

Mark-Bio-72/01

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

Faculté de Science de la Nature, de la Vie, de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

*Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme*

*de Master en Biologie*

**Option Biologie cellulaire et Moléculaire**

*Thème*

*Contribution à l'étude phytochimique et activité  
antioxydante des extraits, des huiles des fruits mûrs  
de Pistacia atlantica Desf et Pistacia lentiscus L*

*Soutenu le : 26 / 10 / 2010*

Présenté par :

**M<sup>lle</sup> BELYAGOUBI Fatima**

*Devant le jury composé de :*

<b>M<sup>me</sup> BELARBI M.</b>	Professeur à l'université de Tlemcen	<b>Présidente</b>
<b>Mr. BEGHDAD CM.</b>	Maître de conférences à l'université de Tlemcen	<b>Examinateur</b>
<b>M<sup>me</sup> BENHAMMOU N.</b>	Maître assistant à l'université de Tlemcen	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> ATIK BEKKARA F.</b>	Professeur à l'université de Tlemcen	<b>Encadreur</b>

*Année Universitaire 2010/2011*

# DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années d'études.

A mes très chers parents, en témoignage de leur amour, leur confiance et compréhension et leurs soutiens toute au long de ma vie et sans eux je ne serais jamais arrivée à ce niveau.

A mon très cher frère LARBI pour avoir été présents à mes cotés, de m'avoir guidé et m'orienté tout au long de tous mes épreuve de ma vie.

A mes frère ABDELKADER et AHMAD pour leurs présences de tous les instants, et leurs grandes responsabilités.

A ma très chère sœur RAHMA qui m'a aidé tout le temps par leurs conseils précieux et toutes les conditions morales pour tous qu'elle fait pour moi, je l'aime beaucoup.

A mes belles sœurs : Nabila et Souhila

A tous ceux qui sont chers, ma grand-mère et mon petit frère Youssef que dieu ait son âme (bénissent)

Je n'oublie jamais mes neveux : Imad Eddine et Youssef

A toute ma famille sans exception : oncles, cousins et cousines.

A mes amies : Meryem et Amel, je leur souhaite une vie pleine de réussite. Merci pour la solidarité et la gentillesse.

A tous les étudiants de la promotion de Master Microbiologie.

A toute personne qui m'a aidé de loin ou de près dans la réalisation de ce mémoire je dis Merci.

*Fatima*

# REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé à l'université ABOU-BEKR BELKAID, Tlemcen, Département de Biologie de la Faculté de Science de la Nature, de la Vie, de la Terre et de l'Univers, au laboratoire de Produits Naturels, sous la responsabilité de madame ATIK BEKKARA F.

Je remercie sincèrement M<sup>me</sup> ATIK BEKKARA F. Professeur à la faculté des sciences, département de biologie, l'université de Tlemcen. Qu'elle trouve ici l'expression ma profonde reconnaissance, tant pour avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

Je remercie infiniment M<sup>me</sup> BENHAMMOU N. Maitre assistante à la faculté des sciences, département de biologie, l'université de Tlemcen, pour sa présence, sa patience, ses précieux conseils et sa grande disponibilité, son aide ses encouragements et son infatigable dévouement tout au long de la réalisation de ce travail ainsi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier M<sup>me</sup> BELARBI M. Professeur à la faculté des sciences, département de biologie, l'université de Tlemcen, pour avoir mis à ma disposition son laboratoire et pour l'attention qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également à M<sup>f</sup>. BEGHADAD M. Maitre de conférence à la faculté des sciences, département de biologie, l'université de Tlemcen, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant d'être membre du jury.

Je remercie vivement M<sup>f</sup>. BELYAGOUBI L. Maitre assistant à l'université AMAR-TELIDJI Laghouat faculté des sciences département de biologie pour avoir ramenée les fruits et l'huile de *Pistacia lentiscus*.

M<sup>me</sup> BELASKRI A. Maitre assistante à l'université de Bel Abbas, je la remercie pour avoir ramenée les fruits de *Pistacia atlantica*.

M<sup>f</sup>. CHABANE SARI D. Professeur à la faculté des sciences, département de biologie, l'université de Tlemcen, je le remercie pour m'avoir permis de réaliser certaines expériences de cette étude dans son laboratoire.

J'adresse encore mes remerciements à tous les membres du laboratoire de Produits Naturels (LAPRONA) de l'université de Tlemcen, pour les aides techniques.

## المـلـخـص

من أجل تحسين و استغلال النباتات في جميع الميادين الصيدلانية الطبية و الزراعة الغذائية لقد اهتمنا بالدراسة الكيميائية لثمرات *Pistacia atlantica* هذا الصنف مع *Pistacia lentiscus* يلفت انتباه الكثير من الباحثين بسبب كثرة مميزاتهم الطبية على صحة الإنسان (ضد التأكسد, ضد الالتهاب, ضد القرحة).

أظهرت النتائج المحصل عليها ثراء الثمرات بأربعة عائلات وهي " الطانات , الفلافونويدات , الانطوسيانات, ثلاثي التربينات , ستيرول. أعطت مستخلصات المواد الأيدية مردود ملفت الانتباه في مستخلص الخام 13,9% أما نسبة مردود الزيت النباتي الثابت لـ *Pistacia atlantica* المستخلص بجهاز السوكسل فيقدر بـ 44,07%.

إن نسبة المكونات الفينولية مرتفعة في مستخلص الخام الميثانوليك للثمار بـ 38,06 مغ ما يعادل حمض الغاليكل للثمار الجافة بـ غ مقارنة بالنسبة الموجودة في الزيوت الثابت لـ *Pistacia atlantica* 0,017 مغ/غ و *Pistacia lentiscus* بـ 0,032 مغ/غ . في حين إن قيمة الطانات 10,34 مغ ما يعادل الكاوشين للثمار الجافة بـ غ وهي سائدة بالنسبة الفلافونويدات 3,38 مغ/غ.

بعد تطوير النشاط المضاد للتأكسد بطريقة واحدة و هي تثبيت الجدر الحر DPPH المعبر بنسبة يرتفع مع ارتفاع التركيز إذ نستخلص أن الطانات لهم نشاط قوي لتعديل DPPH بقيمة  $EC_{50} = 0,07$  مع لـ مل مقارنة مع باقي المستخلصات و المراجع الايجابية حمض أسكوربيك , طرلكس , BHT أن توزيع الأجزاء أسيطات ديتيل و بيطانوليك , الأنطوسيانات المستخلص الخام , الزيت الثابت لـ *Pistacia lentiscus* و لـ *Pistacia atlantica* أظهروا نشاط معتبر و معقول بـ 0,20 ; 0,50 ; 0,80 ; 1,43 ; 8,80 و 22,60 مع/مل ترتيباً.

الكلمات المفتاحية: *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* الدراسة الفيتوكيميائية , النشاط المضاد للتأكسد DPPH, الزيت الثابت, المركبات الفينولية.

# RESUME

Afin de valoriser et exploiter le patrimoine végétal dans plusieurs domaines pharmacologique, médical et agro-alimentaire, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et à l'activité biologique des fruits de *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus*. Ces deux espèces attirent l'attention de plusieurs chercheurs grâce à ces nombreuses vertus médicinales sur la santé humaine (anti-inflammatoire, antioxydante et anti-ulcéreuse...).

Dans les fruits 4 familles ont été révélés les tannins, les flavonoïdes, les anthocyanes et les triterpènes. Les extractions de ces métabolites montrent un rendement remarquable dans l'extrait brut (13,9 %). Alors, le rendement en huile fixe de *Pistacia atlantica* extraite par Soxhlet est de l'ordre de 44,07%.

La teneur en phénols totaux est élevée dans l'extrait brut des fruits (38,06 mg équivalent d'acide gallique/g de la plante sèche) en comparaison à celle trouvée dans les deux huiles de *Pistacia atlantica* (0,017 mg/g) et *Pistacia lentiscus* (0,032 mg/g). Alors, la teneur en tannins (10,34 mg équivalent de catéchine/g de la plante sèche) est dominante par rapport aux flavonoïdes (3,38 mg/g).

L'évaluation de l'activité antioxydante utilisant le piégeage du radical libre DPPH nous a montré que les tannins ont une bonne activité avec  $EC_{50}$  égale à 0,07 mg/ml par rapport aux autres extraits et aux témoins (acide ascorbique, trolox et BHT). En revanche, les fractions acétate d'éthyle et butanol, les anthocyanes, l'extrait brut, l'huile fixe du *Pistacia lentiscus* et celle du *Pistacia atlantica* révèlent une activité considérable à raison de 0,20 ; 0,50 ; 0,80 ; 1,43 ; 8,80 et 22,60 mg/ml respectivement.

**Mots clés :** *Pistacia atlantica*, *Pistacia lentiscus* ; étude phytochimique ; activité antioxydante, DPPH, huile fixe, composés phénoliques.

# Abstract

In order to develop and exploit the vegetable inheritance in several fields pharmacological, medical and agro-alimentary, we were interested in the phytochimic study and the biological activity of the fruits of *Pistacia atlantica* and *Pistacia lentiscus*. These two species draw the attention of several researchers for many medicinal virtues to health human (anti-inflammatory drug, antioxidant and anti-ulcerous...).

In the fruits, 4 families were revealed, the tannins, the flavonoids, the anthocyanins and the triterpenes. The extractions of these metabolites show a remarkable output in the crude extract (13,9%). Then, the oil yield of *Pistacia atlantica* extracted by Soxhlet is about 44,07%.

The phenolics content is high in the crude extract of the fruits (38,06 mg equivalent of gallic acid/g dry matter) in comparison with that found in two oils of *Pistacia atlantica* (0,017 mg/g) and *Pistacia lentiscus* (0,032 mg/g). Then, the tannins content (10,34 equivalent mg of catechin /g dry matter) is dominant compared to the flavonoids (3,38 mg/g).

The evaluation of the antioxidant activity using the scavenging capacity of free radical DPPH showed us that the tannins have a good activity with EC<sub>50</sub> equal to 0,07 mg/ml compared to the other extracts and controls (ascorbic acid, trolox and BHT). On the other hand, the ethyl acetate and butanol fractions, the anthocyanins, the crude extract, the oil of *Pistacia lentiscus* and that of *Pistacia atlantica* reveal a considerable activity at a rate of 0,20; 0,50; 0,80; 1,43; 8,80 and 22,60 mg/ml respectively.

**Key words:** *Pistacia atlantica*; *Pistacia lentiscus*; phytochimic study; antioxidant activity, DPPH, oil, phenolic compounds.

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Structure d'un phénol .....	7
<b>Figure 2 :</b> Structure générale du noyau des flavonoïdes (Gao <i>et al</i> , 1999) .....	7
<b>Figure 3 :</b> Carte géographique de la station de récolte du <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Pistacia lentiscus</i> ( El Bayadh ; EL Kala) (Encarta, 2009) .....	30
<b>Figure 4:</b> Schéma d'extraction des flavonoïdes (Bekkara <i>et al</i> , 1998).....	31
<b>Figure 5:</b> Rendements des extraits des composés phénoliques exprimés en pourcentage .....	41
<b>Figure 6:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux .....	42
<b>Figure 7 :</b> Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes .....	43
<b>Figure 8 :</b> Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des tannins.....	43
<b>Figure 9 :</b> Pourcentages d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut, la fraction acétate d'éthyle, la fraction butanolique, les tannins et les anthocyanes.....	46
<b>Figure 10 :</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations des contrôles positifs (acide ascorbique, BHT et le trolox).....	47
<b>Figure 11 :</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations d'huiles fixes de <i>Pistacia atlantica</i> (HFPA) et <i>Pistacia lentiscus</i> (HFPL) .....	48
<b>Figure 12:</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations de l'extrait brut (A), la fraction acétate d'éthyle (B), la fraction butylique (C), des tannins(E), Anthocyanes (E), l'huile fixe de <i>Pistacia atlantica</i> (F), l'huile fixe de <i>Pistacia lentiscus</i> (G) .....	49

# LISTES DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Taxonomie de <i>Pistacia atlantica</i> Desf et <i>Pistacia lentiscus</i> L (Quezel et Santa, 1963) .....	15
<b>Tableau 2</b> : Principaux radicaux libres oxygènes (Sies, 1993 ; Bartosz, 2003).....	20
<b>Tableau 3</b> : Résultats des tests phytochimiques.....	38
<b>Tableau 4</b> : Couleur des extraits des fruits mûrs du <i>Pistacia atlantica</i> .....	40
<b>Tableau 5</b> : Teneurs en phénols totaux, tannins, et flavonoïdes .....	44
<b>Tableau 6</b> : Teneurs en phénols totaux des huiles du <i>Pistacia</i> , d'arganier et d'olive .....	45
<b>Tableau 7</b> : Concentrations EC <sub>50</sub> des extraits des fruits mûres de <i>Pistacia atlantica</i> et des huiles du <i>Pistacia atlantica</i> et <i>Pistacia lentiscus</i> .....	50



# LISTES DES PHOTOS

<b>Photo 1:</b> <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	13
<b>Photo 2:</b> Fruits mûrs de <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	13
<b>Photo 3 :</b> <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	14
<b>Photo 4:</b> Extraction d'huile des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> Desf par Soxhlet.....	34
<b>Photo 5 :</b> Huiles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf (A) et <i>Pistacia lentiscus</i> L (B).....	40
<b>Photo 6 :</b> Piégeage du radical DPPH par les tannins .....	48

# ABREVIATIONS

$\text{AlCl}_3$ : chlorure d'aluminium

$\alpha$  : alpha

AND: acide désoxyribonucléique

$\beta$  : beta

BHA : butylhydroxyl anisole

BHT: butylhydroxyl toluène

$^{\circ}\text{C}$  : degré Celsius

cm: centimètre

$\text{EC}_{50}$  : (efficient concentration value) : concentration permettant d'inhiber 50% du radical

DO : densité optique

DPPH : 2,2 diphenyl-picryldrazyl

$\text{Fe}^{2+}$  : ions ferreux

$\text{Fe}^{3+}$  : ions ferrique

$\text{FeCl}_3$  : Chlorure de fer

g : gramme

h : heure

HCl : acide chlorhydrique

$\text{HgCl}_2$  : chlorure de mercure

$\text{H}_2\text{O}$  : eau distillée

$\text{I}_2$  : iode

KI : iode de potassium

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  : ferricyanure de potassium

Kg : kilogramme

M: molarité (mole/l)

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

MS : matière sèche

m/v : rapport masse par volume

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ : carbonate de sodium

$\text{NaNO}_2$ : nitrite de sodium

NaOH : soude (hydroxyde de sodium)

NH<sub>4</sub>OH : ammoniac

% : pourcentage

μl : microlitre

UV: Ultra-violet

ROS : espèces radicalaires oxygénés (Reactive oxygen species)

Sec: seconde

SOD: superoxyde dismutase

V/V : rapport volume par volume

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	2
--------------------	---

## *PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE*

### **CHAPITRE 1 : Généralités sur les métabolites primaires et secondaires**

1-Introduction.....	6
2-Métabolites primaires .....	6
3-Métabolites secondaires.....	6
4- Fonction et propriétés thérapeutiques des composés du métabolite primaire et secondaire ....	8

### **CHAPITRE 2 : Présentation des espèces végétales *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L**

1- Introduction.....	12
2- <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	12
3- <i>Pistacia lentiscus</i> L .....	13
4- Systématique du genre <i>Pistacia</i> .....	15
5- Propriétés et usage thérapeutique des deux plantes .....	15
6- Composition chimique des deux espèces végétales .....	16

### **CHAPITRE 3 : Radicaux libres et méthodes d'étude des propriétés antioxydant *in vitro***

1 -Introduction.....	19
2- Radicaux libres oxygénés .....	19
3-Moyen de défense.....	20
4- Quelques méthodes d'évaluation des propriétés antioxydants in vitro .....	23

# *PARTIE EXPERIMENTALE*

## **CHAPITRE 1 : Tests phytochimiques**

1- Introduction.....	26
2- Matériel végétal.....	26
3- Préparation des extraits.....	26
3.1- Amidon.....	26
3.2- Saponosides.....	27
3.3- Tannins.....	27
3.4- Alcaloïdes.....	27
3.5- Flavonoïdes.....	28
3.6- Tannins galliques et cathéchiq. ....	28
3.7- Composés réducteurs.....	28
3.8- Coumarines.....	28
3.9- Anthracénosides et anthocyanosides.....	39
3.9.1- Anthracénosides.....	39
3.9.2- Anthocyanosides.....	39
3.10- Stérols et triterpènes.....	39

## **CHAPITRE 2 : Extraction et dosage des composés phénoliques et des huiles**

1- Introduction.....	30
2- Préparation des extraits des fruits du <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	30
2.1- Extrait brut méthanolique.....	30
2.2- Extraction des Flavonoïdes.....	31
2.3- Extraction des tannins.....	32
2.4- Extractions des anthocyanes.....	32
3- Dosage des composés phénoliques dans les fruits du <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	32
3.1- Dosage des phénols totaux.....	32
3.2- Dosage des flavonoïdes dans les fruits du <i>Pistacia atlantica</i> .....	33
3.3- Dosage des tannins dans les fruits du <i>Pistacia atlantica</i> .....	33
4- Extraction d'huile des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> Desf.....	33
5- Extraction des composés phénoliques dans l'huile des deux plantes.....	34
6- Dosage des phénols totaux dans les huiles des deux plantes.....	34

# *Introduction générale*

# Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire, elles font partie de notre quotidien sans que nous le sachions.

De nos jours, cette utilisation traditionnelle pousse le domaine scientifique de la recherche à découvrir les principes actifs doués de fameuses activités biologiques grâce à plusieurs volets y compris la chimie, la biochimie et la physiologie afin d'identifier la structure chimique de ces substances et de cibler leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies et leurs propriétés thérapeutique et pharmacologique.

Parmi les constituants chimiques des plantes médicinales sont les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Le premier groupe est représenté par les sucres, les lipides (huiles fixes) et les protéines (**Bruneton, 1999**). Le deuxième groupe, est représenté par plusieurs familles à savoir les coumarines, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols et les flavonoïdes...

Parmi ces substances, les polyphénols restent une classe très intéressante puisque des études récentes ont montré leurs propriétés antioxydantes et ces capacités à prévenir le corps contre le stress oxydatif, le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Manach et al, 2004**).

*Pistacia lentiscus* est largement utilisée par la population locale dans la médecine traditionnelle comme antiulcéreux, anti-hypertension, dans le traitement d'eczéma, diarrhées, jaunisse, l'asthme, diurétiques et anti-inflammatoire. Tandis que, *Pistacia atlantica* est connue pour son activité antidiabétique et que son huile très énergétique est consommée avec les dattes. Ceci, nous a poussé à étudier l'activité antioxydante des extraits des fruits mûrs de *P. atlantica* et des huiles de *P. atlantica* et *P. lentiscus*.

Peu de travaux ont été réalisés sur la composition chimique de l'huile fixe des fruits de *Pistacia atlantica* et sur les propriétés antioxydantes des fruits et des huiles des deux *Pistacia* (**Yousfi et al, 2002; Yousfi et al, 2005; Benhassaini et al, 2007**).

Les travaux de **Benhammou et al (2007)**, **Benhammou et al (2008)**, **Benhammou et al (2009)** ont mis en évidence l'activité antioxydante des extraits bruts des feuilles de *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus*.

Ce travail est divisé en trois parties :

La première partie regroupe trois chapitres dont le premier concerne une synthèse bibliographique (Généralités sur les métabolites primaires (huile fixe) et secondaires).

Le chapitre 2 porte sur la présentation des espèces de *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* et quelques travaux antérieurs.

Les radicaux libres et les principales méthodes d'étude des propriétés antioxydantes *in vitro* sont illustrés dans le chapitre 3.

La démarche expérimentale est représentée dans la deuxième partie qui porte sur :

- Les tests photochimiques des fruits de *Pistacia atlantica* ;
- L'extraction des flavonoïdes, des tannins, des anthocyanes et de l'extrait brut des fruits du *Pistacia atlantica* ;
- L'extraction d'huile fixe de *Pistacia atlantica* ;
- Le dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins ;
- L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical DPPH.

La troisième partie consiste à interpréter et discuter les résultats obtenus.



# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- Les tannins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (acide gallique).
- Les tannins condensés ou proanthocyanidols (Tannins catéchiques) qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavonoïques constitués d'unités de flavan-3-ols (**Bruneton, 1999**).

### 3.1.3- Anthocyanes :

Ce sont des pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et des fruits. Ces pigments existent sous la forme d'hétérosides (Les anthocyanosides) et leurs génines (les anthocyanidols). Ils agissent comme signaux visuels pour attirer les pollinisateurs (**Bruneton, 1999**).

### 3.2- Terpènes et les stérols (les isoprénoides) :

Elaborés à partir des mêmes précurseurs le squalène qui est formé par la condensation des unités isoprènes ( $C_5H_8$ ), les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux et constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, ou 20 atomes de carbones (**Bruneton, 1999**).

## 4- Fonction et propriétés thérapeutiques des composés du métabolite primaire et secondaire :

Depuis des milliers d'années, les métabolites secondaires ont été employés par l'être humain dans plusieurs domaines en tant que colorants, saveurs (vanilline, capsaïcine), stimulants (caféine, nicotine, éphédrine), insecticides (nicotine, pipérine, pyréthrine), poisons des vertébrés et des humains (conline, strychnine, aconitine) et même agents thérapeutiques (atropine, quinine, cardenolides, codéine... etc.) (**Roberts et Wink, 1998**).

Au départ, ces composés ont été considérés comme des déchets ou métabolites autrement non fonctionnels de la plante. Alternativement, il a été montré depuis 110 ans par E. Stahl à Jena (Germany) que les métabolites secondaires jouent le rôle de défense contre les herbivores. Cette hypothèse a été confirmée pendant les dernières décennies par plusieurs

auteurs (**Swain, 1974; Maiti et al, 1982**) où ils ont regroupé les fonctions des métabolites secondaires dans les points suivants :

- La défense contre les herbivores (insectes, vertébrés) ;
- La défense contre les mycètes, les bactéries et les virus ;
- La défense contre d'autres plantes concurrençant pour la lumière, l'eau et les aliments ;
- Composés de signal pour attirer la pollinisation et par conséquence, la dispersion des pollens par les animaux.

Il existe une corrélation inverse entre la consommation de denrées d'origine végétale et l'incidence des cancers et des pathologies chroniques. Les nutriments d'origine végétale ou phytonutriments sont doués de nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques expliquant leurs bienfaits sur la santé de l'homme. Certains d'entre eux sont actifs par leur pouvoir antioxydant, d'autres, participent à la détoxification enzymatique des substances cancérigènes présentes dans l'organisme (**Derbel et Ghidira, 2005**).

Parmi les plus importants au plan pharmaco-toxicologiques, certains phytonutriments sont intéressants en prophylaxie des cancers et de différentes maladies notamment cardiovasculaire, ophtalmique et inflammatoire (**Derbel et Ghidira, 2005**). En ce qui concerne les tannins, leur intérêt médicinal réside essentiellement dans leur caractère astringent par lequel on explique leur propriétés vasculoprotectrices et cicatrisantes, leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, en créant ainsi une couche de coagulation isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur et d'arrêter les petits saignements (**Driss, 2002; Hennebelle et al, 2004**).

Les tannins sont doués d'un pouvoir antioxydant. C'est ainsi que les tannins hydrolysables inhibent la peroxydation des lipides (**Derbel et Ghidira, 2005**). Elles peuvent être toxiques aux bactéries, aux levures et aux champignons filamenteux (**Scalbert, 1991**).

Les décoctions et les autres préparations à base de drogues riches en tannins sont employées le plus souvent extérieurement contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive (**Driss, 2002**).

Pour les flavonoïdes qui sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons, ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de

modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculo-protectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti-tumorales significatives (**Batista *et al*, 1994 ; Driss, 2002**).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celle des flavonoïdes vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-oedémateuses. Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique « P » (**Bruneton, 1999**).

Les anthocyanes, leur plus grande spécificité est d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien, ils sont utilisés comme diurétiques et antiseptiques urinaires. (**Hennebelle *et al*, 2004**).

Les terpènes ont plusieurs activités biologiques en particulier les activités antimicrobienne et antifongique (**Chaurasia et Vyas, 1977; Batista *et al*, 1994; Tassou *et al*, 1995; Rana *et al*, 1997**).

## Présentation des espèces végétales : *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L

### 1-Introduction :

*Pistacia* L est un genre qui appartient à la famille des Anacardiacees ou Pistaciacees (Delazar *et al*, 2004). Il comprend 11 espèces qui sont des plantes dioïques dont la majorité est connue pour leur capacité à produire les oléorésines (Zohary, 1952 in Onay, 2000).

### 2-*Pistacia atlantica* Desf:

#### 2.1-Description botanique:

Le nom du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf) diffère d'une région à une autre ; elbetoum; botma; betouma ou btouma, bettam en Arabe local et Iggh en berbère, est un bel arbre à odeur simplement résineuse (Belhadj, 2001; Quezel et Santa, 1963) (Photo 1, 2).

Nom Latin : *Pistacia atlantica* Desf

Nom Français : Pistachier de l'Atlas.

Nom Arabe : btouma

Les feuilles sont caduques, composées, imparipennées; 3 à 5 folioles ovales acuminées et sont relativement grandes, elles rougissent à l'automne et tombent. Les fruits sont appelés Elkhodiri par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur vert foncé à maturité. Ce sont des drupes comestibles de la grosseur d'un pois, légèrement ovales et aplaties, riches en huile dense très énergétique, cette l'huile a un goût très proche de celui du beurre. Ils sont récoltés en septembre-octobre. L'écorce produit une résine-mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud (Belhadj, 2001).

La floraison a lieu en été en panicule de petites fleurs apétales (1 à 3) et 1 à 5 sépales. Elle peut atteindre 15 à 20 m de la hauteur dont la croissance est lente et ne produit qu'à partir de 5 à 7 ans (Ozbek, 1978 in Atli *et al*, 2001).

Il est associé au Jujubier (*Ziziphus lotus*; Cedra en arabe local), famille des Rhammacées, qui forme une brousse dégradée sous le pistachier de l'Atlas (Belhadj, 2001).



Photo 1: *Pistacia atlantica* Desf\*

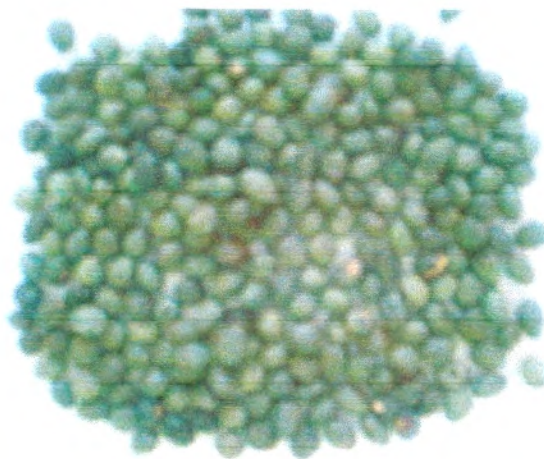


Photo 2: Fruits mûrs de *Pistacia atlantica* Desf

## 2.2-Habitat :

Le bétoum, son aire d'origine en Iran, mais il est réparti dans toute la région méditerranéenne. Il existe à l'état disséminé dans toute l'Algérie : régions semi-arides et arides, dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaad), Laghouat (partie sud) et Ghardaia (dans l'Oued M'zab) (Belhadj, 2001). Aussi, il préfère les rocailles, pâturages arides, sauf dans les zones très arrosées (Quezel et Santa, 1963).

## 3- *Pistacia lentiscus* L:

### 3.1-Description botanique:

Le lentisque ou pistachier lentisque ou arbre à mastic (*Pistacia lentiscus* L) ; « Derou », « Tadist » en arabe locale est en général un arbuste de 1 à 8 m de hauteur (Iauk et al, 1996).

Nom Latin : *Pistacia lentiscus* L.

Nom Français : Pistachier lentisque.

Nom Arabe : Derou.

Il se distingue des autres pistachiers par :

- ❖ Son feuillage persistant ;

---

\* : [www.google.com](http://www.google.com)

- ❖ Les feuilles, composées, sont paripennées, elles se terminent par une paire de folioles, tandis que celles des autres pistachiers se terminent par une seule foliole, elles sont caduques en hiver vert pale, plus grandes en général;
- ❖ Le rachis portant les folioles est ailé (**Photo 3**).

Les folioles, assez étroites et coriaces, sont ovales à elliptiques, terminées par une petite pointe. Leur nombre varie de 2 à 12.

Les fleurs sont apétales. Les males ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres, les femelles, à 3 ou 4 sépales ont un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates.

Le fruit est une petite drupe arrondie d'environ 5 mm. D'abord rouge, elle devient ensuite noire, la graine est identique aux pistachiers, mais beaucoup trop petite pour être consommée.

L'inflorescence en grappes composées lâches, aussi longues que les feuilles et la floraison a lieu pendant le mois mars à mai (**Quezel et Santa., 1963**).



**Photo 3** : *Pistacia lentiscus* L\*

### 3.2-Habitat :

On la rencontre dans les garrigues et surtout les maquis du bassin méditerranéen et les forêts (**Quezel et Santa, 1963**). Elle préfère les endroits pauvres en nutriments, en eau et aussi à une exposition longue des températures et des radiations solaires plus élevées (**Baratto et al, 2003**).

---

\* : [www.google.com](http://www.google.com)

#### 4- Systématique du genre *Pistacia* :

D'après **Quezel et Santa (1963)**, les espèces *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L sont classées comme suit :

**Tableau 1** : Taxonomie de *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L (**Quezel et Santa, 1963**).

Taxonomie	Espèce
Règne	Végétale
Sous règne	Tracheobionata – plantes vasculaires
Embranchement	Magnoliophyta ou Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliosida - Dicotylédones- Dialypétales, Disciflores
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales (Rutales)
Famille	Anacardiacees – térébinthacées
Genre	<i>Pistacia</i> L- pistache
Espèce	<i>Pistacia atlantica</i> Desf
	<i>Pistacia lentiscus</i> L

#### 5- Propriétés et usages thérapeutiques des deux plantes :

*Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique. Les qualités thérapeutiques de ces deux espèces sont connues depuis l'antiquité où les anciens égyptiens ont utilisé le mastic du *Pistacia lentiscus* pour l'embaumement (**De Pooter et Schamp, 1991**).

*P. lentiscus* et *P. atlantica* sont considérés comme deux espèces principales de la production d'oléorésine (**Delazar et al, 2004**). Cette résine est utilisée comme antiseptique du système respiratoire (**Duru et al, 2003**). Elle possède une activité anti-*Helicobacter pylori* et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcère de l'estomac et une activité antivirale contre certains virus dans l'embryon du poulet (**Kordali et al, 2003 ; Delazar et al, 2004**). L'oléorésine, cette substance purement économique est très utilisée depuis longtemps pour préparer le chewing gum en Iran (**Delazar et al, 2004**). Elle entre dans la fabrication des



dentifrices, des produits destinés au plombage des dents (**Duru et al, 2003**), en parfumerie pour fabriquer les déodorants, en cosmétique et comme un agent de saveur dans les préparations alimentaires (**Delazar et al, 2004**).

Les fruits et les feuilles du *P. atlantica* sont utilisés dans le domaine médicinal et l'écorce du *P. lentiscus* est employé dans le domaine aromatique et médicinal. Ces deux espèces possèdent des activités antioxydante et antimicrobienne (**Magiatis et al, 1999; Kordali et al, 2003 ; Benhammou et al, 2007; Benhammou et al, 2009**).

Concernant *Pistacia atlantica*, elle est caractérisée par son activité antidiabétique en inhibant significativement le  $\alpha$ -amylase chez les rats (**Hamdan et al, 2004**).

La partie aérienne de *P. lentiscus* est utilisée dans le traitement d'eczéma, diarrhées, paralysie, jaunisse, l'asthme, antipyrétique, diurétiques et anti-inflammatoire (**Duru et al, 2003; Gardeli et al, 2008**). Tandis que l'écorce est largement utilisée contre l'hypertension dans certaines régions d'Espagne (**Villar et al, 1987**). L'extrait aqueux des feuilles bloque la peroxydation lipidique du fer dans les foies des rats, mais l'administration à long terme devient hépatotoxique et induit la fibrose hépatique et une réponse inflammatoire (**Ljubuncic et al, 2005**).

La présence des stérols dans huile de *Pistacia* confère une valeur nutritive élevée puisqu'ils représentent les précurseurs de provitamine D et ils jouent un rôle important dans l'activité antioxydante en abaissant le cholestérol de sang (**Yousfi et al, 2002 ; Benhassaini et al, 2007**).

#### **6- Composition chimique des deux espèces végétales :**

Les plantes *P. lentiscus* L et *P. atlantica* sont très riches en quercétine-3- glucoside, quercétine-3- galactoside et la vicénine-2 sont plus ou moins dominants dans *P. atlantica* et le kaempférol-3-glucoside et la quercétine-3- rutinoside ont été trouvée sous forme de traces dans les deux espèces (**Kawashty et al, 2000**).

**Romani et al (2002)** ont identifié chez *P. lentiscus* trois classes de métabolites secondaires qui sont l'acide gallique et les dérivés galloyl du sucre et d'acide quinique ; les glycosides de flavonols par exemple les glycosides de myricétine et de quercétine ; les

anthocyanes nommés delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-glucoside et des quantités minimales de catéchine.

Les flavonoïdes et les tannins chez *P. lentiscus* trouvés par **Nagao et al (1999)** ont montré leur capacité antioxydante à inhiber l'oxydase xanthine. L'acide gallique et ses dérivés polygalloyl sont responsables à piéger les radicaux libres chez les deux pistachiers (**Baratto et al, 2003**). L'huile essentielle de cette espèce est caractérisée par une haute fraction oxygénée en plein floraison (**Gardeli et al, 2008**). Notant que, les principaux constituants sont le  $\alpha$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène et terpinene-4-ol (**Ben Douissa et al, 2005; Longo et al, 2007**).

Les fruits du *P. atlantica* est riche en protéine, phytostérol (campestérol, stigmaserol,  $\beta$ -sitosolérol (87%)) et acides gras insaturés (oléiques + linoléique =73%); oléiques (46%) et linoléique (27.5%). Les acides gras restants sont saturés (palmitique+stéarique = 25,8%) (**Yousfi et al, 2002 ; Benhassaini et al, 2007**).

Les principaux constituants de l'huile essentielle de *P. atlantica* sont les terpénoïdes en grand quantités,  $\alpha$ - pinène (70%),  $\beta$ - pinène (1,94 %), 3-carene (0,2 %), carveol (2,18 %), epoxy-pinène (2,15%), oxyde de limonène (9%), myrtenol (5,13 %), limonène (0,62 %),  $\alpha$ -phellandrene (0,2 %), citrique (5,72 %), et  $\beta$ -myrcène (0,3 %).

# Chapitre 3

**Radicaux libres et méthodes d'étude des propriétés  
antioxydant *in vitro***

## **Radicaux libres et méthodes d'étude des propriétés antioxydant *in vitro***

### **1-Introduction :**

L'oxydation d'une molécule correspond à la perte d'un électron et nécessite une deuxième molécule capable d'accepter cet électron. Chaque molécule constitue un demi-couple de la réaction d'oxydoréduction (**Virot, 2004**).

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaire parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques appelés les radicaux libres organiques (**Lesgards, 2000**).

### **2-Radicaux libres oxygénés :**

Les radicaux libres oxygénés (ROS) sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libres(s) non apparié(s) sur leurs couche externes qui vont chercher par l'oxydation à compléter la couche électronique externe de l'oxygène pour tendre vers une forme plus stable (**Van Antwerpen, 2006**).

Ces espèces radicalaires très instables et très réactives dont la durée de vie est très brève sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (métabolisme physiologique et cellulaire) (**Fulbert et Cals, 1992**).

Les radicaux libres oxygènes (ROS) échappent aux défenses antioxydantes de la cellule modifient les composants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides) ce qui provoque un stress oxydatif et un dysfonctionnement catalytique de l'ensemble de la cellule (**Wolfe et al, 1994**).

**Tableau 2 : Principaux radicaux libres oxygénés (Sies, 1993; Bartosz, 2003) :**

Nom	Formule	Temps de demi-vie (sec)
<b>Espèces radicalaires</b>		
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Elimination enzymatique
Radical hydroxyle	$\bullet OH$	$10^{-9}$
Radical peroxyde	$ROO^{\bullet}$	
Radical alkoxyde	$RO^{\bullet}$	$10^{-6}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$	$10^{-10}$
<b>Espèces non radicalaires</b>		
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	Elimination enzymatique
Acide hypochlorique	$HClO$	Dépendant du pH
peroxynitrite	$ONOO^{\bullet}$	0,05-1
Oxygène singulet	$^1O_2$	

Les ROS sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheim ou maladie parkinson (Favier, 2003), l'apoptose, les maladies neurodégénérative, pulmonaires, cardiovasculaires et les inflammations chroniques (Halliwell et Gutteridge, 1990).

### 3- Moyen de défense :

Un antioxydant est toute substances présente à une concentration inférieure à celle de substance oxydable susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge 1999), ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec des radicaux libres bien déterminés. Ces antioxydants constituant trois lignes de défense : les défenses endogènes (antioxydant enzymatiques), les défenses antioxydantes non enzymatiques, les défenses exogènes (antioxydant thérapeutiques) (Van Antwerpen, 2006).

#### 3.1-Moyens de défense endogène :

Ce ligne de défense est constitué principalement de trois enzymes. Il s'agit du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GSH-PX).

### 3.1.1- Superoxyde dismutase :

Comme l'indique son nom, le superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction ci-dessous en exerçant ainsi une action cellulaire protectrice (Marfak, 2003).



### 3.1.2- Catalase :

La catalase est une enzyme à cofacteur fer, présente dans tous les tissus avec une plus forte proportion dans le foie et les globules rouges, les peroxysomes hépatiques (Favier, 2003; Van Antwerpen, 2006). Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Marfak, 2003)

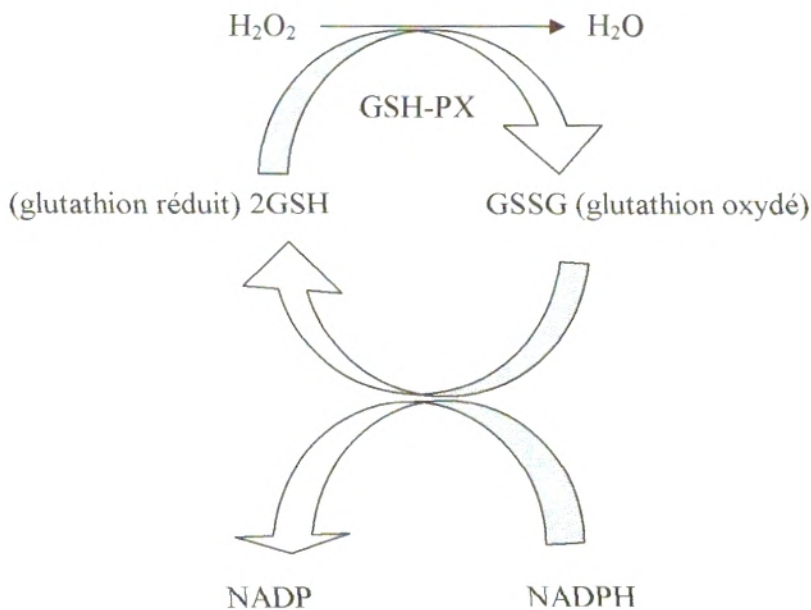


### 3.1.3-Glutathion peroxydase :

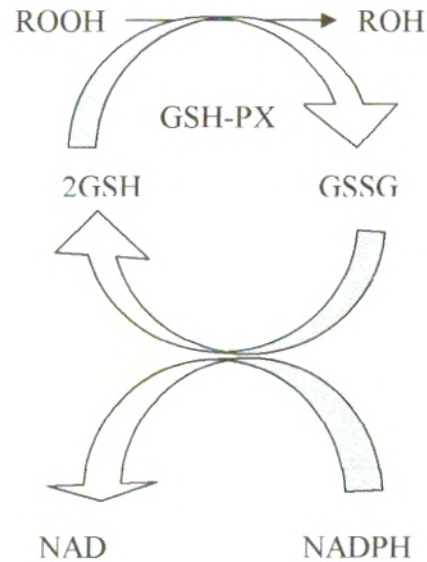
Les Glutathion peroxydases (GSH-PX) sont des enzymes à cofacteur sélénium. Elles existent dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car ont des rôles la réduction d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (Van Antwerpen, 2006; Favier, 2003; Marfak, 2003).

Le glutathion oxydé est alors régénéré par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons.

-le peroxyde d'hydrogène :



- les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides:



### 3.2-Moyen de défense exogène:

De nombreuses molécules issues de notre alimentation (vitamines, nutriments, composés naturels,...) sont considérés comme des antioxydants, soit par leur action directe, soit par le biais d'enzymes qui en dépendent. Ils interagissent et se régèrent mutuellement. Les plus courants : la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (ascorbique), Q (ubiquinone) ou les caroténoïdes, le sélénium et les flavonoïdes (**Van Antwerpen; 2006 ; Zazzo, 2002; Virot, 2004**).

#### 3.2.1- Caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments jaune à rouge, liposoluble, présents dans les membranes biologiques de nombreux végétaux, bactéries ou espèces animales (**Van Antwerpen, 2006; Virot, 2004**). Ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, (**Milane, 2004**), les principaux caroténoïdes : l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène... (**Van Antwerpen, 2006**). Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet (**Biesalski et al, 1996**). D'après **Burton et Ingold (1984)**, l'effet antioxydant du Bêta- carotène serait du à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur.

### 3.2.2- Vitamine E :

L'alpha tocophérol est une molécule liposoluble qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celle du réticulum endoplasmique. C'est un puissant antioxydant en inhibant la peroxydation lipidique (stoppe la propagation radicalaire: cède un e<sup>-</sup>).



Il intervient dans l'inhibition de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux. HNO<sub>2</sub> ainsi transformé ne peut plus réagir avec les fonctions amides des molécules pour donner des nitrosamides (Milane, 2004).

### 3.2.3- Vitamine C :

C'est une molécule hydrosoluble, présente dans l'organisme sous forme d'ascorbate et sa déficience, donnant lieu au scorbut (Van Antwerpen, 2006). Il est capable de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxyles, perhydroxyles et peroxydes (Virot, 2004). Son effet protecteur ou activateur face à la toxicité de l'oxygène est en relation étroite avec le pH du milieu. Il inhibe la peroxydation lipidique et joue un rôle dans le recyclage de la vitamine E (Tanaka *et al*, 1997).



### 3.2.4- Sélénium :

Il est présent dans le site actif du glutathion peroxydase. Il protège les cellules de l'oxydation et il est nécessaire pour le métabolisme de l'iode (Van Antwerpen, 2006).

### 3.2.5- Flavonoïdes :

A cause de leurs faibles potentiels redox (Van Acker *et al*, 1996), les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène. Ils sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques, des inhibiteurs des enzymes oxydatives et des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Brown *et al*, 1998 ; Hansaki *et al*, 1994 ; Marfak, 2003).

## 4- Quelques méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :

Actuellement, une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible. Ces techniques différentes entre eux en termes de mécanismes de réaction. (Magalhaes *et al*, 2008). Elles sont classifiées en deux groupes : le



premier est d'évaluer la peroxydation lipidique en mesurant le degré d'inhibition de l'oxydation, et le deuxième est mesuré les capacités à piéger un radical libre (Sanchez, 2002).

Nous citons deux méthodes où il intervient deux mécanismes différents :

#### 4.1- Méthode du piégeage du radical libre DPPH :

Le 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>\*</sup>) est un radical stable et présente une absorption spécifique à 517 nm qui lui confère une couleur violette. Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux, sa couleur disparaît et devient jaune. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Ce dernier est réduit à la forme hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'activité antiradicalaire est déterminée par la mesure de l'absorbance à 515nm. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition du DPPH (Sanchez, 2002).

#### 4.2- Méthode du pouvoir réducteur :

Ce test est un essai rapide et directe qu'on l'emploi principalement pour mesurer les possibilités et la puissance des antioxydants non enzymatiques. A pH neutre, il dépend de la réduction du ferricyanide ( $Fe^{3+}$ ) au ferrocyanide ( $Fe^{2+}$ ) qui donne en présence du fer ferrique une coloration bleue prussienne détectable par spectrophotométrie en mesurant le changement d'absorption à 700 nm (Oyaizu, 1986).

# *Partie expérimentale*

# CHAPITRE 1 : Tests phytochimiques

## 1-Introduction :

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques essentiellement les composés phénoliques, les saponosides, les alcaloïdes, les isoprénoides qui renferment les stéroïdes et les terpénoides, l'amidon et les composés réducteurs.

Ces tests phytochimiques sont basés sur :

- les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente : l'eau, l'éthanol, chloroforme.
- des réactions de colorations et de précipitations
- l'examen sous la lumière ultraviolette comme les coumarines

## 2-Matériel végétal :

Cette étude est réalisée sur les fruits mûrs verts du *Pistacia atlantica* qui ont été récoltés d'El Bayad pendant le mois de septembre 2007. Après séchage à l'obscurité, les fruits ont été mis dans l'étuve à 40°C pendant 48 h puis réduits en poudre à l'aide d'un mortier.

## 3-Préparation des extraits :

Deux solvants sont utilisés : l'eau et l'éthanol.

- ❖ **épuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud** : dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, 10g du matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests : Amidon, saponosides et tannins. Ces tests sont réalisés deux fois pour vérifier la reproductibilité des résultats.
- ❖ **épuisement du matériel végétal avec l'éthanol** : dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests.

### 3.1- Amidon :

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom de réactif d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :

- Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium;
- Chauffer pendant 5 min; Diluer jusqu'à 500 ml.

La détection de l'amidon s'effectue comme suit :

Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de Na Cl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition; ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue- violacée (**Bruneton, 1999**).

### 3.2- Saponosides :

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

### 3.3- Tannins :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée (1%).

L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tannins (**Trease et Evans, 1987**).

### 3.4- Alcaloïdes :

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés

- Réactif de Mayer : 5g de KI et 1,358 g de  $\text{HgCl}_2$  solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.
- Réactif de Wagner : 2g de KI et 1,27g d' $\text{I}_2$  solubilisés dans 100ml d'eau distillée.

❖ Sur l'extrait méthanolique :

0,5 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml, ajouter 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué au 1/10 (10 ml). Agitation et macération pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire.

Filtration sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat.

1 ml de filtre + 5 gouttes du réactif de Mayer s'il apparaît un précipité blanc- jaunâtre c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.

1 ml de filtre + 5 gouttes du réactif de Wagner s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (**Paris et al, 1969**).

❖ Sur l'extrait aqueux :

Dans un bain -marie on mélange 0,2 ml de l'extrait aqueux avec 5 ml d'une solution aqueuse de HCL préparée à 1% (en utilisant un agitateur avec barreau magnétique)

Après filtration un volume de 1 ml du filtrat est traité par 3 gouttes du tétra-iodo-mercurate de potassium connu sous le nom du réactif de Mayer, alors que l'autre quantité (1ml) est traitée par le réactif de Wagner.

Toute turbidité ou précipitation indique la présence des alcaloïdes (**Harborne, 1973**)

### 3.5- Flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 2, 5 ml de l'extrait éthanolique avec 0,5 ml d'HCL concentré et 0,25 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 min (**Earnsworth, 1974**).

### 3.6- Tannins galliques et cathéchiques :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> diluée (1%). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (Tannins galliques), verte ou bleue-verte (Tannins cathéchiques) (**Trease et Evans, 1987**).

### 3.7- Composés réducteurs :

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fechling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

### 3.8- Coumarines :

Placer 1g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques min. Ajouter 0,5ml de NH<sub>4</sub>OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

### 3.9- Anthracénosides et anthocyanosides :

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- Ajouter 9 ml d'HCL (10%) à 15 ml de l'extrait éthanolique ;
- Porter l'ensemble à reflux pendant 30 min ;
- Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 9 ml d'éther ;

Ensuite, chacune de ces familles est détectée séparément (**Paris et Moyse, 1969**)

#### 3.9.1- Anthracénosides :

La détection des anthracénosides consiste à traiter 2 ml de la solution extractive étherique avec la réaction de **Bornträger**. En milieu alcalin aqueux ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), ces composés donnent à la solution une teinte vive variant de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé, ceci indique la présence des anthracénosides.

#### 3.9.2- Anthocyanosides :

Doser la solution aqueuse acide avec une solution NaOH (10 %). S'il y a un virage de couleur à pH différent, la présence des anthocyanosides est confirmée.

L'apparition d'une couleur rouge à  $\text{PH} < 3$  et bleue entre 4 et 6, caractérise les anthocyanosides

### 3.10- Stérols et triterpènes :

Deux essais ont été effectués :

❖ Essai 01 : test pour les stérols et stéroïdes

10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer ; après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre.

Ensuite mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique; ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré; Agiter, puis laisser la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert

(Maximum d'intensité en 30 min à  $21^\circ\text{C}$ ) (**Trease et Evans, 1987**).

❖ Essai 02 : test pour les hétérosides stéroïdique et tri terpénique

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml ; en suite dissoudre le résidu obtenu dans 5 ml / 5 ml (v/v) d'anhydride acétique /chloroforme, puis filtrer; et en fins traiter le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (la réaction de Liebermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et vertes-violettes, elle indique la présence des hétérosides stéroïdique et tri terpénique respectivement (**Trease et Evans, 1987**).

## CHAPITRE 2 : Extraction et dosages des composés phénoliques, et d'huiles fixes

### 1-Introduction :

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques, d'huile et les dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins ont été effectués sur les fruits du *P. atlantica*. Alors, l'huile du *P. lentiscus* a été achetée d'El Kala où la récolte des fruits mûrs et noirs est réalisée durant les mois d'octobre et novembre 2009.



Figure 3 : Carte géographique de la station de récolte du *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* (● El Bayadh ; ● EL Kala) (Encarta, 2009).

### 2- Préparation les extraits des fruits du *P. atlantica* Desf :

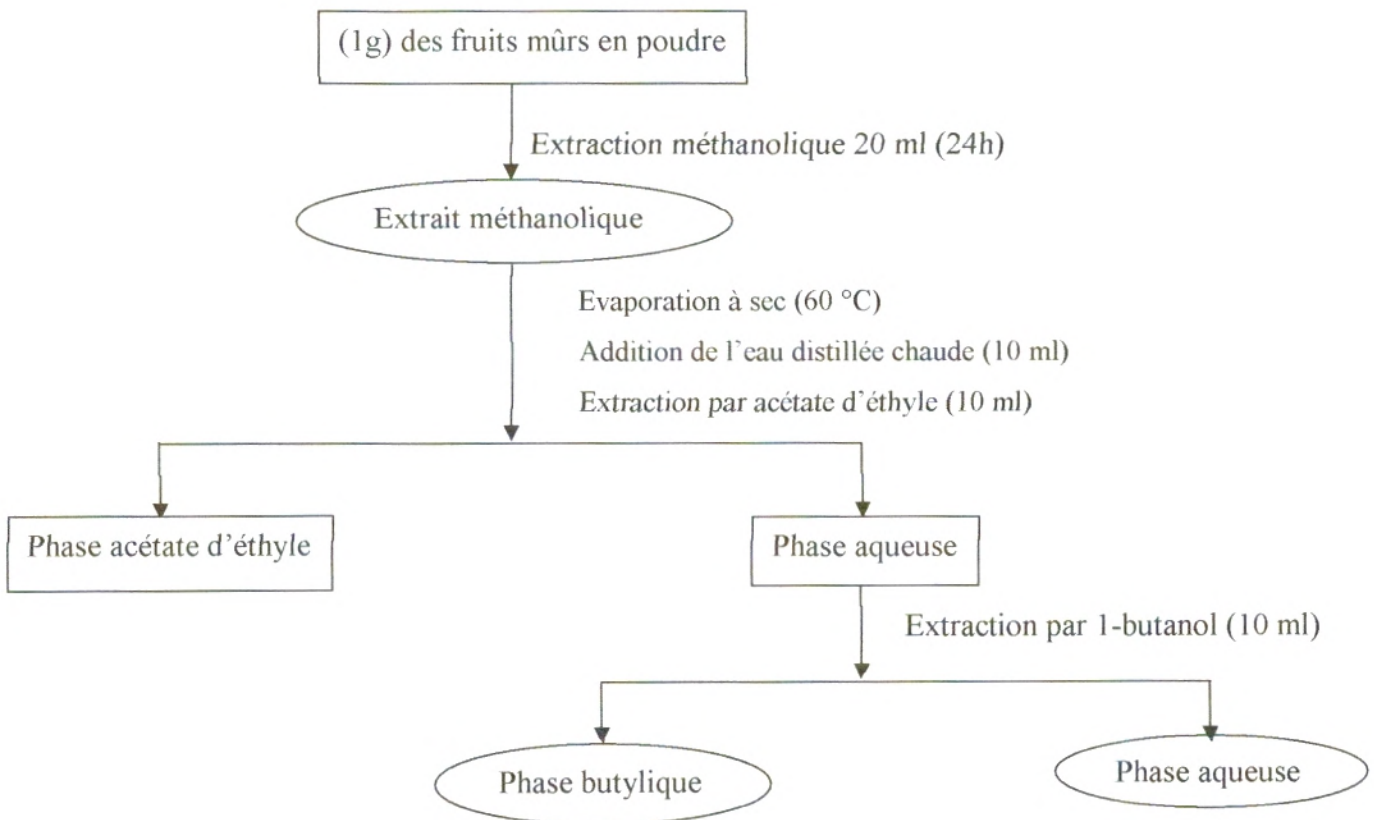
#### 2.1-Extrait brut méthanolique:

La poudre (1 g) de fruits mûrs du *P. atlantica* est placée dans un erlenemeyer dans 20 ml du méthanol pendant 24 h. Après filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C par un rotavapeur type Buchi R-200. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml du méthanol.

## 2.2- Extractions des flavonoïdes :

L'extraction des flavonoïdes des fruits mûrs du *P.atlantica* est réalisée par la méthode de **Bekkara et al, 1998** « Fractions d'acétate d'éthyle et butanolique » :

1g des fruits mûrs sec et broyé est mis en contact avec 20 ml de méthanol pendant 24h. L'extrait méthanolique récupéré est ensuite évaporé à sec ( $T = 60^{\circ}\text{C}$ ) par un rotavapeur type Buchi R-200. Le résidu sec obtenu est partagé entre 10 ml d'acétate d'éthyle et 10 ml d'eau distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 2 ml du méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 10 ml du 1-butanol. La phase butanolique est séchée au rotavapeur à  $60^{\circ}\text{C}$ . Le résidu sec pesé est repris par 2 ml du méthanol (**Figure 5**).



**Figure 4 :** Schéma d'extraction des flavonoïdes (**Bekkara et al, 1998**)



### 2.3- Extractions des tannins:

L'extraction des tannins des fruits mûrs du *P. atlantica* est obtenue en suivant la méthode de **Zhang et al (2008)**. Les broyats des fruits (2,5g) ont été extraits par 50 ml du mélange acétone/ eau distillée (35/ 15 ; V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type Buchi R-200 pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 15 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite une fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique obtenue est évaporée à sec à 40°C par un rotavapeur type Buchi R-200 puis pesé et repris par 3 ml du méthanol.

### 2.4- Extraction des anthocyanes :

L'extraction des anthocyanes des fruits mûrs du *P. atlantica* est réalisée par la méthode du **Longo et al (2007)**. Une quantité de 2,5 g des fruits mûrs secs et broyés a été extraite par 12,5 ml du mélange HCl/méthanol à (1%) (V/V) pendant 20 h à la température ambiante. Après filtration, le résidu est lavé par 12,5 ml de HCl/méthanol (0,1%). Les filtrats obtenus ont été combinés et séchés dans l'évaporateur rotatif à 30°C. Le résidu sec pesé est repris par 3 ml du méthanol.

## 3-Dosage des composés phénoliques dans les fruits du *Pistacia atlantica* Desf :

### 3.1-Dosage des phénols totaux :

Les quantités des phénols totaux dans les extraits méthanoliques (des fruits du *P. atlantica*) sont déterminées par la procédure du « (Folin Ciocalteu) » (**Singleton et Rossi, 1965**). Une quantité de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway 6405 UV/ Vis. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique 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 en appliquant la formule suivante donnée par Folin (1927).

$$C = (c \times v) / m$$

Ou : **C** : représente la teneur en phénols totaux en mg d'acide gallique /g de la matière sèche.

**c** : c'est la concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**v** : le volume de l'extrait méthanolique ; **m** : le poids pur de la matière sèche (g).

### 3.2-Dosage des flavonoïdes dans les fruits du *Pistacia atlantica* :

La teneur en flavonoïdes est déterminée en utilisant la technique de **Zhishen et al (1999)**. Une quantité de 500 µl de solutions méthanoliques de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique convenablement dilués est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de la plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche. Chaque échantillon est répété trois fois.

### 3.3-Dosage des tannins dans les fruits du *Pistacia atlantica* :

Les quantités des tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode de vanilline (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) puis mélangé le contenu à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laisser réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre le blanc. La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage.

### 4-Extraction d'huile des fruits de *Pistacia atlantica* Desf:

L'huile du *P. atlantica* a été extraite selon la méthode décrite par **ISO 659 (1988)**. Une quantité de 10 g des fruits mûrs secs et broyés est extraite à 250 ml de l'hexane dans un Soxhlet (**Photo 4**). La durée de l'extraction faite en continu est pendant 8 h. Le recyclage de l'hexane à l'évaporateur rotatif au 40°C permet de débarrasser de toute trace d'hexane et de récupérer l'huile. Cette dernière refroidie et pesée pour calculer le rendement. Cette extraction est répétée quatre fois.



**Photo 4:** Extraction d'huile des fruits de *Pistacia atlantica* Desf par Soxhlet

L'extraction d'huile fixe des fruits de *P. lentiscus* est faite par une méthode traditionnelle par la population locale d'El Kala (voir le protocole dans l'annexe).

#### **5- Extraction des composés phénoliques dans l'huile des deux plantes :**

La méthode appliquée pour extraire les composés phénoliques des deux huiles du *P. atlantica* et *P. lentiscus* est celle de l'extraction liquide- liquide selon **Piris et al (2000)**.

Une quantité de 2 g d'huile a été solubilisée avec 1 ml de l'hexane et 2 ml du mélange méthanol/eau (V/V : 3/2) dans un tube à centrifuger. L'ensemble est agité par vortex pendant 2 min. Le volume total subit une séparation par centrifugation à 3000 tour pendant 10 min. Après l'élimination de la phase de l'hexane (le surnageant), la phase méthanolique (le culot) va subir deux extractions successives à fin d'extraire le maximum des composés phénoliques, tout en répétant le processus de centrifugation. Les parties résiduelles méthanoliques récupérées sont lavées deux fois avec 2 ml de l'hexane. Après la séparation, les solutions méthanoliques ont été évaporées à sec sous pression réduite à température de 35°C. Les résidus secs pesés sont repris par 2 ml du méthanol.

#### **6-Dosage des phénols totaux dans l'huile des deux plantes :**

L'extraction des composés phénoliques à partir de l'huile du *P. atlantica* et *P. lentiscus* est suivie par un dosage spectrophotométrique en utilisant la méthode précédente de **Folin Ciocalteu**.

## CHAPITRE 3 : Etude du pouvoir antioxydant

### 1- Introduction :

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel (Charfi, 1996). Les extraits sont utilisés pour évaluer leur pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical DPPH.

### 2- Piégeage du radical DPPH dans les extraits des fruits du *Pistacia atlantica* Desf :

L'effet de l'extrait sur le 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est mesuré par la procédure décrite par Sanchez et ses collaborateurs (1998). Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait exprimées en mg/ ml est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 min d'incubation à la température ambiante.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH<sup>•</sup> sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{Echantillon}}) / DO_{\text{témoin}}] \times 100$$

Où :

DO<sub>témoin</sub> : représente l'absorbance du contrôle sans extrait après 30 min.

DO<sub>Echantillon</sub> : représente l'absorbance en présence d'extrait après 30 min.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficient concentration value : EC<sub>50</sub>). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50 %.

### 3-Piégeage du radical DPPH dans les huiles du *Pistacia atlantica* Desf et *Pistacia lentiscus* L :

Les donateurs d'hydrogène dans huiles végétales ont été examinés par la réduction du DPPH dans le toluène selon Ramadan *et al* (2003). Notant que, le toluène est un solvant capable de solubiliser le DPPH et l'huile en même temps.

La solution de toluène du radical DPPH a été fraîchement préparée à une concentration de  $10^{-4}$  M. Elle était stable pour plus de 2 h. Un volume de 100  $\mu$ l d'huile dans le toluène de différentes concentrations exprimées en mg/ ml a été mélangé à 390  $\mu$ l de la solution DPPH dans le toluène ( $10^{-4}$ M). Le mélange est vortexé pour 10 secs à la température ambiante puis incubé durant 30 min. La diminution de l'absorption est mesurée à 515 nm contre le blanc (100  $\mu$ l d'huile solubilisée dans le toluène est additionné à 390  $\mu$ l du toluène pur sans DPPH). Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH par huiles végétales sont calculés à partir de la formule précédente.

La variation des pourcentages d'inhibition obtenus par la formule précédente en fonction des concentrations des huiles végétales nous a permis de calculer la concentration  $EC_{50}$ .

#### **4- Analyse statistique:**

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante. Les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne  $\pm$  l'écart-type. Le coefficient de corrélation de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origin 6 et l'Excel 2003.

# Résultats et discussion

## CHAPITRE 1 : Tests phytochimiques

### 1- Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques réalisés sur les fruits mûrs du *P. atlantica* ont permis de mettre en évidence les différentes familles de composés par des réactions qualitatives de caractérisation.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Résultats des tests phytochimiques.

Les extraits	Espèce étudiée	<i>P. atlantica</i>
	Partie étudiée de la plante	Fruits
Extrait aqueux	Familles chimiques	
	Amidon	-
	<b>Tannins</b>	+++
	Saponosides	-
Extrait méthanolique	Alcaloïdes	-
	<b>Flavonoïdes</b>	+++
	Tannins catéchiques	+++
	Alcaloïdes	-
	Composés réducteurs	-
	Coumarines	-
	<b>Anthracénosides</b>	+++
	<b>Anthocynosides</b>	+++
Stérols et stéroïdes	++	
<b>Hétérosides triterpéniques</b>	+++	

(+) : Présence en faible quantité ;

(++) : Présence en quantité moyenne ;

(+++ ) : Présence en forte quantité ;

(-) : Absence.

Le tableau 3 révèle la dominance des 5 familles dans les fruits mûrs du *P.atlantica* à savoir les tannins, les flavonoïdes, les anthracénosides, les anthocynosides, et les hétérosides triterpéniques. Nos résultats confirment les travaux de **Kawashty et al (2000)** qui ont mis en évidence l'existence des flavonoïdes glycosidiques dans la partie aérienne des 4 espèces du *Pistacia* y compris *P.atlantica*. Par ailleurs, certains auteurs ont reporté la présence des anthocyanes dans les baies et les feuilles du *P. lentiscus* (**Romani et al, 2002; Longo et al, 2007**). D'autre part, la mise en évidence des quantités minimales de catéchine et des tannins galliques est signalée dans la littérature chez *P.lentiscus* et *P. weinmannifolia* respectivement (**Romani et al, 2002 ; Topçu et al, 2007**).

D'autres classes telles que les stérols et les stéroïdes ont été trouvés en quantité moyenne, dans les fruits du *P.atlantica* (**Yousfi et al, 2002; Benhassaini et al, 2007**).

Cependant l'amidon, les saponosides, les alcaloïdes, les composés réducteurs et les coumarines sont des classes de familles chimiques totalement absentes dans les fruits mûrs du *P.atlantica*.



## CHAPITRE 2 : Rendements et les teneurs en phénols totaux

### 1- Couleur des extraits méthanolique des fruits mûrs du *Pistacia atlantica* Desf :

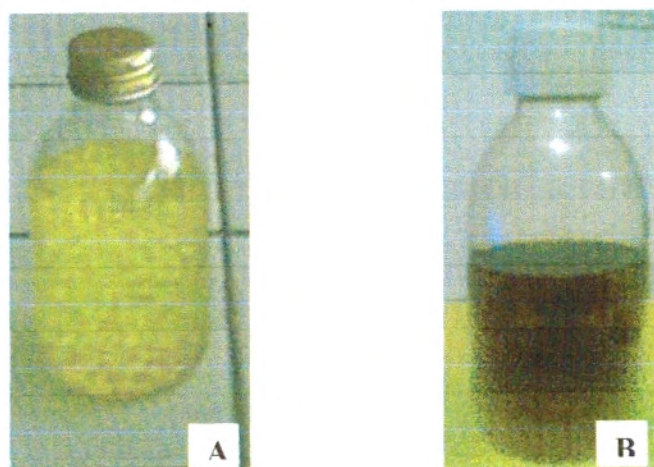
Après l'extraction méthanolique des fruits mûrs du *P. atlantica*, nous remarquons que chaque extrait a une couleur spécifique (Tableau 4).

**Tableau 4** : Couleur des extraits des fruits mûrs du *Pistacia atlantica*.

L'extrait des fruits mûrs du <i>P. atlantica</i>	Couleur
Extrait brut méthanolique	jaune foncé
Extrait acétonique (Tannins)	jaune foncé
Fraction d'acétate d'éthyle (Flavonoïdes)	jaune
Fraction butanolique (Flavonoïdes)	jaune clair
Anthocyane	rouge foncé brun
Extrait hexanique (Huile)	jaune foncé

### 2- Rendement d'huile des fruits mûrs du *Pistacia atlantica* Desf :

L'huile extraite à partir des fruits du *P. atlantica* est de couleur jaune foncée avec un aspect visqueux et une odeur agréable (**Photo 5**).



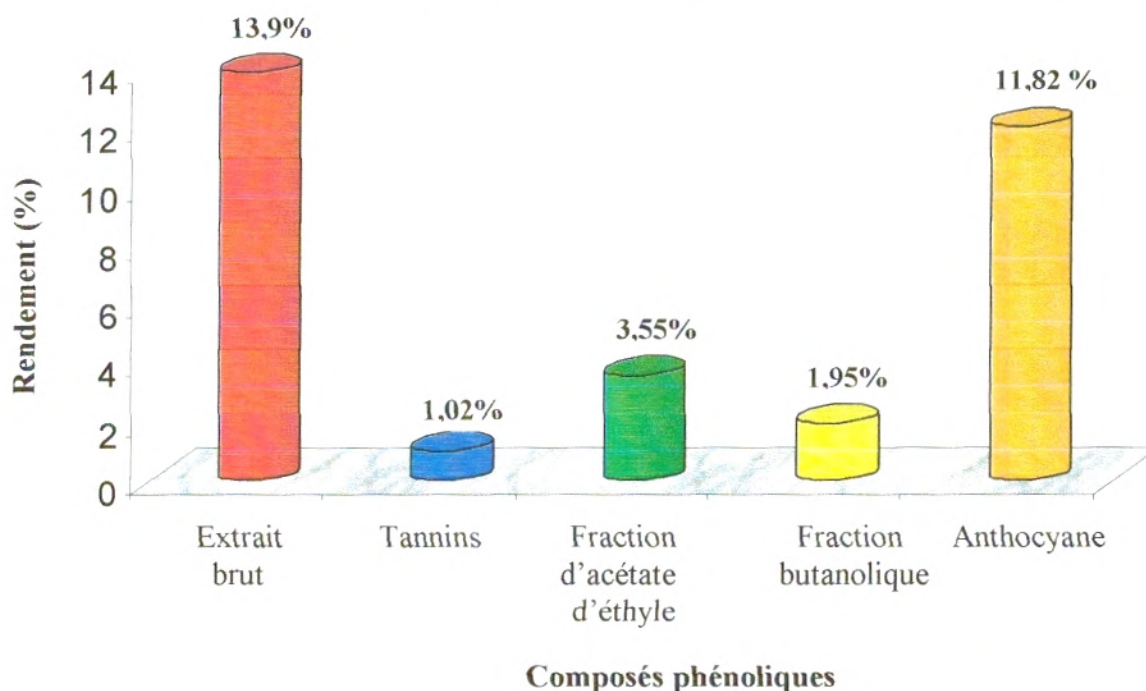
**Photo 5** : Huiles de *Pistacia atlantica* Desf (A) et *Pistacia lentiscus* L (B).

Nos résultats révèlent que le rendement en huile est de l'ordre de 44,07 % ce qui est comparable avec la valeur obtenue de l'ordre de 45% par **Yousfi et al (2002)**. D'autre part, nous remarquons que notre rendement en huile est supérieur à celui d'huile d'*Argania spinosa* (33,98 %) trouvé par **Khalidi (2007)**. **Tchiégang et al (2004)** ont montré que les rendements d'huile d'amandes de *Ricinodendron heudelotii* obtenue (16,11 à 29,56%) sont inférieurs à nos valeurs.

Le séchage préalable des graines est un facteur important pour l'accélération de l'extraction car il a comme avantage d'éliminer les quantités d'eau stockées dans les fruits et par conséquent il facilite l'extraction. En plus de ces paramètres, il ne faut pas oublier les facteurs climatiques, la date de récolte des graines, la durée et les conditions de conservation.

### 3-Rendement des extraits :

Les rendements des extraits des composés phénoliques sont illustrés dans la figure 6.



**Figure 5 :** Rendements des extraits des composés phénoliques exprimés en pourcentage.

Le rendement de l'extrait brut est le plus élevé (13,9 %) suivi par les anthocyanes (11,82%), suivi par la fraction d'acétate d'éthyle (3,55%), la fraction butanolique (1,95%) et les tannins (1,02%) respectivement.

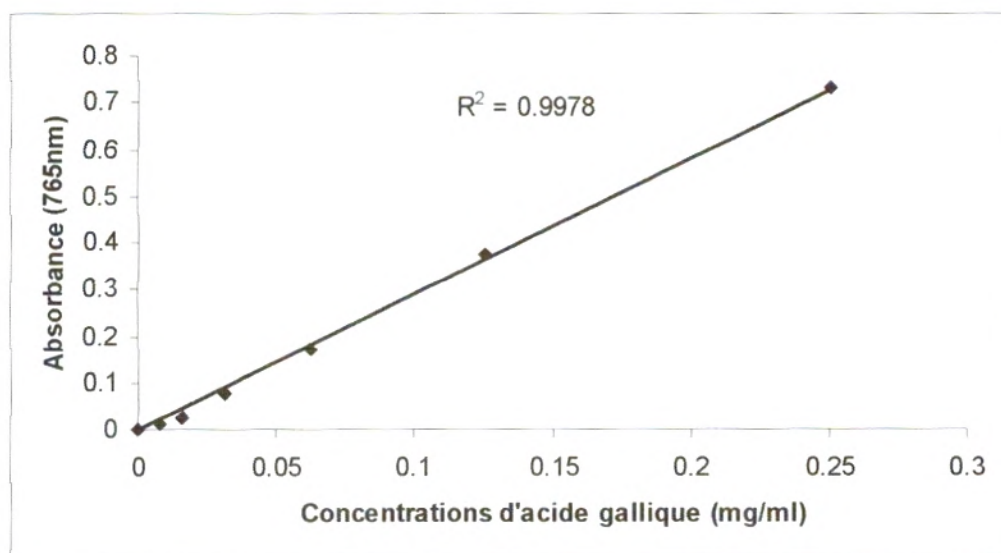
Aucun travail publié concernant les tests photochimiques de *P. atlantica* n'a été réalisé. Nous avons estimé nécessaire de comparer nos résultats avec ceux de **Benhammou et al (2009)** sur les deux parties (feuilles et tiges) d'*Atriplex halimus*. Ces auteurs ont révélé que le rendement dans l'extrait brut des feuilles est de l'ordre de  $24 \pm 1,41$  % qui est supérieur à celui de nos fruits. Par contre, l'extrait brut des tiges ( $7,5 \pm 0,70$  %), les fractions flavoniques d'acétate d'éthyle et butanolique ( $2,66 \pm 0,57$  ;  $1 \pm 0,00$  %) et les tannins ( $0,5 \pm 0,14$ %) sont nettement inférieures à nos résultats.

Dans une étude réalisée par **Romani et al (2002)**, l'espèce du *P. lentiscus* a révélé la présence d'un pourcentage en composés phénoliques dans les feuilles supérieure à 7,5%.

Après synthèse de nos résultats illustrés dans la figure 6 nous pouvons montrer que l'extrait brut est essentiellement constitué d'anthocyanes par rapport aux autres composés phénoliques comme les tannins et les flavonoïdes.

#### 4- Teneurs en phénols totaux :

Les teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche (Figure 7, 8 et 9).



**Figure 6:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

## CHAPITRE 3 : Etude de l'activité antioxydante des composés phénoliques et des huiles

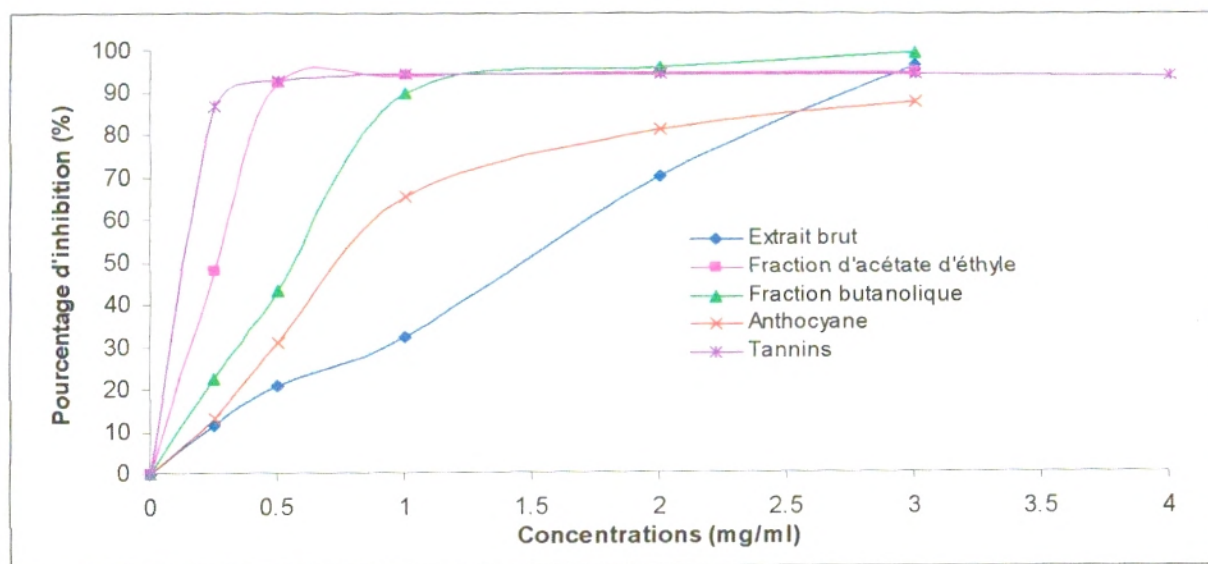
### 1-Introduction :

L'activité antioxydante des composés phénoliques des fruits mûrs du *P. atlantica* et des huiles du *P. atlantica* et *P. lentiscus* est évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>.

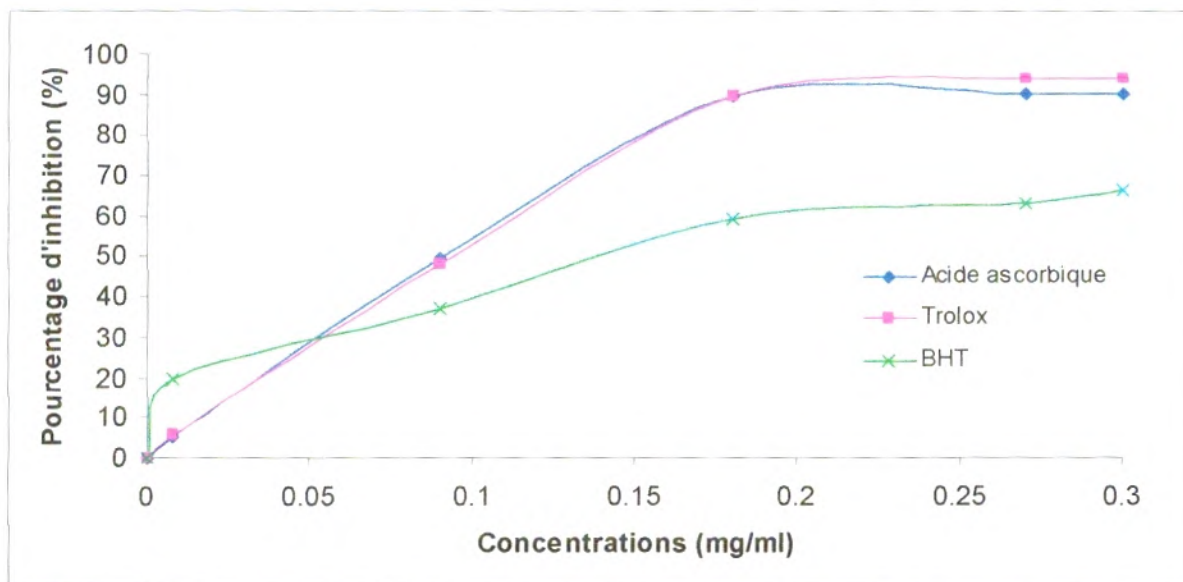
### 2- Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> :

#### 2.1-Par les extraits des composés phénoliques et les contrôles:

Les résultats de l'activité antioxydante exprimés en pourcentage d'inhibition des extraits des composés phénoliques et les contrôles positifs sont illustrés dans les figures 9 et 10.



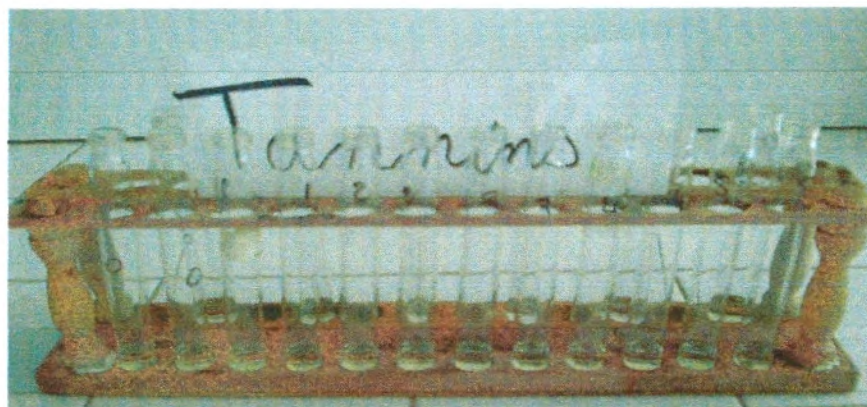
**Figure 9 :** Pourcentages d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut, la fraction acétate d'éthyle, la fraction butanolique, les tannins et les anthocyanes.



**Figure 10 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations des contrôles positifs (acide ascorbique, BHT et le trolox).

Les pourcentages d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la concentration (**Figure 9, 10**). A la concentration 0,25 mg/ml, les tannins enregistrent un pourcentage d'inhibition le plus important de l'ordre de 86,89 % suivi par la fraction acétate d'éthyle (48,22%), la fraction butanolique (22,42%), les anthocyanes (13,25%) et l'extrait brut (11,28%). A la concentration 1 mg/ml, les tannins arrivent à piéger presque toute la quantité du DPPH ajoutée où le pourcentage d'inhibition égale à 94,29% (**Photo 6**).

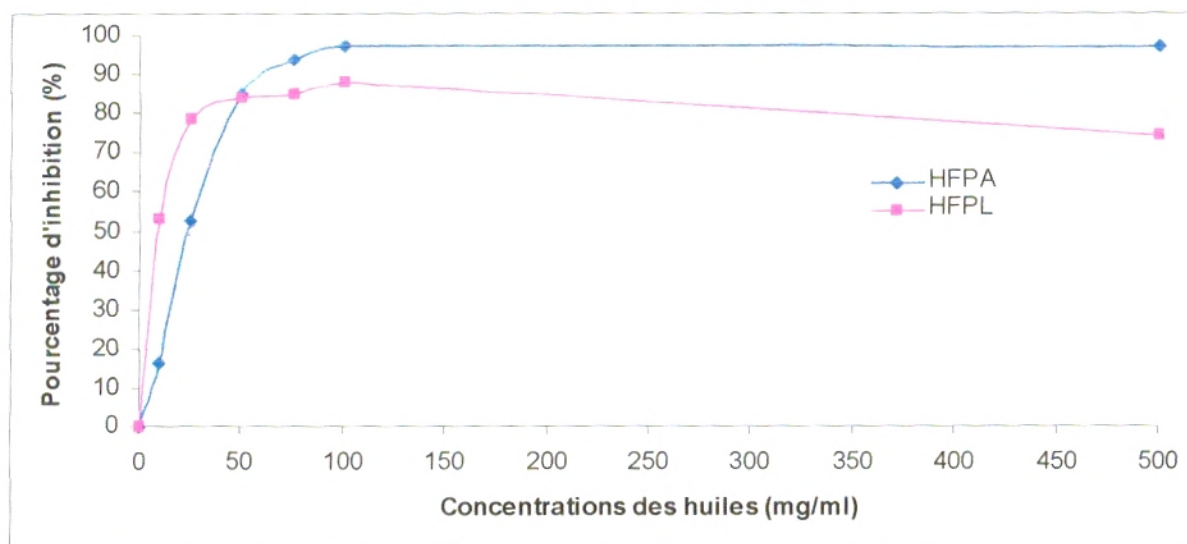
Notant que l'acide ascorbique a un pouvoir antiradicalaire le plus élevé et comparable à celui du trolox, ce qui est clairement remarquable sur l'allure des deux courbes (**Figure 10**). A la concentration 0,09 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont égale à 37,29 ; 48,46 et 65,84 % pour le trolox, le BHT et l'acide ascorbique respectivement.



**Photo 6 :** Piégeage du radical DPPH par les tannins.

## 2.2-Par les huiles des deux *Pistacia*:

L'activité antiradicalaire des huiles fixes vis-à-vis du radical DPPH est résumée dans la figure 11.



**Figure 11 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations d'huiles fixes de *Pistacia atlantica* (HFPA) et *Pistacia lentiscus* (HFPL).

A la concentration 10 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de l'huile fixe de *P.lentiscus* égale à 53,15%, il est plus puissant par rapport à celui du *P.atlantica* qui est de l'ordre de 16,58%. Ces pourcentages aboutissent à 78,38% et 52,82% à la concentration 25 mg/ml respectivement.

## 3- Concentration $EC_{50}$ :

### 3.1- $EC_{50}$ des extraits :

Pour comparer la capacité antioxydante de nos extraits, nous avons déterminé expérimentalement, le paramètre  $EC_{50}$  (Tableau 7, Figure 12). Cette concentration a été présentée récemment pour l'interprétation des résultats de la méthode de DPPH.

**Tableau 7** : Concentrations  $EC_{50}$  des extraits des fruits mûrs de *P. atlantica* et des huiles du *P. atlantica* et *P. lentiscus*.

Composés phénoliques	$EC_{50}$ (mg/ ml)	$R_2$
<b>Fraction d'acétate d'éthyle</b>	<b>0,20</b>	0,97
<b>Fraction butanolique</b>	<b>0,50</b>	0,97
Extrait brut méthanolique	1,43	0,99
<b>Tannins</b>	<b>0,07</b>	0,99
<b>Anthocyanes</b>	<b>0,80</b>	0,98
Huile fixe de <i>P.lentiscus</i>	8,80	0,98
Huile fixe de <i>P.atlantica</i>	22,60	0,97
<b>Acide ascorbique</b>	<b>0,08</b>	0,99
<b>Trolox</b>	<b>0,09</b>	0,99
<b>BHT</b>	<b>0,13</b>	0,95

D'après le tableau 7, nous constatons que les tannins des fruits mûrs de *P. atlantica* possèdent une activité puissante à piéger le radical DPPH en comparaison avec tous les extraits et les contrôles. Les tannins enregistrent une concentration  $EC_{50}$  égale à 0,07 mg/ml ( $R_2 = 0,99$ ) qui est inférieur à celle de l'acide ascorbique (0,08 mg/ml) et le trolox (0,09 mg/ml). Alors, les autres extraits tels que les fractions d'acétate d'éthyle et du butanol, les anthocyanes et l'extrait brut participent à céder le proton  $H^+$  avec différents degrés dont les  $EC_{50}$  sont 0,20; 0,50; 0,80 et 1,43 mg/ml respectivement.

Nous avons comparé nos résultats avec d'autres espèces par manque de travaux sur l'étude des propriétés antioxydantes des huiles et des fruits de *P. atlantica*. **Atmani et al (2009)** ont montré que la fraction aqueuse des feuilles de *P. lentiscus* récolté du Bejaia possède une puissante activité antioxydante à neutraliser le radical DPPH dont la concentration  $EC_{50}$  égale à 0,004 mg/ml. D'autres études reportées par **Rangkadilok et al (2007)** ont présenté que le thé vert a une forte capacité à piéger le DPPH à la concentration 0,010 mg /ml comparativement avec l'acide gallique (0,002 mg /ml), l'acide ellagique (0,002 mg /ml) et l'acide ascorbique (0,004 mg /ml). Ces activités sont nettement supérieures à nos résultats.

**Benhammou et al (2009)** ont trouvé que les concentrations des extraits méthanoliques des tiges et des feuilles d'*Atriplex halimus* sont de l'ordre de 20,58 et 31,83 mg/ ml qui indiquent une propriété antiradicalaire inférieure à celle de notre étude.

D'après notre étude, nous constatons que cette meilleure propriété à piéger le radical DPPH est fortement liée avec la teneur en phénols totaux ( $38,06 \pm 1,25$  mg équivalent d'acide gallique /g de MS) en particulier la teneur en tannins ( $10,34 \pm 0,00$  mg équivalent de catéchine/g de MS). Ceci est confirmé par **Baratto et al (2003)** qui ont montré que l'activité antioxydante de *Pistacia* est due principalement aux acides galliques et ses dérivés galloyl et que le pourcentage du piégeage du radical DPPH augmente avec le nombre du groupe OH. Notant aussi, que la quercétine et l'acide gallique sont des puissants antioxydants (**Makris et Kefalas, 2004**).

D'ailleurs, la composition chimique du *Pistacia* révèle la présence d'acide gallique et ces dérivés (**Topçu et al, 2007**) et que l'effet inductif de ces 3 groupes hydroxyles dans ce composé est un facteur important dans l'augmentation de son activité antioxydante (**Sanchez-Moreno et al, 1998**). Ces résultats confirment les travaux de plusieurs auteurs qui ont mis en évidence l'habilité du piégeage du radical DPPH<sup>\*</sup> par l'acide gallique et les glucoses galloyl (**Yokozawa et al, 1998 ; Baratto et al, 2003**).

### 3.2- EC<sub>50</sub> des huiles fixes :

L'activité antioxydante des huiles fixes des deux *Pistacia* est faible par rapport à tous les extraits étudiés. Les concentrations EC<sub>50</sub> égalent à 8,80 mg/ml ( $R_2 = 0,98$ ) pour l'huile de *P.lentiscus* et 22,60 mg/ml ( $R_2=0,97$ ) pour celle de *P. atlantica* (**Tableau 7**).



# Conclusion générale

Vue que les plantes *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* se trouvent réparties dans toute l'Algérie, elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle (antidiabétique et anti-hypertension) et sont très connues pour leurs vertus thérapeutiques (antioxydante et antiulcéreuse). L'huile des fruits est largement appréciée par la population algérienne en mélangeant avec les dattes et peut être consommé à toute heure.

L'expansion des maladies compliquées tels que les cardiovasculaires, les vieillissements, l'athérosclérose, l'Alzheimer et le cancer qui sont issues de fameuse expression « Stress oxydatif » constitue l'intérêt primordial des recherches actuelles sur les molécules antioxydantes comme les vitamines, les caroténoïdes et les composés phénoliques notamment les flavonoïdes. La principale source d'antioxydants est le règne végétal, en particulier les plantes supérieures.

Le présent travail portant sur trois axes dont le premier concerne les tests phytochimiques des fruits mûrs de *Pistacia atlantica*, la deuxième porte sur l'extraction des composés phénoliques et les dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins. L'évaluation de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques est représentée dans le troisième axe.

Les résultats obtenus nous a permis de mettre en évidence la richesse des fruits par les tannins, les flavonoïdes, les anthocyanes et les triterpènes.

Le rendement le plus important est celui de l'extrait brut à raison de 13,9% suivi par les anthocyanes (11,82 %), les flavonoïdes représentés par la fraction d'acétate d'éthyle (3,55%) et la fraction butanolique (1,95%), et les tannins (1,02%).

Concernant, le rendement en huile fixe des fruits de *P. atlantica* est de l'ordre de 44,07%.

La teneur en phénols totaux dans l'extrait brut (38,06 mg équivalent d'acide gallique/g de MS) présente une valeur très importante par rapport à celles trouvées dans les deux huiles des fruits de *P. atlantica* ( $0,017 \pm 0,00$  mg/g) et *P. lentiscus* ( $0,032 \pm 0,00$  mg/g). Par contre, le dosage des flavonoïdes et des tannins révèle des teneurs de l'ordre de 3,38 et 10,34 mg/g respectivement.

L'activité antioxydante utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH des tannins est importante dont la valeur  $EC_{50}$  égale à 0,07 mg/ml qui est plus élevée à celles de l'acide ascorbique, du trolox et du BHT. L'ordre de l'efficacité à neutraliser ce radical est le suivant : La fraction des flavonoïdes d'acétate d'éthyle (0,20 mg/ml) > la fraction des flavonoïdes butanolique (0,50 mg/ml) > les anthocyanes (0,80 mg/ml) > l'extrait brut (1,43 mg/ml) > huile fixe de *P.lentiscus* (8,80 mg/ml) > huile fixe de *P. atlantica* (22,60 mg/ml).

Nos résultats nous ont permis de révéler une activité antioxydante très intéressante dans les extraits de *P. atlantica* plus précisément les tannins. Nous avons constaté que le rendement d'huile fixe de *P. atlantica* était important. Pour cela, nous envisageons de nombreuses perspectives, parmi eux :

- ❖ d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres techniques *in vitro* et *in vivo* en identifiant les molécules actives surtout les composés phénoliques;
- ❖ de tester l'effet des huiles fixes et des flavonoïdes des fruits des deux plantes sur les microorganismes les plus pathogènes pour l'homme ou l'agriculture et faire des essais *in vivo* ;
- ❖ d'intégrer ces huiles dans des régimes alimentaires destinés aux rats et voire les performances métaboliques.
- ❖ d'analyser la composition chimique des huiles fixes ;
- ❖ d'exploiter ces molécules en industrie agro-alimentaire pour stopper les principaux phénomènes de dégradation des lipides des denrées alimentaires afin de remplacer les antioxydants de synthèse qui sont révélés néfastes pour la santé humaine.

# *Références bibliographiques*

- ❖ Atli, H.S., Arpaci, S., Ayanoglu, H. (2001). Comparaison of seedling characteristics of some *Pistacia* species. In AK B.E (ed). 11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 215-218.
- ❖ 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. *Food Chemistry*, 112: 303–309.
- ❖ Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R., Pogni, R. (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free Radical Research*, 37(4): 405-412.
- ❖ Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology*, 9: 5-21.
- ❖ Batista, O., Duarte, A., Nascimento, J., Simones, M.F. (1994). Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the root of *Plectranthus hereroensis*. *Journal of Natural Products*, 57: 858-861.
- ❖ Belhadj S. (2001). Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. 11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 107-109.
- ❖ Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R et al. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203: 27-36.
- ❖ Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M., et al. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 410–414.
- ❖ Benhammou, N., Atik Bekkara, F, Kadifkova Panovska, T. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, 29 (3): 155-161.
- ❖ Benhammou, N., Atik Bekkara, F, Kadifkova Panovska, T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 022-028.
- ❖ Benhammou, N., Atik Bekkara, F. (2009). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie). *Actes du congrès international*, Mezraoua (Taounate) & Fès, Maroc, 281-285.

- ❖ Benhassaini, H., Bendahmane, M., Benchalgo, N. (2007). The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2): 121-124.
- ✦❖ Biesalski, H. K., Hemmes, C., Hopfenmuller, W., Schmid, C., Gollnick, H. P. (1996). Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of  $\beta$ -carotene. *Free Radical Research*, 24: 215-224.
- ❖ Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with  $\text{Cu}^{2+}$  ions: implication for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330: 1173-1178.
- ❖ Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition. Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, 1120.
- ✦❖ Burton, G.W., Ingold, K.U. (1984).  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
- ❖ Charfi, D. (1996). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol. La production et la composition minérale de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'Elhajeb (SFAX). Mémoire de thèse de doctorat en Biologie, Faculté des Sciences, SFAX. COI/T.15/NCn°2/Rev.10.
- ❖ Chaurasia, S.C., Vyas, K.K. (1977). In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. piperina. *Journal of Research in Indian Medicine, Yoga Homeopath*, 24-26.
- ❖ Chimi, H., Rahmani, M., Cillard, P. (2005). Etude de la fraction phénolique des huiles d'olive vierge et d'argane du Maroc. *Actes de l'institut Agronomique et Vétérinaire*, 8 (1 et 2) : 17-21.
- ❖ Cirre, L. (2001). Les plantes et les médicaments, l'origine végétal de nos médicaments. *Edition Delachaux et Niestlé SA, Paris*.
- ❖ Delazar, A., Reid, R.G., Sarker, S.D. (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *Mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40 (1): 24-27.
- ❖ De Pooter, H.L; Schamp, N.M; Aboutabl, E.A; El Tohamy, S.F; Doss, S.L. (1991). Essential oils from the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*, 6: 229-232.
- ❖ Derbel, S., Ghedira, k. (2005). Laboratoire de pharmacognosie, Faculté de pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie. *Phytothérapie*, 1: 28-34.

- ❖ Driss L. (2002). Plantes médicinales du Maroc : Usages et toxicité. Département de pharmacie- toxicologie. Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II. B.P 6202, Rabat-Institut, Maroc.
- ❖ Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74: 170-176.
- ❖ El-Waziry, A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3: 605-614.
- ❖ Earnsworth, N R., Berderka, J.P., Moses, M. (1974). Screening of Medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63: 457-459.
- ❖ Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- ❖ Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A. (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament, Exposition temporaire du 19.09 au 30.06.2000.
- ❖ Fulbert J.C., Cals M.-J. (1992). Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathologie Biologie*, 49(1) : 66-77.
- ❖ Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 643-650.
- ❖ Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K., Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107: 1120–1130.
- ❖ Halliwell, B., Gutteridge, M.J. (1990). Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- ❖ Halliwell, B. Gutteridge J.M.C. (1999) Antioxidant defences in Free Radical in Biology and Medicine. pp 105-245, Oxford University Press, Oxford, UK.
- ❖ Hamdan, I.I., Afifi, F.U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 117-121.
- ❖ Hansaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 16: 845-850.

- ❖ Harborne, J.B. (1973). *Phytochemical methods*, London. Chapman and Hall, LTd, 49-188.
- ❖ Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- ❖ Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., Nicolosi, V.M. (1996). In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. *Journal of Chemotherapy*, 8 (3): 207-209.
- ❖ ISO 659, (1988). Graines oléagineuses- détermination de la teneur en huile. International organisation for Standardisation (ISO). Geneva.
- ❖ Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 213-217.
- ❖ Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M., Saleh, N.A.M. (2000). The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematic and Ecology*, 28: 915-917.
- ❖ Khaldi, D. (2007). Etude chimique et nutritionnelle d'*Argania spinosa*. *Mémoire de Magistère*. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.
- ❖ Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167.
- ❖ Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouh, C., Soumanou, M.M., Moudachirou, M. (2004). Propriétés physico-chimiques et composition de l'huile non conventionnelle de poutghère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin. *Comptes Rendus de Chimie*, 7 : 1007-1012.
- ❖ Lesgards, J.F, (2000). Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme; aspect chimiques et biochimiques. *Thèse de doctorat*, 19-20.
- ❖ 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. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 198-204.
- ❖ Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 360-364.
- ❖ Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613: 01-19.

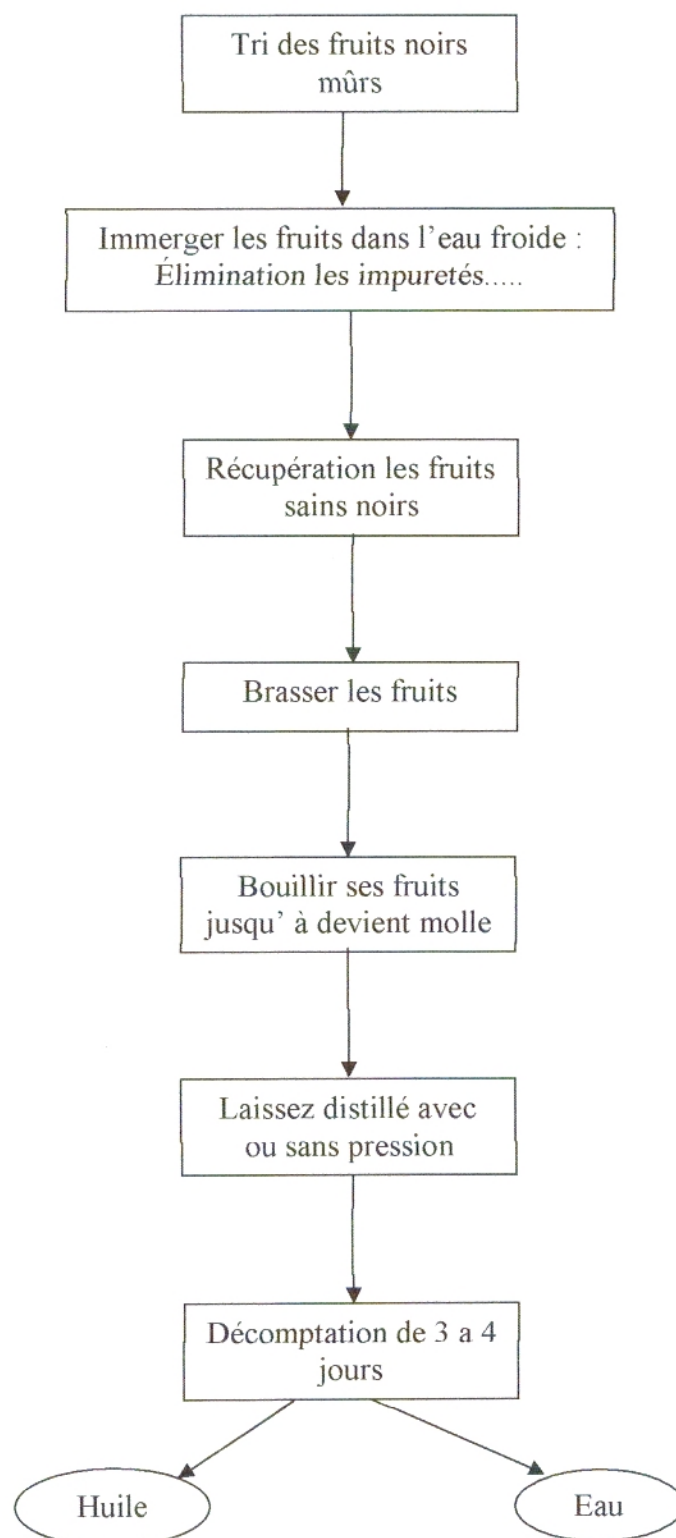
- ❖ Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounid, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta Medica*, 65.
- ❖ Maiti, M., Nandi, R., Chaudhuri, K. (1982). Sanguinarine: a monofunctional intercalating alkaloid. *FEBS Letters*, 142 : 280-284.
- ❖ Makris, D.P., Kefalas, P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, 42(2):105-108.
- ❖ Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, Ch. Et J.I. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727-47.
- ✕ ❖ Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. *Thèse de doctorat*, soutenue devant l'université de Limoges. Faculté de Pharmacie.
- ❖ Meriah, S. (2007). Contribution à l'étude chimique et botanique de *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L. deux plantes de la flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle. *Thèse de doctorat*, département de chimie, Faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.
- ❖ Milane, H (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie*, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- ❖ Moles, S., Waterman, P.G.A. (1994). Critical analysis of technic for measuring Tanins in ecological studis. *Oecologia*, 72: 148-156.
- ❖ Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(10): 1787-1790.
- ❖ Onay, A. (2000). Somatic embryogenesis from mature seed cultures of *Pistacia atlantica*. *Turk. J. Agric For*, 24: 465-473.
- ❖ Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- ❖ Paris, R., Moyse, H. (1969). Précis de matière médicinale (Tome 3). Paris: Masson et Cie.
- ❖ Pirisi, F.M., Cabras, P., Cao, C.F., Migliorini, M., Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in Virgin olive oil.2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1191-1196.
- ❖ Quezel, P.; Santa, S. (1963). Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Editions du Centre National de la recherche scientifique*. Tome II.



- ❖ Ramadan, M.F., Moersel, J.T. (2006). Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 838-842.
- ❖ Ramadan, M.F., Kroh, L.W., Moersel, J.T. (2003). Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass) crude seed oils and oil fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24): 6961-6969.
- ❖ Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (2008). Bioactive molecules and medicinal plant. Edition Springer Verlag Berlin Héidelberg.
- ❖ Rana, B.K., Singh, U., Taneja, P.V. (1997). Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *Journal of Ethnopharmacology*, 57: 29-34.
- ❖ Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 328-336.
- ❖ Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Quatar. *Fitoterapia*, 52 (2), 35-42.
- ❖ Roberts, M.F., Wink, M. In: Alkaloids- Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications. Plenum, New york, 1998.
- ❖ Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical analysis*, 13: 79-86.
- ❖ Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3):121-137.
- ❖ Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270-276
- ❖ Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.
- ❖ Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- ❖ Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- ❖ Swain, T. (1974). Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 479-501.

- ❖ Yousfi, M., Nedjmi, B., Bellal, R., Ben Bertal, D., Palla, G. (2002). Fatty Acids and Sterols of *Pistacia atlantica* Fruit Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79 (10): 1049-1050.
- ❖ Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydou, E.M. (2005). Triacylglycerol Composition of Oil from *Pistacia atlantica* Fruit Growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82 (2): 93-96.
- ❖ Zazzo, J.F. (2002). Oxidatif stress during acute inflammatory and critical states: implication for clinical practice. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 16 (4), 268-274.
- ❖ Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X. (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371: 654–658.
- ❖ Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 (4): 555–559.

# ANNEXES

**Annexe 1** : Schéma d'extraction de l'huile fixe du *Pistacia lentiscus*

## المستخلص

من أجل تحسين و استغلال النباتات في جميع الميادين الصيدلانية الطبية و الزراعة الغذائية لقد اهتمنا بالدراسة الكيميائية لثمار *Pistacia atlantica* هذا الصنف مع *Pistacia lentiscus* يلفت انتباه الكثير من الباحثين بسبب كثرة مميزاتهم الطبية على صحة الإنسان (ضد التأكسد، ضد الالتهاب، ضد القرحة). أظهرت النتائج المحصل عليها ثراء الثمرات بأربعة عائلات وهي " الطاننات ، الفلافونويدات ، الأنطوسيانات، ثلاثي التربينات ، ستيرول. أعطت مستخلصات المواد الأيضية مردود ملفت الانتباه في مستخلص الخام 13,9% أما نسبة مردود الزيت النباتي الثابت ل *Pistacia atlantica* المستخلص بجهاز السوكسل فيقدر ب 44,07% . إن نسبة المكونات الفينولية مرتفعة في مستخلص الخام الميثانوليكي للثمار بـ 38,06 مغ ما يعادل حمض الغاليك للثمار الجافة بـ غ مقارنة بالنسبة الموجودة في الزيوت الثابت ل *Pistacia atlantica* 0,017 مغ/ مل و *Pistacia lentiscus* بـ 0,032 مغ/ مل . في حين إن قيمة الطاننات 10,34 مغ ما يعادل الكاوشين للثمار الجافة ب غ وهي سائدة بالنسبة الفلافونويدات 3,38 مغ/ غ. بعد تطوير النشاط المضاد للتأكسد بطريقة واحدة و هي تثبيت الجذر الحر DPPH المعبر بنسبة يرتفع مع ارتفاع التركيز إذ نستخلص أن الطاننات لهم نشاط قوي لتعديل DPPH بقيمة  $EC_{50} = 0,07$  مغ ل مل مقارنة مع باقي المستخلصات و المراجع الايجابية حمض أسكوربيك ، طرلكس، BHT أن توزيع الأجزاء أسهبات ديتيل و بيطانوليكي، الأنطوسيانات المستخلص الخام ، الزيت الثابت ل *Pistacia lentiscus* و ل *Pistacia atlantica* أظهروا نشاط معتبر و معقول ب 0,20 ; 0,50 ; 0,80 ; 1,43 ; 8,80 و 22,60 مغ/ مل ترتيبا.

الكلمات المفتاحية: *Pistacia atlantica* , *Pistacia lentiscus* ، الدراسة الفيتوكيميائية ، النشاط المضاد للتأكسد ، DPPH، الزيت الثابت، المركبات الفينولية.

## Résumé

Afin de valoriser et exploiter le patrimoine végétal dans plusieurs domaines pharmacologique, médical et agro-alimentaire, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et à l'activité biologique des fruits de *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus*. Ces deux espèces attirent l'attention de plusieurs chercheurs grâce à ces nombreuses vertus médicinales sur la santé humaine (anti-inflammatoire, antioxydante et anti-ulcéreuse...).

Dans les fruits 4 familles ont été révélés les tannins, les flavonoïdes, les anthocyanes et les triterpènes. Les extractions de ces métabolites montrent un rendement remarquable dans l'extrait brut (13,9 %). Alors, le rendement en huile fixe de *Pistacia atlantica* extraite par Soxhlet est de l'ordre de 44,07%.

La teneur en phénols totaux est élevée dans l'extrait brut des fruits (38,06 mg équivalent d'acide gallique/g de la plante sèche) en comparaison à celle trouvée dans les deux huiles de *Pistacia atlantica* (0,017 mg/g) et *Pistacia lentiscus* (0,032 mg/g). Alors, la teneur en tannins (10,34 mg équivalent de catéchine/g de la plante sèche) est dominante par rapport aux flavonoïdes (3,38 mg/g).

L'évaluation de l'activité antioxydante utilisant le piégeage du radical libre DPPH nous a montré que les tannins ont une bonne activité avec  $EC_{50}$  égale à 0,07 mg/ml par rapport aux autres extraits et aux témoins (acide ascorbique, trolox et BHT). En revanche, les fractions acétate d'éthyle et butanol, les anthocyanes, l'extrait brut, l'huile fixe du *Pistacia lentiscus* et celle du *Pistacia atlantica* révèlent une activité considérable à raison de 0,20 ; 0,50 ; 0,80 ; 1,43 ; 8,80 et 22,60 mg/ml respectivement.

**Mots clés :** *Pistacia atlantica*; *Pistacia lentiscus* ; étude phytochimique ; activité antioxydante, DPPH, huile fixe, composés phénoliques.

## Abstract

In order to develop and exploit the vegetable inheritance in several fields pharmacological, medical and agro-alimentary, we were interested in the phytochimic study and the biological activity of the fruits of *Pistacia atlantica* and *Pistacia lentiscus*. These two species draw the attention of several researchers for many medicinal virtues to health human (anti-inflammatory drug, antioxidant and anti-ulcerous...).

In the fruits, 4 families were revealed, the tannins, the flavonoids, the anthocyanes and the triterpens. The extractions of these metabolites show a remarkable output in the crude extract (13,9%). Then, the oil yield of *Pistacia atlantica* extracted by Soxhlet is about 44,07%.

The phenolics content is high in the crude extract of the fruits (38, 06 mg equivalent of gallic acid/g dry matter) in comparison with that found in two oils of *Pistacia atlantica* (0,017 mg/g) and *Pistacia lentiscus* (0,032 mg/g). Then, the tannins content (10,34 equivalent mg of catechin /g dry matter) is dominant compared to the flavonoids (3,38 mg/g).

The evaluation of the antioxidant activity using the scavenging capacity of free radical DPPH showed us that the tannins have a good activity with  $EC_{50}$  equal to 0,07 mg/ml compared to the other extracts and controls (ascorbic acid, trolox and BHT). On the other hand, the ethyl acetate and butanol fractions, the anthocyanes, the crude extract, the oil of *Pistacia lentiscus* and that of *Pistacia atlantica* reveal a considerable activity at a rate of 0,20; 0,50; 0,80; 1,43; 8,80 and 22,60 mg/ml respectively.

**Key words:** *Pistacia atlantica*; *Pistacia lentiscus*; phytochimic study; antioxydant activity, DPPH, oil, phenolic compounds.