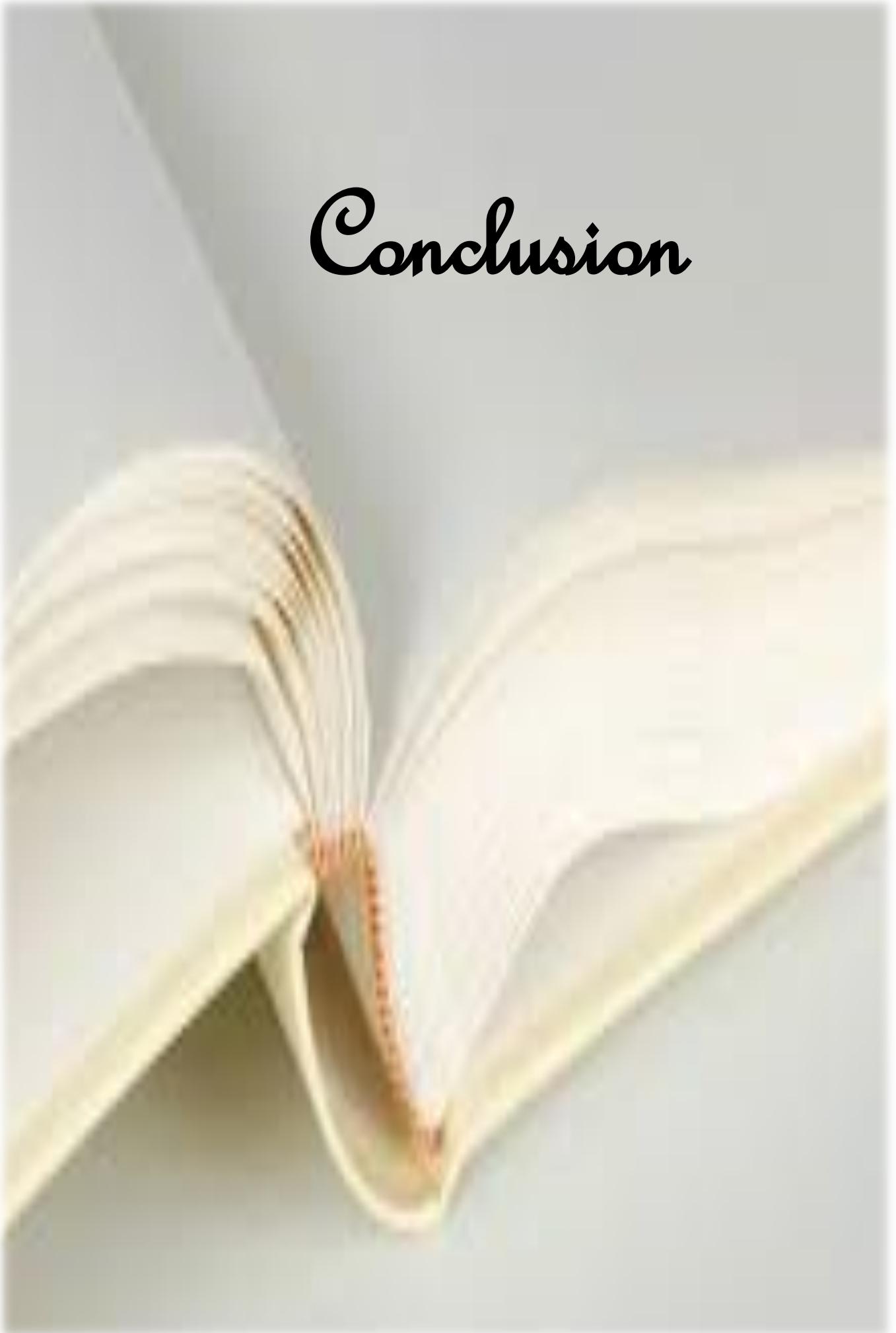
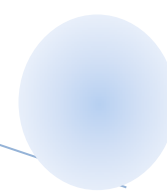


Figure N°36 : Optimisation des processus d'extraction des flavonoïdes totaux et d'activités antimicrobiennes

Conclusion





Conclusion et perspectives :

Actuellement, la recherche de sources d'antimicrobiens naturels comme les sources alternatives de synthèse a émergé et l'exploitation des différents métabolites secondaires de la plante a été mise en évidence ces dernières années. Ainsi, les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes ont attiré l'attention en tant que source potentielle de molécules bioactives.

Pistacia lentiscus représentent une source inépuisable de substance naturelle et bioactifs., comme les Flavonoïdes, qui sont surtout illustrés en thérapeutique. Le présent travail a porté d'une part sur l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes en se basent sur l'utilisation de différents facteurs (%solvants, Température, temps et ratio S/L d'extraction) et d'autre part sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de cette espèce.

Les mesures faite sur la teneurs en flavonoïdes Nous a mené a conclure que les fleurs de cette plantes contient des quantité moyennement faible de flavonoïdes 876.18ugEQ/g, et pour l'étude microbiologique, la méthode de l'aromatogramme donne de bons résultats et L'extrait méthanolique des fleurs de *P. lentiscus* a démontré une inhibition de la croissance des bactéries de référence Gram positif représentées par *B.creuse*,*S.aureus*,*L.monocytogenese*, et un effet négative sur la croissance des bactéries Gram négatif a savoir *E.coli* et *P.aerogénosa*. Il a également démontré un effet d'inhibition de la croissance des champignons à savoir : *A.niger*, *Cladosporium* et *Botrytis*. En utilisant la Méthodologie de surface de réponse, on a pu obtenir l'état optimal pour une teneur en flavonoïde et activité antimicrobienne optimal pour les conditions d'extraction du méthanol, du rapport solvant / échantillon, du temps et de la température. Ces conditions optimales étaient de 63.40% méthanol , de rapport solvant / échantillon de 1/18, la température de 30 ° C et le temps d'extraction est de 50.28 min

En effet, L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités biologiques. Pour plus d'efficacité, il serait souhaitable de compléter cette étude en s'intéressant à identifier les substances responsables de l'effet biologique par des fractionnements ,et les tester sur d'autres micro-organismes pathogènes de bactéries et élargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : anti-inflammatoire et anticoagulant Procéder à des tests in vivo dans le cadre d'une lutte biologique pourra amélioration des rendements en agriculture et la protection des denrées stockées.

Références



- **Achat S.,2013.** Thèse Présenté pour l'obtention du grade de docteur en sciences filière biologie .option : sciences alimentaires. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoirantioxydant et interactions avec des ions métalliques.261p.
- **Al-saghir M.G., 2006.** Thèse de doctorat en sciences biologique. Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae).Universite Blacksburg, Virginia. Faculté de polytechnique.123p.
- **Amirouche R.,2008.** Flore spontanée d'Algérie et ressources phylogénétiques. Caractérisation et stratégie de Conservation. Communication introductive In : Actes des XIèmes journées du réseau Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) : Biotechnologies végétales et gestion durable des résistances face à des stress biotiques et abiotiques. Agrocampus Rennes, France, volume:13(5):11-12p.
- **Arbonnier M., 2002.** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Pont-sur-Yonne: CIRAD/MNHN, France. 574 p.
- **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. Biomedical Chromatography.volume: 19 (4): 285-311p.
- **Atmani.d.,Chaher.N., Berboucha.M., Ayouni.K., Lounis.H., Boudaoud.H., Debbache.N., D.atmani., 2009.** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Fond Chemisiry., Vol: 112. P:303-309.
- **Audouini.,Bourdon.,Brongniard.,Deshayes.,Deslonchamps E., Drapiez., Dumas., Edwards., Fee A ., Flourens., Saint hillaire G ., Guerin., Guillemine., Kunth.,Delafosse G ., Latreille., Prevost C., Richard A ., Bory., 1826.** Dictionnaire classique d'histoire naturelle volume10.REY ET GRAVIER, 642 p.
- **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. volume: 19 (1): 93-102p.
- **Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, G.H., Sitaras, N.M., Pantazis, P., 2007.** Antiproliferative activity and induction of apoptosis in

human colon cancer cells treated in vitro with Constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. Chia. *Phytomedicine*. volume:14 (4): 263-172p.

- **Bammou.M., Daoudi.A., Slimani.I., Najem.M., Bouiamrine.E., Ibijbijen.J., Nassiri.L., 2015.** Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. » : Etude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of applied biosciences.*, Vol :86: P :7966 – 7975.
- **Bas.D et Boyaci.I.H.,2007.** Modelling and optimization II: comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*, February., Vol:78(3).P: 846 854.
- **Belfadel F.Z. 2009.** Thèse de Magister en Chimie organique. Option de Phytochimie .Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* Caractéristiques Physico-chimiques et effets biologiques: Effet cicatrisant chez le rat. Université Mentouri Faculté des sciences exacte Département de chimie.Constantine.144p.
- **Belhadj S., 2000.** Les Pistacheraies Algériennes: Etat actuel et dégradation, Zaragoza : CIHEAM. Centre Universitaire de Djelfa, Algérie. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n.56. 107- 109 p.
- **Bellakhdar J., 2003.**Le Maghreb à travers ses plantes: Plantes, Productions végétales et Traditions au Maghreb. Le fenec.204p.
- **Benrokiya.H et Aouour.K., 2015.** Mémoire de fin d'étude En vue de l'obtention du diplôme de Master Spécialité: Analyses Biologiques et Biochimiques; Université Djilali Bounaama Khemis Miliana;Analyses Biologiques et Biochimiques. Etude de l'activité Antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus*.83p.
- **Bensalem G., 2014.** Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires, Option de Technologies Alimentaires. L'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus*) dans l'est algérien : Caractéristiques physico-chimiques et composition en acides gras.Université Constantine 1 institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agroalimentaires I.N.A.T.A.A. Département de Technologies Alimentaire.139p.
- **Botineau M., 2015.** Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques. Lavoisier: TEC& DOC, France.336p.
- **Bouguerra.A., 2017.** Mémoire Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires ;Option : biotechnologies alimentaire ;université Mentouri

Constantine: Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte.128p.

- **Brieimann H L., Setzer W N., Kaufman P B., Kirakosyan A, Cseke L J., 2016.** Phytochemicals : The chemical components of plants. In :CsekeL J.,Kirakosyan A, Kaufman P B.,Warber S., Duke J A.,Brielmann H L. (Eds), Natural Products from Plants, Second Edition. CRC Press.1-50 Pp.
- **Bruneton J., 1999.**Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales 3^e édition. TECHNIQUES ET DOCUMENTATIONS. PARIS. 494 p.
- **Calatayud P A., Desneux N., Le Gall P, 2013.** Caractéristique chimique des plantes. In : SAUVION N., CALATAYUD P A., THIERY D., POLL F M. (Eds). Interactions insectes-plantes. Quae, 217-228 Pp.
- **Chirinos.R., Rogez.H.,Campos.D., Pedreschi.R., Larondelle.Y., 2007.** Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua :tropaeolumtuberosumruíz&pavón tubers; journal of separation and purification technology.,Vol: **55**, P:217-225.
- **Debbabi.H.K.,Nemri.H., Riahi., 2017.** Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L : FoliarExtracts on freshturkeybreastcutlets Effets antimicrobiens des extraits foliaires de *Pistacia lentiscus* ., V 40(1).P: 2144-2152
- **Djenane.D., Yangüela.J., Montañés.L., et al., 2011.** Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Saturejamontana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. Journal: Food Control..Vol:22. P: 1046–53.
- **Djerrou Z., 2011.** Thèse de Doctorat en Sciences .Option Pharmacologie Toxicologie. Etude des effets pharmaco-toxicologique des plantes médicinales d'algéries:Activité cicatrisante et innocuité de l'huile de *Pistacia lentiscus*.Université Mentouri Faculté des sciences de la nature et de la vie Département des sciences vétérinaires. Constantine .156p.
- **Dogan.,Yunus, Baslar., Suleyman., Aydin., HaliL., Mert., Hasan Huseyin., 2003.** A study of the soil-plant interactions of *Pistacia lentiscus* L. distributed in the western Anatolian part of Turkey. Acta Bot. Croat. 62 (2): 73-88p.e21.

- **Ebrahimzadeh. M. A., Pourmorad.F.,Bekhradnia. A. R., 2008.** Iron chelating activity, phenol and Flavonoids content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology.,Vol:7 (18).P: 3188-3192.
- **Fraga C G., GalleanO M., Verstraeten S V., Oteiza P I., 2010.** Basicbiochemicalmechanisme behind the health brnefits of polyphenols. Journal :Molecular Aspects of Medicine, Vol 31 :435-445 p.
- **Franco J., 2008.**Thèse Pour obtenir le grade de Docteur de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne Spécialité : Mathématiques Appliquées. Planification d'expériences numériques en phase exploratoire pour la simulation des phénomènes complexes. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. 289P.
- **Gaussen H., Leroy J.F., Ozenda P., 1982.** Précis de Botanique. Les Végétaux Supérieurs, Ed. Masson, 2ème édition, 579 pp.
- **Goupy J., Creighton L., 2006.** Introduction aux plans d'expériences 3eme Edition : DUNOD. 336 p.
- **Guignard J.L., Dupont F., 2004.** Botanique: Systématique moléculaire, 13eme édition. Paris: Masson. 283 p.
- **Gutierrez L M., Sanchez D T., Sahagun R A., Hcrnândcz C., 2012.**Natural Products Extracts:Terpenes and Phenolics.In :IlkayOrhan. (Ed), Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites ,Bentham Science Publishers e books, Ankara .21-35 Pp.
- **Hamlat, N. et Hassani, A., 2008.** Analyse des flavonoïdes présents dans les feuilles du lentisque par les méthodes chromatographiques. Biotech 2008, XIes Journées Scientifiques du réseau « Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire » de l'Agence universitaire de la Francophonie. Agrocampus Rennes, France. 46p.
- **Haslam E., 1989.** Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited, COMMBRIDGE UNIVERCITY PRESS. New York. 230 p.
- **HERNÁNDEZ I., ALEGRE L., V F BREUSEGEM., MUNNÉ-BOSCH S., 2009.**How relevant are flavonoids as antioxidants in plants. Journal : Trends in plant science .Volume 14(3) : 125-132 p.

- **Jaganathi B., Crozier A., 2009. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds).** Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology. In :FRAGA C S. (Ed). IUBMB John Wiley & Sons Inc publication, 1-50 Pp.
- **Kabera J N., Semana E., Mussa A R., HE X., 2014.** Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological proprieties .Journal :Pharmacy and Pharmacology.Vol : 2 (7) :377-392 p.
- **Kathirvel P., 2016.**Secondry Metabolite. DARSHAN PUBLISHERS, TAMIL NADU, INDIA.150 p.
- **King A., Young G.,1999.**characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. Journal :American Dietetic Association,Vol :99(2) : 213-218 p.
- **Kolodziej P., Kayser O., Latte K P, Kiderlen A F., 2012.** Enhancement of antimicrobial activity of tannins and related compound by immune modulatory effects.In : Gross G G., Hemingway R W., Yoshida T.(Eds), Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology. Basic life science & Business Media volume 66.575-594 Pp.
- **KRIEF, S., 2003.**Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Muséum National d'histoire Naturelle discipline : Ecologie et Chimie Des Substances Naturelles.348 p.
- **Linder R., 2005.**Les plans d'experiences: un outil indispensable à l'expérimentateur. Presse des Ponts, 320 p.
- **Ljubuncic P., Song H., Cogan U., Azaizeh H., Bomzon A., 2005.** The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. J Ethnopharmacol.volume:100 (1-2) :198-204p.
- **LUGASI A., HOVARI J., SAGI K V., BIRO L.,2003.**The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.Journal : ActaBiologicaSzegediensis. Volume 47(1-4) : 119-125 p.
- **Macheix J., Fleuriet A., Allemand C J., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques et universitaire romande, 192 p.

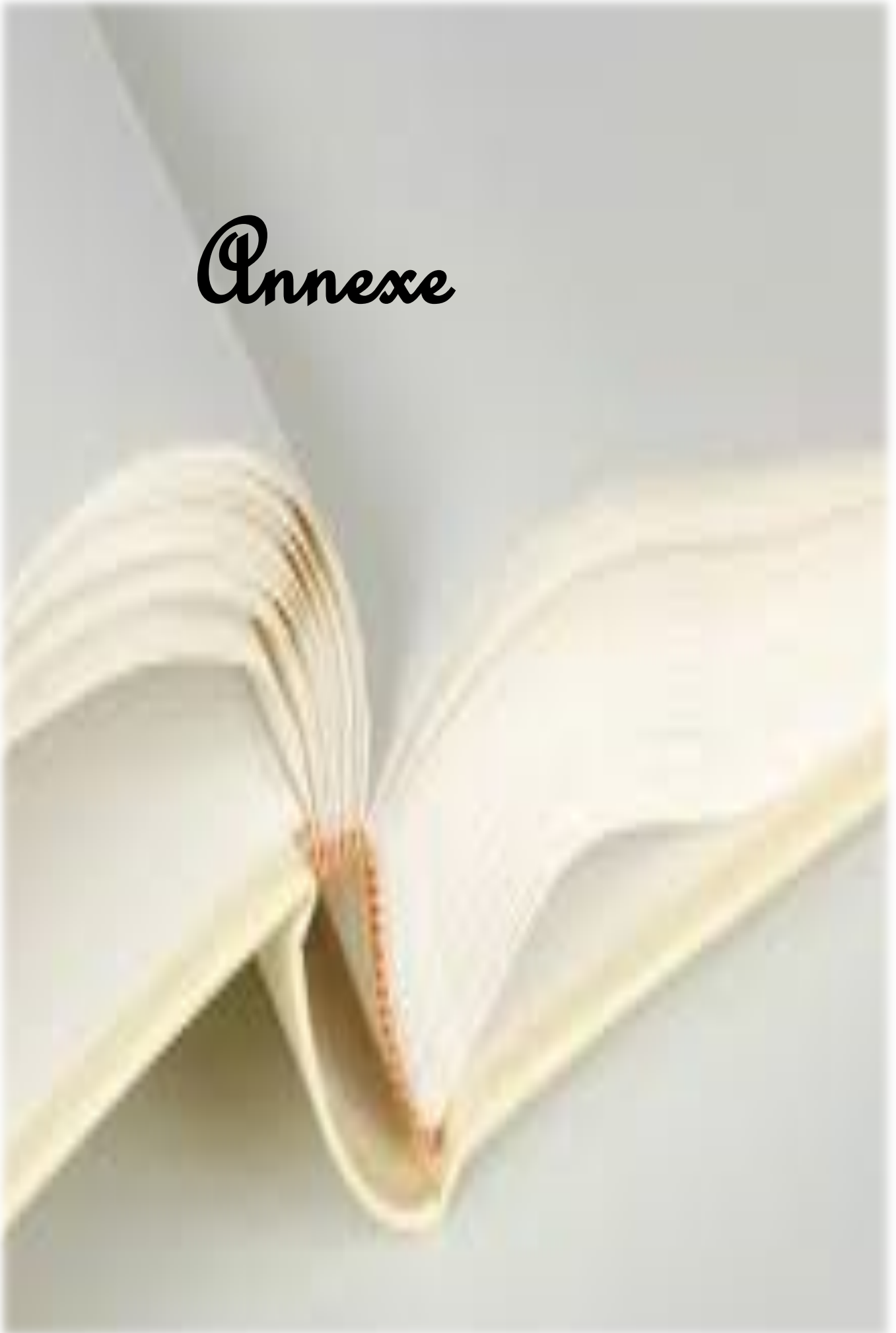
- **Magiatis.P., 1999.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus*. Journal of PlantaMedica., Vol: 65.8 P:749-752.
- **MAYER A.M, 2004.**Resistance to herbivores and fungal pathogens : the effect of secondary metabolites, induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. Journal :Plant Sciences, Vol 52(4) : 279-292 p.
- **Mekkiou R ., 2005.** Thèse présentée pour obtenir le diplôme de doctorat d'état en chimie organique – option: Phytochimie, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Université Mentouri – Constantine faculté des sciences département de chimie ; 215p.
- **Merzougui I., 2015.** Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3ème cycle (LMD).Option : Biochimie Appliquée. Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Université Badji Mokhtar Faculté des sciences département de biochimie laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquées. Annaba ,142p.
- **Montgomery., 2001.** Design and analysis of experiments New York: John Wiley & Sons, Inc.5th ed., P: 435e460.
- **More D., White J., 2005.** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèceset Variétés du Monde, Flammarion, 18 -797Pp.
- **Naczk.M ., Shahidi.F., 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.,Vol: 41, P: 1523-1542.
- **Oku H., 1993.** Plant Pathogenesis and Disease Control,Lewis Publisher CRC Press. 208 p.
- **Ollis W D., 1965.** Biochemistry of Phenolic Compounds.ACS Legacy Archives.Vol (87) :05.1157–1158 p.
- **Pell S.K., 2004.** Thèse de Doctorat en sciences biologique, Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae).Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.208p.
- **Pyrzynska.K et Biesaga.M., 2009.** Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey.*Trends in Analytical Chemistry.*, Vol: 28: P:893-902.

- **Quideau S., 2009.** Chemistry and Biology of Ellagitannins: An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols. World Scientific. 374 p.
- **Ratnam DV., Ankola DD., Bhardwaj V., Sahana DK., Kumar MN., 2006.** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. Journal : Controlled Release., Vol: 113 (3). P: 189-207 p.
- **Rhouma.H., Bendaoud.S., Ghanmi.H., Ben Salah.M., Romdhane.M., Demak.M., 2009.** Antimicrobial activity of leaf extracts of Pistacia and Schinus species against some plant pathogenic fungi and bacteria. Journal of Plant Pathology., Vol: 91 (2). P: 339-345.
- **Saadoun S.N., 2002.** Types stomatiques du genre Pistacia: Pistacia Atlantica Desf. ssp. Atlantica et Pistacia lentiscus L. Zaragoza : CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 63. 369- 371p.
- **SID-Ahmed B., 2014.** Thèse de Doctorat en Sciences. Option Biologie végétale Contribution à l'amélioration des techniques de stratification et de greffage de quelques espèces du genre *Pistacia*. Université STAMBOULI Mustapha Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département d'Agronomie. Mascara .202p.
- **Stangl V., Dreger H., Stangl K., Lorenz M., 2007.** Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. Journal : Cardiovascular Research (73) : 348-358.
- **Suty L., 2015.** Les végétaux: Les relations avec leur environnement. Les Memos de Quae, 56 p.
- **Tinsson W., 2010.** Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Springer Science & Business Media, 532 p.
- **Verpoorte R., 2000.** Plant secondary Metabolism. In : VERPOORTE R.(Ed). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. KLUWER ACADEMIC. P: 1-30 .

Webographie:

- (01).<http://www.plantasyhongos.es/angiospermas/Pistacia.ht>
- (02).<http://apcvdeledenon.blogs.midilibre.com/archive/2011/09/22/le-pistachier-lentisque.html>
- (03).<https://myrteformations.com/index.php?mod=aromatheque&act=fiche&ind=115>
- (04).<http://www.tela-botanica.org/bdtx-nn-49751-illustrations>
- (05).<https://quantumhealingparadigms.wordpress.com/2016/07/05/pistacia-lentiscus/>
- (06).https://www.huiles-et-sens.com/fr/121-huile-essentielle-lentisque-pistachier-bio.html#/1-conditionnement-5_ml

Annexe



Annexe

Annex 1

exp	TEMP	TIME	S/L RATIO	SOL	TF	BACILLUS	STAPHYLO	LISTERIA	PSEUDO	E COLI	CLADO	ASPERILUS	BOTRY
1	50.00	75.00	0.20	100.00	1054.00	10.04	10.62	9.76	8.68	6.82	8.23	0	14.32
2	30.00	75.00	0.10	80.00	460.00	16.53	9.88	10.34	7.71	5.98	11.12	21,99	13.42
3	50.00	75.00	0.15	80.00	715.15	7.66	10.99	11.98	7.17	7.68	13.37	17,27	13.06
4	70.00	120.00	0.15	80.00	610.61	13.55	10.14	8.48	6.00	0.00	10.00	16,54	12.67
5	50.00	30.00	0.15	60.00	840.91	14.44	13.56	10.00	6.00	0.00	12.06	11,88	14.02
6	70.00	75.00	0.15	60.00	727.27	10.08	13.89	8.86	6.50	0.00	12.72	11,07	11.66
7	50.00	120.00	0.15	100.00	786.36	12.77	14.61	9.95	9.60	9.12	0.00	9,78	9.32
8	50.00	120.00	0.15	60.00	689.39	11.92	10.97	9.38	7.65	0.00	10.34	9,05	10.64
9	50.00	75.00	0.10	60.00	472.00	9.87	10.50	10.16	7.00	7.73	17.70	11,66	13.92
10	30.00	75.00	0.15	60.00	710.61	12.07	14.98	10.46	10.00	7.00	15.45	13,65	11.16
11	70.00	75.00	0.15	100.00	909.09	13.68	12.98	11.32	8.54	10.49	0.00	0	13.25
12	50.00	30.00	0.15	100.00	850.00	7.87	11.48	13.89	6.84	0.00	9.92	8,51	10.23
13	50.00	120.00	0.20	80.00	1002.00	8.51	10.41	8.34	8.37	0.00	15.43	11,54	9.38
14	30.00	30.00	0.15	80.00	696.97	16.25	11.68	9.84	7.23	8.00	15.59	22,85	14.40
15	50.00	75.00	0.15	80.00	726.06	9.24	12.37	12.03	7.66	8.83	13.67	15,14	16.67
16	70.00	75.00	0.10	80.00	525.00	10.65	6.88	10.61	8.63	8.70	11.35	20,66	16.91
17	30.00	75.00	0.20	80.00	904.00	10.53	9.06	10.29	6.74	8.13	9.65	22,3	15.06
18	50.00	75.00	0.10	100.00	577.00	14.00	9.41	18.93	6.00	0.00	8.13	11,96	10.10
19	30.00	120.00	0.15	80.00	689.39	7.97	10.06	8.27	6.68	0.00	10.43	9,84	13.44
20	30.00	75.00	0.15	100.00	651.52	8.16	11.52	10.36	6.88	0.00	7.67	14,58	13.62
21	50.00	75.00	0.20	60.00	906.00	13.12	12.53	10.36	7.00	10.52	12.35	10,84	9.91
22	70.00	30.00	0.15	80.00	778.79	11.05	9.54	8.56	9.00	0.00	11.15	0	11.53
23	50.00	120.00	0.10	80.00	260.00	11.27	7.38	9.63	7.71	7.76	0.00	22,37	11.50
24	50.00	30.00	0.20	80.00	910.00	13.56	9.77	10.61	6.95	7.24	11.11	13,49	15.67
25	50.00	30.00	0.10	80.00	607.00	9.60	8.92	11.55	6.64	7.58	15.56	15,14	12.40
26	50.00	75.00	0.15	80.00	699.09	8.31	12.21	10.22	6.53	6.34	17.67	13,27	14.47
27	70.00	75.00	0.20	80.00	872.00	14.65	10.02	10.75	6.99	7.06	13.09	11,26	14.77

Tableaux A :Conception de Box-Behnken et les réponses

Annexe

Annexe II

Tableau d'Estimation des coefficients:

Taux des flavonoïdes :

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	713,43434347	26,515007138	26,91	<,0001
TEMP(30,70)	25,856060608	13,257503569	1,95	0,0749
TIME(30,120)	-53,82575758	13,257503569	-4,06	0,0016
S/L (0,1,0,2)	228,91666667	13,257503569	17,27	<,0001
SOL(60,100)	40,1489899	13,257503569	3,03	0,0105
TEMP*TIME	-40,15151515	22,962669763	-1,75	0,1059
TEMP*S/L	-24,25	22,962669763	-1,06	0,3117
TIME*S/L	109,75	22,962669763	4,78	0,0004
TEMP*SOL	60,227272725	22,962669763	2,62	0,0223
TIME*SOL	21,969696975	22,962669763	0,96	0,3576
S/L *SOL	10,75	22,962669763	0,47	0,6481
TEMP*TEMP	-18,55808082	19,886255353	-0,93	0,3691
TIME*TIME	4,7146464542	19,886255353	0,24	0,8166
S/L *S/L	-16,83838386	19,886255353	-0,85	0,4137
SOL*SOL	61,305555542	19,886255353	3,08	0,0095

Bacillus

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	8,4033333333	0,9364569506	8,97	<,0001
TEMP(30,70)	0,1791666667	0,4682284753	0,38	0,7087
TIME(30,120)	-0,565	0,4682284753	-1,21	0,2508
S/L (0,1,0,2)	-0,125833333	0,4682284753	-0,27	0,7927
SOL(60,100)	-0,415	0,4682284753	-0,89	0,3929
TEMP*TIME	2,695	0,8109955088	3,32	0,0061
TEMP*S/L	2,5	0,8109955088	3,08	0,0095
TIME*S/L	-1,68	0,8109955088	-2,07	0,0605
TEMP*SOL	1,8775	0,8109955088	2,32	0,0391
TIME*SOL	1,855	0,8109955088	2,29	0,0411
S/L *SOL	-1,8025	0,8109955088	-2,22	0,0462
TEMP*TEMP	2,18875	0,702342713	3,12	0,0089
TIME*TIME	1,3875	0,702342713	1,98	0,0717
S/L *S/L	1,83375	0,702342713	2,61	0,0228
SOL*SOL	1,295	0,702342713	1,84	0,0900

Staphylococcus

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	11,856666667	0,5127050177	23,13	<,0001
TEMP(30,70)	-0,310833333	0,2563525089	-1,21	0,2486
TIME(30,120)	-0,115	0,2563525089	-0,45	0,6617

Annexe

S/L (0,1,0,2)	0,7866666667	0,2563525089	3,07	0,0097
SOL(60,100)	-0,4841666667	0,2563525089	-1,89	0,0833
TEMP*TIME	0,555	0,44401557	1,25	0,2351
TEMP*S/L	0,99	0,44401557	2,23	0,0456
TIME*S/L	0,545	0,44401557	1,23	0,2432
TEMP*SOL	0,6375	0,44401557	1,44	0,1766
TIME*SOL	1,43	0,44401557	3,22	0,0073
S/L *SOL	-0,205	0,44401557	-0,46	0,6526
TEMP*TEMP	-0,4658333333	0,3845287633	-1,21	0,2490
TIME*TIME	-0,7295833333	0,3845287633	-1,90	0,0821
S/L *S/L	-2,3720833333	0,3845287633	-6,17	<,0001
SOL*SOL	1,5866666667	0,3845287633	4,13	0,0014

Listeria

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	11,41	0,7524464728	15,16	<,0001
TEMP(30,70)	-0,0816666667	0,3762232364	-0,22	0,8318
TIME(30,120)	-0,8666666667	0,3762232364	-2,30	0,0399
S/L (0,1,0,2)	-0,9258333333	0,3762232364	-2,46	0,0300
SOL(60,100)	1,2491666667	0,3762232364	3,32	0,0061
TEMP*TIME	0,3725	0,6516377604	0,57	0,5781
TEMP*S/L	0,0475	0,6516377604	0,07	0,9431
TIME*S/L	-0,0875	0,6516377604	-0,13	0,8954
TEMP*SOL	0,64	0,6516377604	0,98	0,3454
TIME*SOL	-0,83	0,6516377604	-1,27	0,2269
S/L *SOL	-2,3425	0,6516377604	-3,59	0,0037
TEMP*TEMP	-1,3833333333	0,5643348546	-2,45	0,0305
TIME*TIME	-1,3383333333	0,5643348546	-2,37	0,0353
S/L *S/L	0,2654166667	0,5643348546	0,47	0,6466
SOL*SOL	0,5279166667	0,5643348546	0,94	0,3680

Pseudomonas

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	7,12	0,6929932058	10,27	<,0001
TEMP(30,70)	0,035	0,3464966029	0,10	0,9212
TIME(30,120)	0,2791666667	0,3464966029	0,81	0,4361
S/L (0,1,0,2)	0,0866666667	0,3464966029	0,25	0,8067
SOL(60,100)	0,1991666667	0,3464966029	0,57	0,5760
TEMP*TIME	-0,6125	0,6001497209	-1,02	0,3276
TEMP*S/L	-0,1675	0,6001497209	-0,28	0,7849
TIME*S/L	0,0875	0,6001497209	0,15	0,8865
TEMP*SOL	1,29	0,6001497209	2,15	0,0527
TIME*SOL	0,2775	0,6001497209	0,46	0,6521
S/L *SOL	0,67	0,6001497209	1,12	0,2861
TEMP*TEMP	0,33	0,5197449044	0,63	0,5374
TIME*TIME	0,05125	0,5197449044	0,10	0,9231
S/L *S/L	0,02	0,5197449044	0,04	0,9699
SOL*SOL	0,30375	0,5197449044	0,58	0,5698

Annexe

E-coli

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	7,6166666667	2,1577647256	3,53	0,0041
TEMP(30,70)	-0,2383333333	1,0788823628	-0,22	0,8289
TIME(30,120)	-0,495	1,0788823628	-0,46	0,6546
S/L (0,1,0,2)	0,1683333333	1,0788823628	0,16	0,8786
SOL(60,100)	0,0983333333	1,0788823628	0,09	0,9289
TEMP*TIME	2	1,8686790678	1,07	0,3056
TEMP*S/L	-0,9475	1,8686790678	-0,51	0,6213
TIME*S/L	-1,855	1,8686790678	-0,99	0,3405
TEMP*SOL	4,3725	1,8686790678	2,34	0,0374
TIME*SOL	2,28	1,8686790678	1,22	0,2459
S/L *SOL	1,0075	1,8686790678	0,54	0,5996
TEMP*TEMP	-1,560416667	1,6183235442	-0,96	0,3540
TIME*TIME	-3,517916667	1,6183235442	-2,17	0,0505
S/L *S/L	1,2095833333	1,6183235442	0,75	0,4692
SOL*SOL	-2,020416667	1,6183235442	-1,25	0,2357

Cladosporum

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	14,9033333333	1,7109460373	8,71	<,0001
TEMP(30,70)	-0,9666666667	0,8554730187	-1,13	0,2806
TIME(30,120)	-2,4325	0,8554730187	-2,84	0,0148
S/L (0,1,0,2)	0,5	0,8554730187	0,58	0,5697
SOL(60,100)	-3,889166667	0,8554730187	-4,55	0,0007
TEMP*TIME	1,0025	1,4817227328	0,68	0,5115
TEMP*S/L	0,8025	1,4817227328	0,54	0,5980
TIME*S/L	4,97	1,4817227328	3,35	0,0057
TEMP*SOL	-1,235	1,4817227328	-0,83	0,4208
TIME*SOL	-2,05	1,4817227328	-1,38	0,1917
S/L *SOL	1,3625	1,4817227328	0,92	0,3759
TEMP*TEMP	-1,80125	1,283209528	-1,40	0,1858
TIME*TIME	-2,63	1,283209528	-2,05	0,0629
S/L *S/L	-1,11375	1,283209528	-0,87	0,4025
SOL*SOL	-3,5075	1,283209528	-2,73	0,0182

Annexe

Aspergillus

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	15,226666667	1,6065053659	9,48	<,0001
TEMP(30,70)	-3,806666667	0,803252683	-4,74	0,0005
TIME(30,120)	0,604166667	0,803252683	0,75	0,4665
S/L (0,1,0,2)	-2,8625	0,803252683	-3,56	0,0039
SOL(60,100)	-1,943333333	0,803252683	-2,42	0,0324
TEMP*TIME	7,3875	1,3912744582	5,31	0,0002
TEMP*S/L	-2,4275	1,3912744582	-1,74	0,1065
TIME*S/L	-2,295	1,3912744582	-1,65	0,1249
TEMP*SOL	-3	1,3912744582	-2,16	0,0521
TIME*SOL	1,025	1,3912744582	0,74	0,4754
S/L *SOL	-2,785	1,3912744582	-2,00	0,0684
TEMP*TEMP	0,439166667	1,2048790244	0,36	0,7218
TIME*TIME	-1,279583333	1,2048790244	-1,06	0,3091
S/L *S/L	1,497916667	1,2048790244	1,24	0,2375
SOL*SOL	-6,030833333	1,2048790244	-5,01	0,0003

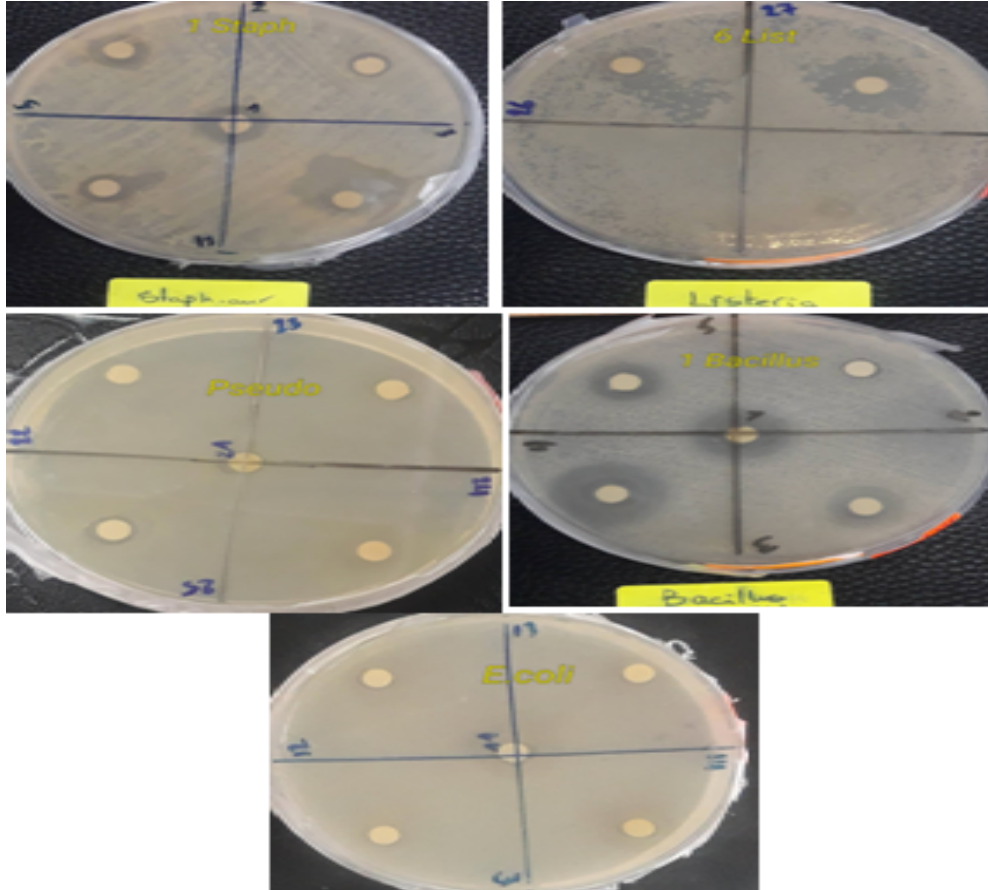
Botrytis

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.>t
Constante	14,733333333	0,9515463779	15,48	<,0001
TEMP(30,70)	-0,025833333	0,4757731889	-0,05	0,9576
TIME(30,120)	-0,941666667	0,4757731889	-1,98	0,0712
S/L (0,1,0,2)	0,071666667	0,4757731889	0,15	0,8828
SOL(60,100)	-0,039166667	0,4757731889	-0,08	0,9357
TEMP*TIME	0,525	0,8240633361	0,64	0,5360
TEMP*S/L	-0,945	0,8240633361	-1,15	0,2738
TIME*S/L	-1,3475	0,8240633361	-1,64	0,1280
TEMP*SOL	-0,2175	0,8240633361	-0,26	0,7963
TIME*SOL	0,6175	0,8240633361	0,75	0,4681
S/L *SOL	2,0575	0,8240633361	2,50	0,0281
TEMP*TEMP	0,232083333	0,7136597834	0,33	0,7506
TIME*TIME	-1,854166667	0,7136597834	-2,60	0,0233
S/L *S/L	-0,334166667	0,7136597834	-0,47	0,6480
SOL*SOL	-2,235416667	0,7136597834	-3,13	0,0087

Annexe

AnnexIII

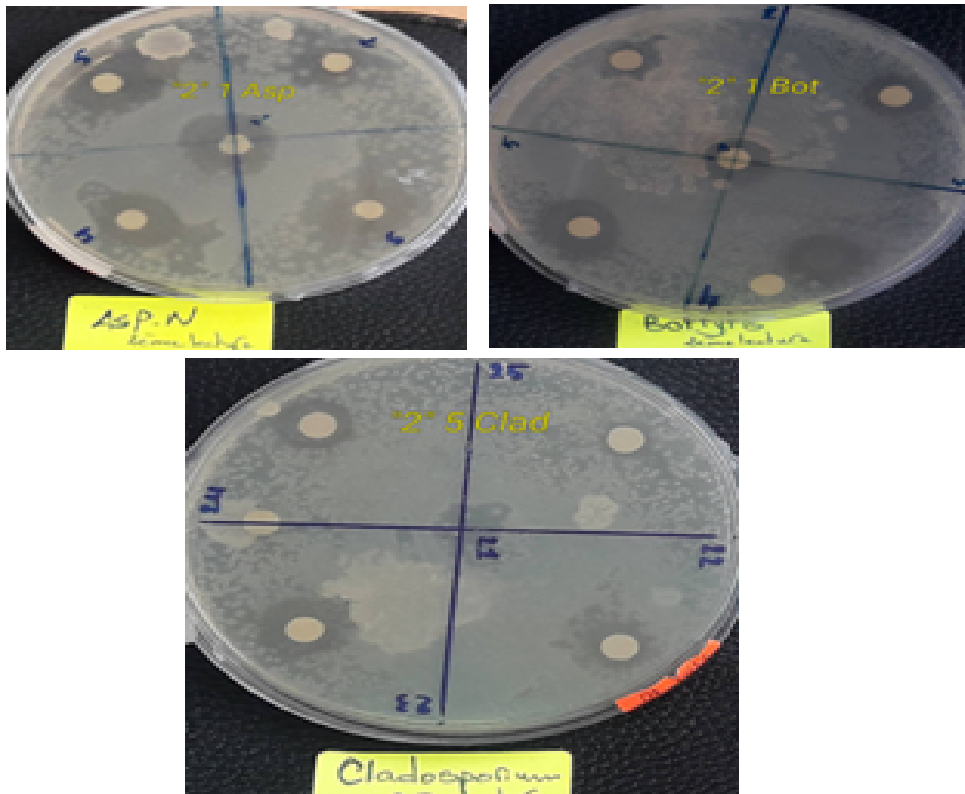
Résultats de certain activité anti Bactérienne vis-à-vis nos extrait



Annexe

AnnexIV

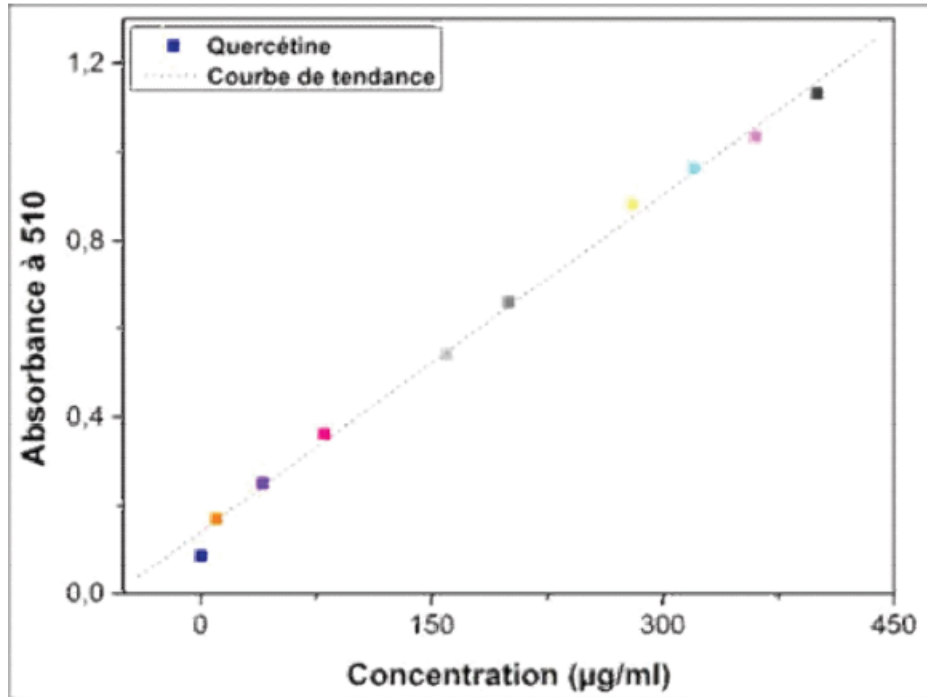
Résultats de certain activité anti fongique vis-à-vis nos extrait



Annexe

Annexe V :

Courbe d'étalonnage de quercétine



Diplôme de :
MASTER Académique en microbiologie appliqué

Thème : Optimisation de l'extraction des Flavonoïdes à activité antibactérienne et antifongique de *Pistacia lentiscus L*

Résumé :

Dans ce travail nous nous sommes intéressées par optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes à partir des fleurs de *Pistacia lentiscus* et étude de leur activité antibactérienne et antifongique récolté d'une région d'El hama Wilaya de kenchela. Cependant, la méthodologie de surface de réponse (RSM) a été utilisée pour optimiser les conditions du potentiel antimicrobienne et des flavonoïdes de la poudre des fleurs de *P.lentiscus* en utilisant quatre variables indépendantes: méthanol (60% ,80% et 100%), solvant / rapport d'échantillon (1/20,1/15,1/10)), température (30, 50 et 70 C°) et durée (30, 75 et 120 min).Les résultats obtenus révèlent que l'extrait méthanolique de fleurs de *P.lentiscus* possède une teneur faible en flavonoïdes (720 µg équivalent de quercétine/g). De plus, l'évaluation d'activité biologique d'extrait méthanolique de fleurs de *P.lentiscus* montre une bonne activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et une faible activité contre les bactéries à Gram négatif ainsi qu'une importante activité antifongique. Dans les conditions optimales étaient de 63.40% de méthanol aqueux, le rapport solvant / échantillon est de 1/18, la température est de 30 ° C et le temps d'extraction est de 50.28 min les valeurs maximal de teneur en flavonoïdes totaux et activité antibactériennes et antifongique étaient de 876.18 ±94 µg EQ /gMs et de 17.06, 12.93, 10.81, 7.90, 11.42, 10.30, 21.34 et 13.66, respectivement. Sur la base de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* représente une activité antimicrobienne intéressante

Mots clés : Pistacia lentiscus, Fleurs, Optimisation d'extraction, Flavonoïdes, Méthodologie de surface de réponse, Activité antimicrobienne

Devant le jury:

***Président : Dr Zeraib A.**

MCB univ. Khenchela.

***Examinatrice : M^{me}. Boutarfa S.**

MAA univ Khenchela.

***Promoteur: Mr. Rahal K.**

MAA univ.Khenchela.