RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° d'ordre : Doc/ /

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITE KASDI MERBAH- OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Pour obtenir le Diplôme de

Doctorat ès Sciences

SPÉCIALITÉ : Biologie
OPTION : Biochimie

PAR :

Hamid GUENANE

Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.)

Soutenue publiquement le 05 janvier 2017 devant le jury composé de :

M^{me} OULD ELHADJ-KHELIL Aminata	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Présidente
M. SAIDI Mokhtar	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Examinateur
M. NADJEMI Boubakeur	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examinateur
M. BOUDJENIBA Messaoud	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examinateur
M. YOUSFI Mohamed	Professeur	Université Amar Telidji- Laghouat	Directeur de thèse
M. OULD ELHADJ Mohamed Didi	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	Co-Directeur de thèse

A la mémoire de ma mère que Dieu le Tout Puissant lui accorde sa Sainte Miséricorde

A mon cher père

A mes chères sœurs

A tous mes amis

A tout (e) enseignant (e) qui se consume telle une bougie pour éclairer le chemin du savoir

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr Yousfi Mohamed, de l'université Amar Télidji de Laghouat, de m'avoir proposé ce sujet de recherche et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils et remarques m'ont été d'un grand intérêt. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et ma grande gratitude.

Je tiens également à remercier le Pr Oueld Elhadj Mohamed Didi de l'université Kasdi Merbah d'Ouargla, d'avoir accepté de coencadrer cette modeste contribution.

Je tiens à remercier les membres de l'honorable jury pour m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Il m'est agréable de remercier vivement M^{me} Bombarda Isabelle du Laboratoire d'Instrumentation et de Sciences Analytiques (Marseille, France) pour son inestimable aide.

Je ne saurai oublier le soutien et les conseils de mes collègues notamment M. Ouinten Mohamed, M. Boubrima Youcef, M. Gouzi Hicham, M. Benhassine Lamine, M. Becheur Mourad, M. Labiadh Redouane et M. Chaibi Rachid. Je leur dis : merci infiniment.

Mes remerciements s'adressent à M^{me} Bourenane Fatiha, M. Benaceur Farouk, M^{me} Nebeg Halima et M. Benali Madani pour leur précieuse aide.

Je remercie tous les membres du Laboratoire des Sciences Fondamentales, particulièrement M. Gourine Nadhir, M. Djeridane Omar, M. Benalia Mohamed et M. Benhmed Ziad.

Mes chaleureux remerciements s'adressent à tout le corps technique et administratif du département de Biologie (Université de Laghouat), particulièrement M. Hadjoudja Mustapha, M. Chetateha Mohamed et Mme Maidi Leila.

A toute personne, de près ou de loin, ayant fourni la moindre aide pour que cette thèse se concrétise.

Résumé

Les fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*) sont utilisés, depuis longtemps, par les populations locales, dans la nutrition et la médecine traditionnelle. Dans le but de mieux situer l'effet du degré de maturation des fruits ainsi que celui de l'emplacement géographique de l'arbre sur la composition et l'activité antioxydante d'extraits huileux et phénoliques, nous nous sommes intéressés à l'étude des huiles et des tourteaux de fruits issus de plusieurs régions avec un degré de maturité différent. Ainsi, la composition en acides gras des huiles extraites a été déterminée par CPG, les tocophérols totaux et individuels ont été analysés par CLHP, les stérols totaux ont été quantifiés par spectrophotométrie et l'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée par le test DPPH et le test Molybdate Phosphate. Par ailleurs, des composés phénoliques ont été extraits de l'huile et à partir des tourteaux. La teneur en phénols totaux et flavonoïdes a été déterminée par spectrophotométrie, l'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée et une CLHP pour les composés phénoliques a été menée. Les résultats obtenus ont indiqué une variation qualitative et/ou quantitative de ces paramètres en fonction du degré de maturation du fruit. En effet, avec la maturation du fruit, il semble que le taux de l'acide palmitique augmente et celui de l'acide linoléique diminue. La proportion de γ-tocophérol et de α-tocophérol varierait de la même manière. La composition phénolique semble elle aussi varier. La teneur en stérols totaux, en tocophérols totaux et individuels, en phénols totaux (dans les tourteaux et dans l'huile) ainsi que l'activité antioxydante (des extraits huileux et phénoliques) diminuent avec la maturation. Par contre, le rendement de l'extraction huileuse augmente. Ces données indiquent clairement le caractère distinctif de ces paramètres en fonction du degré de maturation des fruits. Par ailleurs, la teneur en flavonoïdes ne semblerait varier que légèrement. En dernier lieu, l'emplacement géographique de l'arbre ne semble, d'une manière générale, influer que légèrement sur la composition et l'activité de ces extraits. L'ensemble de ces résultats pourraient contribuer à situer un optimum pour ces paramètres réunis et à mettre en valeur des fruits avant leur maturation complète.

Mots clés: *Pistacia atlantica*; Fruit; Maturation; Acide gras, Tocophérol, Polyphénol, Flavonoïde, Antioxydant.

Abstract

Pistacia atlantica fruits have been used for a long time by local populations for culinary and medicinal purposes. In order to better situate the effect of the degree of maturation of the fruits as well as the tree geographical location on the composition and the antioxidant activity of oily and phenolic extracts, we were interested in the study of oil and oil cakes of fruits issued from several regions with a different degree of maturity. Thereby, the fatty acids composition was determined by gas chromatography, total sterols was quantified by spectrophotometry, total and the individual tocopherols were analyzed by HPLC and the antioxidant activity of oils was estimated by both DPPH and Molybdate Phosphate assay. Furthermore, phenolic compounds were extracted from both oil and oil cakes. Total phenols and flavonoid content was determined by spectrophotometry and the antioxidant activity of extracts was evaluated. The phenolic compounds were also analyzed by HPLC. The results indicated a qualitative and/or quantitative variation of these parameters according to the fruit maturation degree. Indeed, with fruit maturation, it seems that the palmitic acid rate increases whereas the linoleic acid decreases. In the way the proportion of γ-tocopherol and α-tocopherol would vary. The phenolic composition also appears to vary. The amounts of total sterols, of total and individual tocopherols, of total phenols (in oil cakes and in oil) as well as the antioxidant activity of the extracts decrease with the maturation. However, the yield of the oily extraction increases. These data indicate clearly the distinctive character of these parameters according to the maturation degree of fruits. On the other hand, the flavonoid content seems to vary only slightly. Lastly, the tree geographical location does not seem to have a notable effect on the composition and the activity of these extracts. These results emphasize the great value of *Pistacia atlantica* fruits before their full maturition.

Key words: *Pistacia atlantica*, Fruit, Maturation, Fatty acid, Tocopherol, Polyphenol, Flavonoid, Antioxidant.

ملخص

تستعمل ثمار الفستق الأطلسي (*Pistacia atlantica*) منذ زمن بعيد من طرف السكان المحليين للتغذية و الطب التقليدي. بهدف تحديد تأثير درجة نضج الثمار و كذالك الموقع الجغرافي للأشجار على تركيب والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الزيتية و الفينولية اهتممنا بدراسة الزيوت و الكسب المتحصل عليه بعد إستخراج الزيت من ثمار الفستق الأطلسي ذات درجات نضج مختلفة و مجنية من مناطق مختلفة. حيث تم تحديد التركيب من الأحماض الدهنية و قياس كمية المحتوى الكلي من الستيرولات و التوكوفيرولات مع التحليل الكروماتوغرافي للتوكوفيرولات و دراسة المركبات الفينولية في الزيت و الكسب كما تم اختبار النشاط المضاد للأكسدة على مستوى الزيت و الكسب. أشارت النتائج المتحصل عليها إلى تغير على مستوى الكم و الكيف لهذه المؤشرات حسب درجة نضج الثمار حيث يظهر أنه مع نضج الثمار نسبة حمض البالميتيك تزداد مع نقص حمض اللينولييك. نفس التغير يخص γ و α توكوفيرول على التوالي. يخص الأمر كذالك التركيب الفينولي. المحتوى من الستيرولات و التوكوفيرولات والمركبات الفينولية (في الزيت و الكسب) وكذالك النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الزيتية و الفينولية يتناقص مع نضج الثمار. فيما يخص مردود إستخلاص الزيت يزداد هذا الأخير مع تقدم نضج الثمار. تشير هذه المعطيات بشكل جلي إلى الصفة المميزة لهذه المؤشرات حسب درجة نضج الثمار. من جهة أخرى يظهر أن المحتوى من الفلافونيدات لا يتغير إلا بشكل طفيف. فيما يخص الموقع الجغرافي للأشجار يظهر أن هذا المعيار لا يؤثر بشكل كبير على تركيب والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات. يمكن أن تساهم هذه النتائج في تحديد مستوى مثالي لهذه المؤشرات مجتمعة و إعطاء قيمة أكبر للثمار قبل نضجها الكامل.

الكلمات المفتاحية : الفستق الأطلسي (*Pistacia atlantica*), ثمار, نضج, حمض دهني, توكوفيرولات, مركب فينولي, فلافونيدات, مضاد للأكسدة.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques composés chimiques isolés à partir de *Pistacia atlantica* (*in* Bozorgi *et al.*, 2012)……... 9

Tableau 2 : Structure des tocophérols et des tocotriénols……..…….. 19

Tableau 3 : Exemples de principales classes de composés phénoliques (Urquaga et Leighton 2000 ; Castellano *et al.*, 2012)……..... 22

Tableau 4 : Exemples de radicaux libres (Favier, 2003 ; Delattre, 2005)…….…. 32

Tableau 5 : Localisation et actions des enzymes antioxydants (Finaud *et al*., 2006)……..... 44

Tableau 6 : Caractéristiques géographiques des différents sites et nombre de pieds par site……..... 50

Tableau 7 : Caractéristiques des fruits de la saison 2011……..... 60

Tableau 8 : Caractéristiques des fruits de la saison 2013……... 67

Tableau 9 : Composition des échantillons huileux groupés……..... 71

Tableau 10 : Teneur en huiles dans les fruits verts de *Pistacia atlantica*……... 74

Tableau 11 : Teneur en huiles dans les fruits noirs de *Pistacia atlantica*…….. 74

Tableau 12 : Teneur en huiles dans les fruits rouges de *Pistacia atlantica*……..... 75

Tableau 13 : Teneurs moyennes en huiles dans les fruits de *Pistacia atlantica*…….. 75

Tableau 14 : Teneurs moyennes en huiles dans les fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique des arbres……. 76

Tableau 15: Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits verts (matures) de *Pistacia atlantica*…..……...…… 77

Tableau 16 : Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits noirs (matures) de *Pistacia atlantica*...…….……..... 78

Tableau 17 : Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits rouges (immatures) de *Pistacia atlantica*……...…….…..…… 78

Tableau 18 : Pourcentages relatifs moyens des acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*. Fruits immatures (Rouges), fruits matures (Verts et Noirs)…..... 80

Tableau 19 : Pourcentages relatifs moyens des acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre…….. 81

Tableau 20 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*. ……. 82

Tableau 21 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits verts de *Pistacia atlantica*……..... 86

Tableau 22 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits noirs de *Pistacia atlantica*…….. 87

Tableau 23 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits rouges de *Pistacia atlantica*…….. 87

Tableau 24 : Teneurs moyennes en tocophérols individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*…… 88

Tableau 25 : Teneurs moyennes en tocophérols individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre……..... 89

Tableau 26 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits verts de *Pistacia atlantica*..…..... 90

Tableau 27 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits noirs de *Pistacia atlantica*…… 90

Tableau 28 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits rouges de *Pistacia atlantica*……. 90

Tableau 29 : Valeurs moyennes de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia. atlantica*….. 91

Tableau 30 : Valeurs moyennes de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre……..…….. 92

Tableau 31 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits verts de *Pistacia atlantica*…….. …… 94

Tableau 32 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits noirs de *Pistacia atlantica*…..……... 94

Tableau 33 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits rouges de *Pistacia atlantica*……..…. 94

Tableau 34 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*…….……. 95

Tableau 35 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre……... 96

Tableau 36: Valeurs de l'EC_{50} des extraits phénoliques de quelques fruits de *Pistacia atlantica*……... 98

Tableau 37: Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les trois acides gras majoritaires de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*…….. 103

Tableau 38 : Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les teneurs des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*……. 106

Tableau 39 : Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les proportions des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*…… 107

Tableau 40 : Matrice de corrélation de Pearson (n) entre les proportions des acides gras et celles des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*…… 111

Tableau 41 : Matrice de corrélation de Pearson (n) entre les proportions des acides gras et les teneurs des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*…… 111

Tableau 42 : Rendement d'extraction et caractéristiques chimiques des différents échantillons huileux……... 115

Tableau 43 : Pourcentages relatifs des acides gras des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* obtenus par CPG……..... 119

Tableau 44 : Proportion de la fraction insaponifiable dans deux échantillons de degré de maturité différent…… 120

Tableau 45 : Teneurs en stérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*… 122

Tableau 46 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* 123

Tableau 47 : Teneurs en tocophérols totaux et individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……..…. 126

Tableau 48 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……. 129

Tableau 49 : Pouvoir inhibiteur (par le test au Molybdate Phosphate) pour trois échantillons représentatifs……..……. 130

Tableau 50 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*..……..…… 131

Tableau 51 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*…….. 132

Tableau 52 : Rendements d'extraction de l'huile à partir des différents échantillons étudiés……. 144

Tableau 53 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……..... 145

Tableau 54 : Teneurs en tocophérols totaux et individuels et pourcentages des isomères dans les huiles des fruits "mélanges" de *Pistacia atlantica* ……... 150

Tableau 55 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……. 153

Tableau 56 : Pouvoir réducteur (exprimé en capacité équivalente) déterminé pour des échantillons représentatifs…….. 154

Tableau 57 : Activités antioxydantes des huiles sans et après extraction des composés phénoliques……..... 156

Tableau 58 : Récapitulatif des résultats obtenus pour les extraits phénoliques à partir des échantillons des huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*.……..…… 157

Tableau 59 : Activités antioxydantes (DPPH et Molybdate phosphate) des extraits phénoliques des huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*……. 159

Tableau 60 : Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons de tourteaux testés…… 161

Tableau 61 : Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons de tourteaux des fruits "mélanges" testés……..... 162

Tableau 62 : Activité anti oxydante (par le test au DPPH) exprimée en EC_{50} pour les différents échantillons testés…….. 164

Liste des figures

Figure 1 : Photographie illustrant l'arbre du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.)…….. 3

Figure 2 : Photographie illustrant les fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.)…… 5

Figure 3 : Structure de base des stérols……..... 17

Figure 4 : Structure chimique de base des tocophérols…….…… 19

Figure 5 : Structure chimique de base des tocotriénols……..... 19

Figure 6 : Biosynthèse des tocophérols (comme modèle l'*Arabidopsis*) (Hussain *et al.*, 2013)… 20

Figure 7 : structure chimique des principales classes de composés phénoliques (Kalili et de Villiers, 2011)……...…. 23

Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes…….. 24

Figure 9 : La voie de shikimate (Macheix *et al*., 2005)……..... 26

Figure 10 : La voie de phénylpropanoide (Hoffmann *et al*., 2004)……..… 27

Figure 11 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999)……..... 28

Figure 12 : Mécanisme de Piégeage des EORs par les flavonoïdes (Jovanovic *et al*., 1994)…….. 30

Figure 13 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Bors *et al*.,1990)… 30

Figure 14 : Origines des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en Biologie (Favier, 2006)……...……..…. 35

Figure 15 : Déséquilibre entre oxydants et antioxydants (Rahman *et al*., 2012)…….. 38

Figure 16 : Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet (Cillard J et Cillard P, 2006)…….……..… 41

Figure 17 : Structure chimique du MDA et du 4-HNE (Daum-Badouard, 2006)…….……... 41

Figure 18 : Eléments à prendre en considération pour l'exploration du pouvoir anti oxydant d'une préparation donnée (Liu, 2010)……..... 46

Figure 19 : Emplacement géographique des sites de cueillette des fruits de *Pistacia atlantica* de la région de Laghouat (capture d'écran Google Earth 2015)…….…… 49

Figure 20 : Emplacement géographique du site de cueillette des fruits de *Pistacia atlantica* de la région d'Ain Ouassara (capture d'écran Google Earth 2015)…….…….….. 50

Figure 21 : Fruits de *Pistacia atlantica* fraichement cueillis (26/9/2009)……..…… 51

Figure 22 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2009….. 52

Figure 23 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004)…….. 55

Figure 24 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2011……..... 61

Figure 25 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2013……..... 70

Figure 26 : Organigramme présentant le protocole d'extraction des polyphénols à partir de l'huile des fruits du Pistachier de l'Atlas……..... 72

Figure 27 : Profil chromatographique des standards commerciaux de tocophérols……..…… 83

Figure 28 : Profil chromatographique d'une co-injection de l'échantillon 5.2V avec le β-Toc (standard commercial)……..…. 83

Figure 29 : Profil chromatographique d'une coinjection de l'échantillon 4.3R avec le β-Toc (standard commercial)…….……. 83

Figure 30 : Profils chromatographiques des échantillons 5.2V et 4.1V……... 84

Figure 31 : Profils chromatographiques des échantillons 1.1N et 1.8N……..……. 85

Figure 32 : Profils chromatographiques des échantillons 4.3R et 3.3R…….……... 85

Figure 33 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*……. 95

Figure 34 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons verts 1.5V et 1.10V. Détection à 320 et 260 nm……..…….…….. 100

Figure 35 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons noirs 1.8N et 1.112. Détection à 320 et 260 nm……...……... 101

Figure 36 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons rouges 3.3R et 4.3R. Détection à 320 et 260 nm pour 4.3R et seulement à 260 nm pour 3.3R…….. 102

Figure 37 : Aspect du cercle d'ACP montrant la position des trois acides gras majoritaires de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*……..…….…... 104

Figure 38 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires établie par ACP……..... 105

Figure 39 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) selon la composition en acides gras……..….. 106

Figure 40 : Aspect du cercle d'ACP montrant la position des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* selon leurs proportions…….……..……. 107

Figure 41 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois isomères de tocophérols (selon leurs teneurs) établie par ACP…….. 108

Figure 42 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois isomères de tocophérols (selon leurs proportions) établie par ACP…….……. 109

Figure 43 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) selon la composition en tocophérols……..….. 110

Figure 44 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires et les trois isomères de tocophérols (selon la teneur) établie par ACP……..…….. 112

Figure 45 : Régression linéaire entre la teneur en α-Toc et le taux de l'acide linoléique……..… 113

Figure 46 : Aspect de l'huile des échantillons 5.A.RC1, 5.A.RF1 et 5.A.V1……. 114

Figure 47 : Aspect de l'huile des échantillons 5.A.RC2, 5.A.RF2 et 5.A.V2……. 115

Figure 48 : Variation de la teneur en huile des fruits de *Pistacia atlantica* (arbre A) selon la maturation…….... 116

Figure 49 : Aspect de la colonne après purification des EMAG sur gel de silice (exemples représentatifs en fonction de la couleur des fruits)……..……..……. 121

Figure 50 : Profils chromatographiques des échantillons 5.A.V2, 5.A.RF2 et 5.A.RC2…..……... 124

Figure 51 : Profils chromatographiques des échantillons 2.B.V et 2.B.RC2…….. 125

Figure 52 : Activité antioxydante des huiles des fruits matures et ceux de maturité intermédiaire…….... 128

Figure 53 : Activité antioxydante des huiles des fruits immatures et ceux de maturité intermédiaire…… 128

Figure 54 : Variation de l'activité antioxydante des huiles des fruits cueillis à partir du même arbre selon leur degré de maturation…… 129

Figure 55 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*…….……. 132

Figure 56 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons 5.A.RF1 et 5.A.RC2. Détection à 260 et 320 nm……..…….. 134

Figure 57 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons 5.A.RF2 et 5.A.V2. Détection à 260 et 320 nm……... 135

Figure 58 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminées par dosage colorimétrique, la teneur des tocophérols totaux déterminés par CLHP, la teneur de l'α-Toc et la teneur de γ-Toc de l'autre part…….…… 138

Figure 59 : Régression linéaire entre l'EC_{50} et la teneur en stérols totaux……. 139

Figure 60 : Régression linéaire entre la capacité équivalente du pouvoir antioxydant et la teneur en tocophérols totaux…..... 139

Figure 61 : Classification hiérarchique ascendante de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales selon la composition en acides gras…….……... 141

Figure 62 : Classification hiérarchique ascendante de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales selon la composition en tocophérols…….……..…. 142

Figure 63 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (G): 4.G.MEL et 4.G.MEL.2…..... 146

Figure 64 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (H): 6.H.MEL.1, 6.H.MEL.2 et 6.H.MEL.3…….. 147

Figure 65 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (B): 2.B.MEL.1, 2.B.MEL.2 et 2.B.MEL.3…….….. 148

Figure 66 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélange" de l'arbre (G)…….…….. 151

Figure 67 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélange" de l'arbre (H)…….…….. 151

Figure 68 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélange" de l'arbre (B)…….…….. 152

Figure 69 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminée par CLHP et la teneur de l'α-Toc de l'autre part…… 155

Figure 70 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*……. 158

Figure 71 : Variation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des huiles groupées selon le degré de maturation des fruits de *Pistacia atlantica*……..…….. 158

Figure 72 : Régressions linéaires entre, d'une part, activité antioxydante (DPPH et Molybdate Phosphate) et, respectivement, teneurs en phénols totaux et teneurs en flavonoïdes, de l'autre part, pour les extraits phénoliques des huiles groupées….…….…….……. 160

Figure 73 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*……...…… 161

Figure 74 : Variation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux selon le degré de maturation des fruits de l'arbre (B), et ceux de l'arbre (H)……...…….. 163

Figure 75 : Régression linéaire entre, d'une part, activité antioxydante (DPPH) et, respectivement, teneurs en phénols totaux et teneurs en flavonoïdes, de l'autre part, pour les extraits phénoliques des tourteaux……..... 165

Figure 76 : Modèle proposé pouvant expliquer la relation entre les acides gras insaturés et les tocophérols (Hussain *et al.*, 2013)…….…….. 170

Figure 77 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminée par CLHP et la teneur de l'α-Toc, de l'autre part, pour 35 échantillons de la première série d'étude…….……. 171

Figure 78 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en phénols totaux et la teneur des flavonoïdes, de l'autre part, pour 18 échantillons de la première série d'étude……. 174

Figure 79 : Distribution de 35 échantillons (verts, noirs et rouges) de la saison 2009 par rapport à la position de paramètres lipidiques et phénoliques établie par ACP…….…… 177

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique.

ABA : Acide abscissique.

Abs : Absorbance.

ABTS : 2,2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate.

ACP : Analyse des Composantes Principales.

ADN : Acide 2-désoxyribonucléique.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AG : Acide gras.

AGE : Acide gras essentiel.

AGI : Acide gras insaturé.

AGMI : Acide gras monoinsaturé.

AGPI : Acide gras polyinsaturé.

AGS : Acide gras saturé.

ALS : Sclérose latérale amyotrophique.

AP : Acide phosphatidique.

ARDS : Syndrome de détresse respiratoire aigue.

ATP : Adénosine triphosphate.

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT : Buthylhydroxtoluéne.

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique.

CAT : Catalase.

Chol : Cholestérol.

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

DAD : Détecteur à barrette d'iode (*Diode Array Detector*).

DAG : Diacylglycerol.

DMPD : N, N`- p-di-méthylique –phénylènediamine

DPG : Diphosphatidylglycérol.

$DPPH^{\bullet}$: Diphényl-2-picryl hydrazyl.

EAG : Equivalent en Acide Gallique.

EC : Equivalent en Cholestérol.

EC_{50} : *Efficient Concentration* (Concentration inhibitrice 50%).

Ech : Echantillon.

EE : Equivalent en vitamine E.

EMAG : Ester Méthylique d'Acide Gras.

ER : Equivalent en Rutine.

ERN : Espèce réactive de l'azote.

ERO : Espèce réactive de l'oxygène.

ETH : Ethylène.

FID : détecteur à ionisation de flamme.

FLD : Détecteur à fluorescence (*Fluorescence Detector*).

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*).

GGDP : Geranylgeranyldiphosphate.

GPX : Glutathion peroxydase.

$GS^{\bullet}$: Radical thyil.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathionedisulfide.

H : Huile.

HGA : Homogentisate (acide HGA)

4- HNE : 4-Hydroxynonenal

HOCl : Acide hypochloreux.

HPP : *p*-Hydroxyphénylpyruvate.

HPPD : *p*-Hydroxyphénylpyruvate dioxygénase.

HPT : Homogentisate phytyltransferase.

I.A : Indice d'acide.

I.I : Indice d'iode.

IL-1 : Interleukine 1

I.S : Indice de saponification.

In : Initiateur.

IP3 : Inositol triphosphate.

JA : Acide jasmonique.

$L^{\bullet}$: Radical de lipide.

LDL : Lipoprotéine de basse densité.

LOO • : Radical péroxyl

LOOH : Hydroperoxydes.

MDA : Malondialdéhyde.

2M6PBQ : 2-méthyl-6-phytylbenzoquinol.

MS : Matière sèche.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

$NO^{\bullet}$: Monoxyde d'azote.

$ONOO^{\cdot}$: Peroxynitrite.

ONOOH : Nitroperoxyde.

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).

PC : Phosphatidylcholine.

PDP : Phytyl diphosphate.

PE : Phosphatidyléthanolamine.

PG : Phosphatidylglycérol.

PI : Phosphatidylinositol.

PK : Point kilométrique.

PL : Phospholipides.

PrDP : Prenyldiphosphate.

PS : Phosphatidylsérine.

RN1 : Route nationale numéro 1.

RW230 : Route de wilaya numéro 230.

$ROO^{\bullet}$ ou $LOO^{\bullet}$: Radicaux peroxyls.

SA : Acide salicylique.

SOD : Superoxyde dismutase.

TC : Tocopherol cyclase.

TEAC : Capacité antioxydante équivalente de Trolox (*Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*).

γ-TMT : γ-Tocopherol methyltransferase.

TNF-α : *Tumor Necrosis Factor alpha.*

Toc : Tocophérol.

Sommaire

Introduction ……. 1

Partie 1 : Présentation bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur l'arbre

1. Présentation de *Pistacia atlantica*……. 3
2. Systématique de l'espèce…….. 4
3. Caractéristiques botaniques, physiologiques et anatomiques du Bétoum……. 4
4. Répartition géographique……. 6
4.1. Dans le monde……... 6
4.2. En Algérie……. 6
5. Intérêt de l'espèce……. 7
5.1. Pour les populations locales……... 7
5.2. Autres utilisations……. 7
5.2.1. Importance de l'espèce comme source de molécules biologiquement actives……... 7

Chapitre 2 : Généralités sur les matières grasses

1. Les acides gras……. 12
1.1. Classification des acides gras…… 13
1.1.1. Les acides gras saturés (AGS) ……... 13
1.1.2. Les acides gras insaturés (AGI) …… 13
1.1.3. Les acides gras essentiels (AGE) ……. . 14
1.1.4. Autres acides gras……... 14
1.2. Propriétés physicochimiques des acides gras…… 15
1.3. Rôles biologiques des acides gras…….……... 15
2. Lipides simples (Homolipides) ……. …….. 15
3. Lipides complexes (Hétérolipides) …….. 16
3.1. Glycérophospholipides…….. 16
3.2. Glycéroglycolipides……... 16
3.3. Sphingolipides……... 16
4. Lipides polyisoprèniques…….. 17
4.1. Stérols et stéroïdes……. 17
4.1.1. Dérivés des stérols chez les végétaux…… 18
4.2. Tocophérols……..…… 18
4.2.1. Biosynthèse des tocophérols……... 19

Chapitre 3 : Généralités sur les composés phénoliques

1. Définition…….. 21
2. Structure de polyphénols végétaux…….. 21
3. Classification des composés phénoliques……. 24
3.1. Les polyphénols monomériques…… 24
3.1.1. Les acides phénoliques……... 24

3.1.2. Les flavonoïdes…….. 24
3.2. Les polyphénols sous forme de polymères…… 24
3.2.1. Les tanins……..... 24
3.2.2. Lignines ……..... 25
4. Biosynthèse des composés phénoliques……... 25
4.1. La voie de shikimate…….. 25
4.2. La voie de phénylpropanoide……..... 26
4.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes……. 28
5. Rôles et intérêts des composés phénoliques……. 29
5.1. Pour la plante……..... 29
5.2. Propriétés bénéfiques des composés phénoliques……. 29
5.2.1. Activité antioxydante des polyphénols……... 29
5.2.2. Inhibition enzymatique……..... 30
6. Propriétés thérapeutiques des polyphénols…….. 31

Chapitre 4 : Oxydants, stress oxydatif et antioxydants
1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène…… 32
1.1. Définition……..... 32
1.2. Formation des EROs……..... 33
1.3. Quelques espèces réactives de l'oxygène…….. 33
1.3.1. Oxygène singulet O_2^*……..... 33
1.3.2. Super-oxyde $O_2^{\cdot -}$ ……..... 33
1.3.3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2……..... 33
1.3.4. Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) ……..... 34
1.3.5. Oxyde de nitrogène $NO^{\cdot}$ et le peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$ ……..……..…… 34
1.4. Origines des EROs……..... 35
1.4.1. Origines exogènes……..... 35
1.4.2. Origines endogènes……..... 35
1.5. Les espèces réactives de l'oxygène dans les systèmes biologiques…… 36
2. Stress oxydatif……..... 37
2.1. Implication du stress oxydatif dans la pathologie et dans le vieillissement…….. 38
2.1.1. Rôle dans l'inflammation……..... 38
2.1.2. Rôle dans le vieillissement……..... 39
3. Oxydation des lipides…….. 40
3.1. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides……. 40
4. Oxydation des protéines……..... 41
5. Oxydation des acides nucléiques……..... 42
6. Les antioxydants……..... 42
6.1. Les systèmes enzymatiques antioxydants……. 43
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) ……..... 43
6.1.2. Les catalases (CAT) ……..... 43
6.1.3. La glutathion peroxydase (GPX) ……..... 43
6.2. Les antioxydants moléculaires……..... 44
6.2.1. Les antioxydants endogènes……..…… 44

6.2.1.1. Le glutathion…... 44
6.2.2. Les antioxydants exogènes……..…….. 45
6.2.2.1. La vitamine E (ou α-tocophérol) ……..….. 45
6.2.2.2. La vitamine C (ou acide ascorbique) ……. 45
6.2.2.3. Les polyphénols……..……. 45
6.2.2.4. Les antioxydants synthétiques……..……... 45
7. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*……... 46

Partie 2 : Matériel et méthodes

Chapitre 1 : Cueillette 2009

1. Matériel biologique…….. 49
1.1. La récolte des échantillons……. 49
2. Méthodes …….. 51
2.1. Extraction des huiles ……. 52
2.2. Analyse des acides gras……. 53
2.2.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ……..…. 53
2.2.2. Analyse des esters d'acides gras par CPG…….…… 53
2.3. Dosage des tocophérols totaux……. 54
2.4. Analyse des tocophérols par CLHP…….. 54
2.5. Évaluation du pouvoir antioxydant des huiles par le test au DPPH…….…… 55
2.6. Extraction, dosage, activité antioxydante et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux……. 56
2.6.1. Extraction des composés phénoliques…… 56
2.6.2. Dosage des phénols totaux…….. 57
2.6.3. Dosage des flavonoïdes…….. 57
2.6.4. Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts par le test au DPPH……. 58
2.6.5. CLHP des composés phénoliques.…… 58
3. Analyse statistique des données…… 58

Chapitre 2 : Cueillettes 2011

1. Matériel biologique…….. 59
1.1. La récolte des échantillons…… 59
2. Méthodes…….. 61
2.1. Extraction des huiles…….. 62
2.2. Analyses chimiques des huiles……. 62
2.2.1. Détermination de l'indice d'acide……... 62
2.2.2. Détermination de l'indice de saponification…….. 62
2.2.3. Détermination de l'indice d'iode (II) …….. 63
2.3. Analyse des acides gras……. 63
2.4. Estimation de la fraction insaponifiable…… 63
2.5. Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles…… 64
2.5.1. Dosage des stérols totaux……... 64

2.5.2. Dosage des tocophérols totaux…….. 64
2.5.3. Analyse des tocophérols par CLHP…… 64
2.6. Évaluation du pouvoir antioxydant…… 64
2.6.1. Test au DPPH…… 65
2.6.2. Test au Molybdate Phosphate…… 65
2.7. Extraction, dosage et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux ……. 65
3. Analyse statistique des données……..……. 65

Chapitre 3 : Cueillettes 2013

1. Matériel biologique…….. 66
1.1. La récolte des échantillons……. 66
2. Méthodes……... 69
2.1. Extraction et étude des huiles……..... 71
2.1.1. Première partie : Etude individuelle des 21 échantillons huileux……. 71
2.1.2. Deuxième partie : Etude de cinq échantillons obtenus après groupement des huiles. 71
2.1.2.1. Etude des échantillons huileux…...…….. 71
2.1.2.2. Extraction des composés phénoliques à partir de l'huile…… 72
2.1.2.3. Analyses quantitatives des composés phénoliques…….. 73
2.2. Extraction, dosage et activité antioxydante des extraits phénoliques à partir des tourteaux……..…… 73
3. Analyse statistique des données……..……. 73

Partie 3 : Résultats et discussion

Chapitre 1 : Cueillette 2009

1. Teneur en huiles…… 74
2. Analyse des acides gras par CPG……. 76
3. Teneurs en tocophérols totaux……. 81
4. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP……. 82
5. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* par le test au DPPH….. 90
6. Dosage, activité antioxydante et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux.. 92
6.1. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes…….. 93
6.2. Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts…….. 97
6.3. Profils chromatographiques des composés phénoliques de quelques échantillons représentatifs…… 98
7. Analyse statistique des données relatives à la composition en acides gras et en tocophérols……..... 103
7.1. Analyse statistique des données relatives à la composition en acides gras…… 103
7.2. Analyse statistique des données relatives à la composition en tocophérols…….…….... 106
7.3. Analyse statistique simultanée des données relatives à la composition en acide gras et en tocophérols……..…… 110

Chapitre 2 : Cueillettes 2011

1. Teneur en huiles et indices chimiques…….. 114
2. Analyse des acides gras par CPG……. 118
3. Détermination de la fraction insaponifiable dans deux échantillons représentatifs…….. 120
4. Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles……... 121
4.1. Teneurs en stérols totaux……... 121
4.2. Teneurs en tocophérols totaux……... 123
4.3. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP……... 124
5. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……... 127
5.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH……. 127
5.2. Evaluation du pouvoir réducteur par le test au Molybdate Phosphate……... 130
6. Dosage et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux……..…….. 131
7. Etude statistique…… 136
7.1 Régressions linéaires entre l'activité antioxydante et la teneur en tocophérols et stérols…… 136
7.2 Comparaison de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales…. 139

Chapitre 3 : Cueillettes 2013

1. Teneur en huiles…… 143
2. Teneurs en tocophérols totaux…….. 144
3. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP…….. 146
4. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*……... 151
4.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH……. 151
4.2. Evaluation du pouvoir réducteur par le test au Molybdate Phosphate…… 153
4.3. Régressions linéaires entre teneurs en tocophérols et pouvoir antioxydant…….. 154
5. Etude de cinq échantillons d'huiles groupées sans et après extraction phénolique……. 155
6. Extraction, dosage et activités antioxydantes des composés phénoliques à partir des échantillons groupés d'huile de *Pistacia atlantica*…….…… 156
7. Dosage et activités antioxydantes des extraits phénoliques à partir des tourteaux…. 160

Discussion générale

1. Résultats relatifs à l'huile pour l'ensemble des fruits cueillis……... 166
2. Résultats relatifs aux tourteaux pour l'ensemble des fruits cueillis…….……... 172
3. Synthèse des résultats relatifs aux huiles et aux tourteaux…….…… 175

Conclusion générale……. 178

Références bibliographiques…… 181

Annexes

Introduction

Introduction

Le recours aux plantes médicinales a, depuis fort longtemps, été un moyen pour faire face aux problèmes liés à la santé, au vieillissement et à l'esthétique. Les vertus de ces plantes ne sont, aujourd'hui, plus à démontrer. Elles constituent la source majeure de nombreux antioxydants naturels.

L'Algérie, le plus grand pays d'Afrique, recèle une flore très diversifiée. Une des espèces végétales qui n'a pas encore livré tous ses mystères est *Pistacia atlantica* Desf. ou Pistachier de l'Atlas. C'est une espèce très présente au niveau de la région de Laghouat. Les huiles de ses fruits font souvent partie des recettes des grand-mères.

Pistacia atlantica est qualifiée comme une espèce précieuse en raison de ses diverses utilisations **(Monjauze, 1980 ; Belhadj, 2001)**. En outre, de nombreux travaux expérimentaux ont mis l'accent sur des vertus de cette plante liées à la composition de l'huile de ses fruits **(Yousfi *et al.*, 2002, 2003 et 2005)**, à sa richesse en composés phénoliques **(Mosharrafa *et al.*, 1999)** et à l'activité antioxydante de ses extraits **(Gourine *et al.*, 2010 ; Peksel *et al.*, 2013)**.

L'activité antioxydante des extraits des plantes suscite un intérêt particulier. Un tel intérêt est d'autant plus grand que le monde connait actuellement une recrudescence accrue des maladies liées à des processus d'oxydation tels que les maladies dégénératives (inflammatoires ou non) et l'athérosclérose **(Uttara *et al.*, 2009 ; Victor *et al.*, 2009)**. En effet, durant un stress oxydatif, de très grandes quantités en espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées. Ces espèces peuvent attaquer des molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques **(Halliwell *et al.*, 1992)**. Par ailleurs, les EROs sont impliquées directement dans les processus du vieillissement cellulaire **(Sastre *et al.*, 2000)**. Dans de telles situations, les antioxydants endogènes ne sont pas suffisants pour neutraliser ces EROs. L'apport exogène d'antioxydants naturels est alors nécessaire pour le maintien d'un équilibre oxydants/antioxydants. De plus, les antioxydants naturels ont, en général, moins d'effets secondaires par rapport à ceux de synthèse.

Les activités biologiques d'extraits de plantes sont dues à des molécules bioactives dont le niveau quantitatif ainsi que l'activité pourraient être influencés par des facteurs

multiples tels que le degré de maturation des fruits, l'emplacement géographique de la plante et la variation de saisons.

Dans la littérature, très peu de données sont disponibles sur la variation de la composition ainsi que de l'activité des extraits de fruits de *Pistacia atlantica* en fonction notamment de leur degré de maturation.

Le présent travail se veut une continuité logique des travaux entrepris par le Pr Yousfi et son équipe il y a plus de deux décennies et s'inscrivant dans le cadre de connaissance et valorisation de produits naturels. Dans cette optique, nous nous sommes proposés d'étudier la composition et l'activité antioxydante des extraits huileux et phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica*, issus de plusieurs régions de Laghouat et d'Ain Ouassara, en fonction de leur degré de maturation. Une telle démarche pourrait apporter un surcroît de connaissance utile et exploitable pour d'éventuelles applications.

La présenté étude est répartie en trois parties principales. Dans une partie bibliographique, sera exposé le contexte de l'étude mettant en exergue l'état de connaissance sur l'arbre, les lipides, les composés phénoliques ainsi que les oxydants/antioxydants. Dans la partie expérimentale, nous développons les démarches expérimentales employées pour l'étude des huiles et des tourteaux. Pour les huiles, nous nous somme intéressés au rendement d'extraction, à la détermination de quelques indices chimiques, à l'analyse des acides gras par CPG, au dosage des stérols totaux et des tocophérols totaux par spectrophotométrie, à l'analyse chromatographique des tocophérols individuels, à la recherche et au dosage de composés phénoliques ainsi qu'à l'activité antioxydante. Pour les tourteaux, il a été question de l'extraction phénolique, du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes et de l'activité antioxydante des extraits phénoliques. Une CLHP a été réalisée pour les composés phénoliques de ces extraits.

Enfin, dans la troisième partie, nous rapportons l'ensemble des résultats obtenus avec discussion. Une analyse de données par le logiciel XLSTAT est également rapportée.

Partie 1 :
Présentation bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur l'arbre

1. Présentation du *Pistacia atlantica*

Le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) ; *Elbetoum*, *Botma*, *Betouma* ou *Boutma* en Arabe local et *Iggh* en Berbère, est un bel arbre, existant à l'état disséminé dans plusieurs régions d'Algérie **(Monjauze, 1980)**.

Le nom commun de cette espèce se rapporte aux montagnes d'atlas ou cette espèce se développe. Cet arbre est également connu comme le pistachier sauvage, faux pistachier **(Baba aissa, 1999)**.

Le genre *Pistacia* est représenté en Algérie par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus, Pistacia terebinthus, Pistacia vera* et *Pistacia atlantica*.

Le Pistachier vrai (*Pistacia vera*) et le Pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*) ou *bétoum* sont caractérisés de point de vue écologique par une grande tolérance aux variations climatiques, ils peuvent croître sous des tranches pluviométriques assez faibles et s'accommodent de tous les sols.

Le Pistachier de l'Atlas est une espèce assez commune en Algérie, mais il trouve son optimum dans les régions arides et semi-arides, notamment les Hautes-Plaines où il prospère dans les lits d'Oueds et les Dayas. C'est une plante xérophile rustique, qui participe à la lutte contre la désertification **(Chebouti-Meziou *et al.*, 2011)** (Figure 1).

Figure 1: Photographie illustrant l'arbre du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) (Photo prise par Guenane H le 17 otobre 2009).

2. Systématique de l'espèce

Selon les données rapportées par la littérature **(Zohary, 1952 ; Harfouche *et al.*, 2005 ; Thorne et Reveal, 2007 ; Al-Saghir et Porter, 2012)**, *Pistacia atlantica* Desf. est classé taxonomiquement de la façon suivante :

Règne : Végétal.

Sous-règne : Viridiplantae.

Embranchement : Phanérogames.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Ordre : Sapindales.

Famille : Anacardiacées.

Genre : *Pistacia*.

Espèce : *Pistacia atlantica* Desf.

Le Pistachier de l'atlas peut être classé en quatre sous-espèces, à savoir *mutica*, *cabulica, kurdica* et *atlantica* ; cette dernière est présente en Afrique du Nord **(Benhssaini et Belkhodja, 2004)**. Ces mêmes sous-espèces présentent une même formule chromosomique de 2n= 28 **(Ghaffari *et al.*, 2003)**.

3. Caractéristiques botaniques, physiologiques et anatomiques du Bétoum

C'est un grand arbre résineux, puissant, dioïque, à feuilles caduques et pouvant atteindre 15 à 20 m de hauteur. Il est à noter que les grands sujets peuvent atteindre facilement les 1000 ans **(Benabid, 2000 ; Benhssaini et Belkhodja, 2004)**.

D'après Monjauze (1980), le bétoum se distingue par la production de résine qui est d'autant plus abondante que la température de l'environnement est élevée.

Quelques caractéristiques de la plante :

- Les fruits sont appelés *ElKhodiri* par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur verte foncée à maturité. Ce sont des drupes comestibles,

légèrement ovales et aplaties, riches en huile dense très énergétique **(Baba aissa, 1999 ; Belhadj, 2001)** (Figure 2). Le fruit contient un seul noyau osseux ne contenant qu'une seule graine, il atteint sa maturité à partir de Septembre **(Harfouche *et al.*, 2005)**.

Figure 2 : Photographie illustrant les fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) (Photo prise par Guenane H le 16 aout 2013).

- Feuille composée imparipennée (nombre de folioles impair).
- Inflorescence en grappe composée.

De par sa dioïcie et ses fleurs nues, *Pistacia atlantica* constitue une espèce particulière des Anacardiacées **(Gaussen *et al.*, 1982)**. Mais quelques pieds, exceptionnellement monoïques, ont été rencontrés dans les montagnes de Yunt de la Province de Mania en Turquie **(Kafkas *et al.*, 2001)**.

De point de vue écologique, l'arbre résiste à la chaleur mais redoute le froid et l'humidité atmosphérique. En Afrique du Nord, il trouve son optimum dans les bioclimats arides et semi-arides à hivers frais à chauds, mais il vient également dans les bioclimats humides et subhumides à hivers frais à doux **(Harfouche *et al.*, 2005)**.

Cette espèce forestière s'accommode de tous les sols, exceptés du sable. Elle se contente d'une faible pluviométrie de l'ordre de 150 mm et parfois moins **(Benhssaini et Belkhodja, 2004)**.

Les études anatomiques concernant le Pistachier de l'Atlas sont rares. Toutefois, il a été rapporté que les coupes anatomiques des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. ont permis d'observer certains caractères adaptatifs **(Kadi-Bennane, 2005)**.

4. Répartition géographique

4.1. Dans le monde

Le genre *Pistacia*, appartenant à la famille des Anacardiacées qui comprend nombreuses espèces très répandues dans la Méditerranée et le Moyen-Orient **(Kaska *et al.,* 1996)**.

L'aire de *Pistacia atlantica* s'étend depuis les iles des Canaries à l'Oust jusqu'au proche Orient vers l'Est. On signale sa présence aux iles des Canaries, au Maroc, en Tunisie, en Libye, en Egypte, en Palestine, en Jordanie, en Syrie, en Turquie et en Grèce. Le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) est un arbre surtout caractéristique des régions arides du sud de la Méditerranée, essentiellement présent au Maghreb, mais aussi en Cyrénaïque, à Chypre, au Proche-Orient et aux Canaries **(Quézel et Médail, 2003)**.

4.2. En Algérie

Plusieurs espèces endémiques de *Pistacia* colonisent le territoire algérien (*Pistacia lentiscus, Pistacia therebintus* et *Pistacia atlantica*). Ils se rencontrent dans la plupart des zones semi-arides ou steppiques, solitaire ou en association avec *Ziziphus lotus* Jujubier (*Cedra* en arabe local) et *Pinus halepensis* (Pin d'Alep) **(Benabderrahmane *et al.,* 2009)**.

Sous le méridien d'Alger, le bétoum se fait rare dans les chaines littorales et subittorales, il est cependant signalé dans l'Atlas Mitidjien au sud-ouest de l'Araba, dans les Béni-Zermane, vers 800 m d'altitude immédiatement au-dessus de l'Araba, à 950 m d'altitude **(Monjauze, 1968)**.

Selon Monjauze (1980), il existe à l'état disséminé dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaâd) et Ghardaïa (dans l'ouest du M'zab).

Au sud de l'Atlas saharien, le bétoum est très généralement distribué dans Ain Sefra, à Laghouat, Mzab **(Monjauze, 1968)** et Hoggar **(Chenoune, 2005)** …etc.

Il est important de noter que le pistachier de l'Atlas se régénère et pousse toujours à l'intérieur du *Ziziphus lotus* qui constituerait une bonne protection aux jeunes pousses contre les vents et le pâturage. En plus de cela, le sol où les feuilles du *Ziziphus lotus* tombent deviendrait acide et faciliterait la germination des graines **(Belhadj, 2001)**.

5. Intérêt de l'espèce

5.1. Pour les populations locales

Le Pistachier de l'Atlas peut être utilisé comme espèce fourragère, son bois est utilisé comme bois d'œuvre et aussi de chauffage. Le suintement du tronc est utilisé dans la tannerie des peaux **(Chebouti-Meziou *et al.*, 2011)**.

Les fruits de bétoum sont riches en huile dense très énergétique. L'huile est souvent mélangée aux dattes écrasées et peut être consommée à toute heure de la journée avec du petit lait. L'huile a un goût très proche de celui du beurre, elle est très appréciée dans la région. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes **(Belhadj, 2001)**.

Les populations locales utilisaient autrefois la résine du Pistachier comme un chewing-gum. La pharmacie s'en est longtemps servie pour la fabrication d'onguents comme masticatoire contre les infections stomacales et comme antiseptique pour voies respiratoires **(Benabderrahmane *et al.*, 2009)**.

5.2. Autres utilisations

Les espèces du genre *Pistacia* sont largement utilisées dans les industries agroalimentaires. La résine du Pistachier est utilisée dans la production de colle, dans la restauration des œuvres d'art en verre, en porcelaine, en bois et en métal. Elle est aussi utilisée dans les préparations de certains produits cosmétiques et en parfumerie, comme ingrédient en odontologie conservatrice.

5.2.1. Importance de l'espèce comme source de molécules biologiquement actives

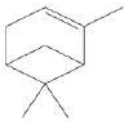
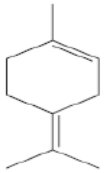
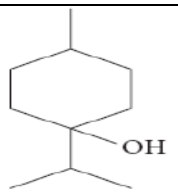
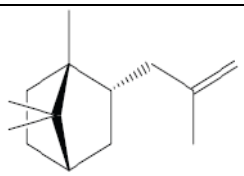
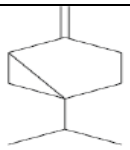
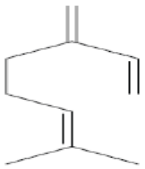
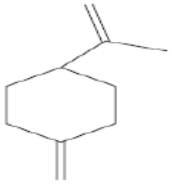
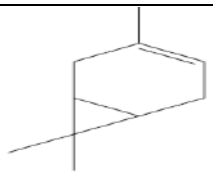
Les vertus thérapeutiques de cette plante, connues par les populations locales ainsi que l'utilisation de ses différentes parties dans le traitement de plusieurs symptômes et maladies comme l'eczéma, la paralysie, les diarrhées, les infections de la gorge, les

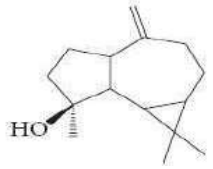
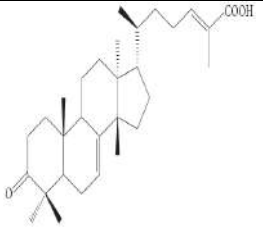
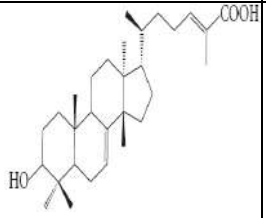
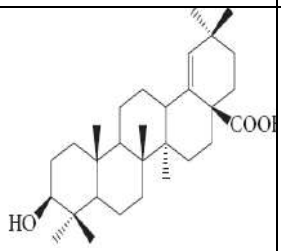
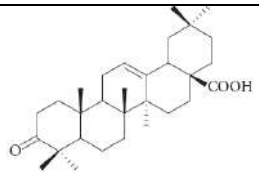
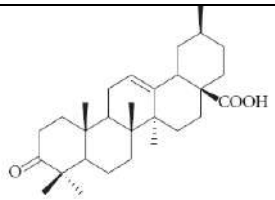
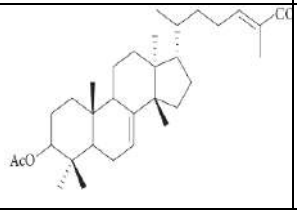
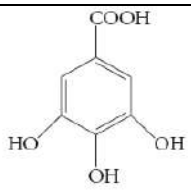
calculs rénaux et l'asthme **(Benabderrahmane *et al.*, 2009 ; Bozorgi *et al.*, 2013)** ont incité les chercheurs à s'y intéresser de très près. Ainsi, de nombreuses activités ont été mises en évidence et de nombreuses molécules ont été isolées et caractérisées. Nous citons à titre d'exemple l'activité antioxydante **(Gourine *et al.*, 2010 ; Peksel *et al.*, 2013 ; Hatamnia *et al.*, 2014)**, l'activité antimicrobienne **(Gerchman et Inbar, 2011)**, l'activité antiparasitaire **(Adams *et al.*, 2009 ; Taran *et al.*, 2010)**, l'activité antiinflammatoire, antipyrétique et analgésique **(Benabderrahmane *et al.*, 2009 ; Saud Ahmad *et al.*, 2010)** et en dernier lieu l'activité anti cancéreuse **(Rezaei *et al.*, 2012[a] ; 2012[b])**.

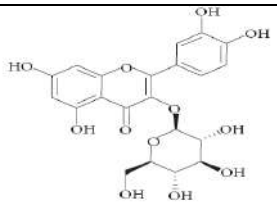
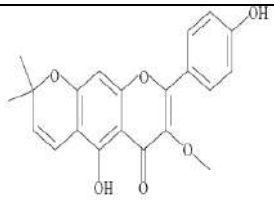
Ces activités seraient dues vraisemblablement à des composés contenus dans de différents extraits tels que l'huile **(Yousfi *et al.*, 2002, 2003, 2005 ; Benhassaini *et al.*, 2007)**, les huiles essentielles **(Gourine *et al.*, 2010 ; Peksel *et al.*, 2013)** et les extraits phénoliques **(Mosharrafa *et al.*, 1999 ; Hatamnia *et al.*, 2014)**.

De nombreuses molécules ont été isolées à partir de *Pistacia atlantica*. Le tableau 1 en expose quelques unes.

Tableau 1 : Quelques composés chimiques isolés à partir de *Pistacia atlantica* **(*in* Bozorgi *et al.*, 2012)**.

Monoterpènes, Sesquiterpènes et huiles essentielles		
Nom du composé	Structure chimique	Partie de la plante
α-pinene		Feuille, fruit, galle et résine
Terpinolene		Feuille
Terpinen-4-ol		Feuille, fruit
Acétate de Bornyl		Fruit
Sabinene		Feuille, fruit
Myrcene		Feuille, fruit
p-Mentha-1(7),8 diene		Feuille,
12 Δ^3-carene		Galle

22 Spathulénol		Feuille
Triterpènes		
Acide masticadienonique		Résine
Acide masticadienolique		Résine
Acide morolique		Résine
Acide oléanolique		Résine
Acide ursonique		Résine
Acide 3-O-Acétyl-3-epiisomasticadienolique		Résine
Composés phénoliques		
Acide gallique		Feuille, galle

Quercetine-3-glucoside		Parties aériennes
3-Methoxycarpachromene		Parties aériennes

Chapitre 2 : Généralités sur les matières grasses

Les lipides forment un vaste groupe de substances d'origine biologique qui se dissolvent aisément dans les solvants organiques comme l'acétone, le méthanol, le chloroforme et le benzène mais sont peu ou pas solubles dans l'eau.

Les lipides peuvent être classés selon des critères variés comme la structure chimique, leur rôle, leur charge,…etc. La classification la plus courante est selon la structure biochimique où on distingue :

- Les lipides simples ou homolipides ;
- Les lipides complexes ou Hétérolipides ;
- Les lipides isoprèniques et icosanoïdes.

1. Les acides gras

Les acides gras sont les constituants de base des triglycérides, représentants majoritaires de la classe des lipides. Ils sont constitués exclusivement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Le poids d'une molécule type d'acide gras est réparti entre ces trois éléments selon les proportions 76 %, 12,7 % et 11,3 %. Les atomes de carbone sont reliés les uns aux autres pour former une chaîne dont la longueur varie de 4 à 30 atomes de carbone, généralement un nombre pair, puisque la biosynthèse des acides gras implique l'acétyl-coenzyme A, une coenzyme porteuse d'un groupement qui contient deux atomes de carbone. Les acides gras sont les constituants majeurs de plusieurs lipides comme les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides **(Brisson, 1982)**.

Les acides gras sont des monoacides carboxyliques aliphatiques ou ramifiés, présentant des chaînes d'au moins 4 carbones plus ou moins insaturées.

La notation des chimistes place la première liaison en Δ à partir du carboxyle ce qui permet d'apprécier la double liaison proche du groupement réactif COOH. Par exemple : l'acide linoléique est le 18:2, 2x9, 12.

Le biochimiste et le physiologiste placent la première double liaison à partir du groupement méthyle déterminant la famille métabolique, notée ω. Une double liaison étant toujours séparée de la suivante par 2 liaisons simples (enchainement divinyl méthane) soit 3 atomes de carbone, les autres doubles liaisons sont déduites de la première en ajoutant le chiffre 3 **(Spielmann et Mendy, 1993)**.

1.1. Classification des acides gras

Les acides gras sont classés en trois groupes essentiels selon leur structure chimique, mais cela n'exclut pas la présence d'autres groupes.

1.1.1. Les acides gras saturés (AGS)

Les acides gras saturés naturels constituent une série continue d'acides gras à nombre pair de C allant généralement de 4 à 30.

- Les acides gras à chaînes courtes (de 4 à 10 C) sont surtout présents dans le beurre où l'acide butyrique est très majoritaire ;

- Les acides gras à chaînes moyennes (de 12 à 18 C) et longues (20 C et plus) constituent les graisses et huiles d'origine animale et végétale. Les acides palmitique et stéarique sont très majoritaires et représentent les deux plus importants acides gras saturés alimentaires.

Les AGS naturels sont soit liquides, soit solides à la température ordinaire selon la longueur de leur chaîne hydrocarbonée. Tous les acides gras à chaînes courtes sont liquides à 37 °C alors que les autres acides gras sont solides.

1.1.2. Les acides gras insaturés (AGI)

Les acides gras insaturés possèdent une double liaison (monoinsaturés AGMI) ou plusieurs (polyinsaturés AGPI). L'acide oléique est un AGMI très répandu ; il représente 70 à 80 % des acides gras contenus dans l'huile d'olive. Les acides linoléique et α-linolénique sont des AGPI importants surtout présents dans les graines oléagineuses à l'origine des huiles végétales.

Les AGI naturels courants sont liquides à la température ordinaire de 25 °C. On constate que la température de fusion d'un acide gras s'abaisse lorsque le nombre de doubles liaisons augmente.

Depuis quelques années on souligne l'importance de l'apport des acides gras insaturés indispensables notamment oméga-3 (ω-3) et, à moindre degré, oméga-6 (ω-6) dans 1'alimentation humaine, notamment pour la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Les principaux acides gras du groupe oméga-3 sont : l'acide α-linolénique (18:3), l'acide eicosapentaénoïque (20:5) et l'acide docosahexaénoïque (22:6).

Les omégas-3 peuvent être transformées par l'intermédiaire de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase en molécules impliquées dans la signalisation comme les

prostaglandines, les thromboxanes ou les leucotriènes.

Dans le groupe oméga-6, on distingue notamment l'acide linoléique (18:2), l'acide eicosadiénoïque et l'acide arachidonique (20:4) **(Hibbeln *et al.*, 2006 ; Von Schacky, 2006 ; Barcelo-Coblijn et Murphy, 2009)**.

Si, chez les Mammifères, les acides gras polyinsaturés peuvent avoir jusqu'à 22 carbones et 6 doubles liaisons, dans le règne végétal, ces acides ne dépassent pas 18 carbones et 4 doubles liaisons.

1.1.3. Les acides gras essentiels (AGE)

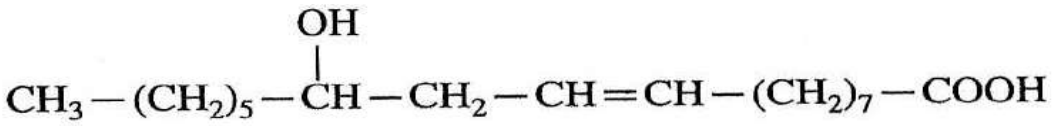
Les acides linoléiques et α-linolénique sont des AGPI importants pour l'édification et le fonctionnement de l'organisme humain : ils sont dits essentiels. Ces deux AGPI ne peuvent être synthétisés par les cellules humaines et doivent être présents dans la ration alimentaire: ils sont donc indispensables. Cette incapacité de synthèse est liée à la mise en place des doubles liaisons réalisée grâce à l'intervention d'enzymes appelés « désaturases » : il n'existe pas dans les cellules humaines de désaturases capables de positionner des doubles liaisons Δ au-delà du C9 alors qu'elles existent dans les cellules végétales et en particulier chez les plantes oléagineuses **(Déroanne *et al.*, 1976 ; Cuvelier *et al.*, 2004).**

Un rapport de la FAO reconnaît comme essentiels dans l'alimentation humaine les acides gras suivants : 18:2 ω6, 18:3 ω3, 20:4 ω6, et 20:5 ω3 **(FAO, 2010)**.

1.1.4. Autres acides gras

- **Acides gras hydroxylés**

Les végétaux sont capables de synthétiser toute une série d'acides gras hydroxylés comme par exemple l'acide ricinoléique :



On trouve des acides gras hydroxylés en C16 ou C18 dans les polymères qui constituent la cutine (dans les feuilles) et la subérine (dans les tiges) des plantes.

Chez les Mammifères, on trouve d'autres types d'acides gras hydroxylés.

On trouve aussi des acides gras hydroxylés comme intermédiaires dans la β-oxydation des acides gras **(Drigues *et al.*, 1981)**.

- **Acides gras ramifiés**

Les acides gras les plus courants comportent une ramification (méthyl, éthyl) placée

sur la chaîne hydrocarbonée. A titre d'exemple, on cite l'acide-15-méthylhexadécénoïque (particulièrement abondant chez les bactéries $Gram^{+}$) et l'acide phytanique (acide 3,7, 11, 15 tetraméthyl-hexa-décanoïque) d'origine végétale **(Laudat, 1972)**.

1.2. Propriétés physicochimiques des acides gras

La solubilité et le point de fusion constituent les deux principales propriétés physiques des acides gras.

Outres les propriétés chimiques connues, les acides gras (particulièrement les insaturés) sont caractérisés par leur susceptibilité à l'oxydation qui peut être d'origine enzymatique ou non.

Les oxygénations enzymatiques, par différentes oxygénases, de l'acide arachidonique conduisent aux médiateurs des familles des prostaglandines, leucotriènes et tromboxanes **(Hemler *et al.*, 1976 ; Stolyhwo, 2007)**.

1.3. Rôles biologiques des acides gras

Les acides gras jouent quatre rôles biologiques majeurs :

- ✓ Ils sont utilisés pour former des glycérophospholipides et des sphingolipides qui sont des constituants essentiels des membranes biologiques ;
- ✓ De nombreuses protéines sont modifiées par covalence par des acides gras. Le myristate (C14:0) et le palmitate (C16:0) sont directement attachés à quelques protéines, tandis que le phosphatidylinositol est lié par covalence aux extrémités C terminales d'autres protéines par l'intermédiaire d'une structure glycosylée complexe ;
- ✓ Les acides gras étant stockés sous forme de triacylglycérols pour agir comme des molécules carburant. Ils sont dégradés pour générer de l'énergie ;
- ✓ Certains dérivés d'acides gras jouent le rôle de messagers (comme les prostaglandines) et de seconds messagers intercellulaires (tels que le DAG et l'IP3).

2. Lipides simples (Homolipides)

Les lipides simples encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool :

- **Acylglycérols** (ou glycérides) sont des esters du glycérol.
- **Cérides** sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras).
- **Stérides** sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

3. Lipides complexes (Hétérolipides)

Les lipides complexes sont des lipides simples liés à des molécules de sucre, d'acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore ou du soufre. Ils sont classés par rapport à la molécule qui fixe les acides gras:

Soit le glycérol qui se distingue des Acylglycérols par l'hétérogroupe et qui sont subdivisés en :

- Glycérophospholipides.
- Glyceroglycolipides.

Soit une base sphingoïde (dialcool aminé) qui définit les sphingolipides.

3.1. Glycérophospholipides

Les phospholipides ont une partie hydrophobe constituée par deux chaînes d'acides gras et une partie hydrophile, représentée par le groupement phosphate, qui peut être liée à une autre molécule telle que la choline. L'élément de base des glycérophospholipides est l'acide phosphatidique (PA), formé d'un noyau glycérol, de deux acides gras et d'un groupement phosphate (H_3PO_4).

Les carbones C1 et C2 du noyau de glycérol portent les acides gras et le carbone C3 porte le groupement phosphate. L'acide phosphatidique estérifié par un alcool chargé positivement, tel que l'ethanolamine ou la choline, neutre, tel que la sérine ou le glycérol, ou chargé négativement, tel que l'inositol 4,5-bisphosphate ; cet alcool constitue une tête polaire. Les phospholipides constitutifs des biomembranes sont phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl éthanolamine (PE), phosphatidyl glycérol (PG), phosphatidyl sérine (PS) et phosphatidyl inositol (PI) **(Stolyhwo, 2007)**.

3.2. Glycéroglycolipides

Les alcools des carbones C1 et C2 du glycérol sont estérifiés par des acides gras et l'alcool du carbone C3 à la différence des glycérolipides n'est pas estérifié, mais il est lié à un ose par une liaison glycosidique (avec le carbone anomérique de l'ose).

3.3. Sphingolipides

Le squelette à partir duquel sont constitués ces lipides n'est pas le glycérol mais une diolamine à chaîne longue carbonée de type sphingoïde (molécule à 18 C possédant deux fonctions alcools en C1 et C3 et une fonction amine en C2). La fixation d'un acide gras sur le groupe amine donne un céramide qui est la molécule précurseur des lipides de ce groupe. La classification des sphingolipides est basée sur la nature du groupement R2 liée à l'hydroxyle **(Weinman et Mehul, 2004)**.

4. Lipides polyisopréniques

Les lipides isopréniques, dont toutes les molécules sont dérivées de l'isoprène (2-méthyl 1,3 butadiène = C_5H_8), regroupent les stérols et les vitamines liposolubles.

Chez les végétaux, le métabolisme des isoprènes est très divers et conduit à de nombreuses substances odorantes ou à des huiles essentielles.

Contrairement aux lipides des autres groupes, ces lipides, sans liaison ester, ont en commun la propriété de ne pas être altérés par un traitement alcalin de saponification d'où le terme d'insaponifiable également utilisé pour les qualifier.

4.1. Stérols et stéroïdes

Les stérols et les stéroïdes sont formés par la fusion de quatre cycles hydrocarbonés, trois de type cyclohexanique (les cycles A, B et C) et un de type cyclopentanique (le cycle D) (Figure 3).

Chez les Eucaryotes, tous les stérols, et donc leurs dérivés, sont synthétisés à partir d'unités isopréniques à cinq carbones **(Weinman et Mehul, 2004)**.

Les stérols sont des stéroïdes comprenant au moins un groupement hydroxyle "OH" dans la plupart des cas sur le carbone 3 et une double liaison localisée fréquemment en position 5 mais que l'on peut rencontrer en 7. La chaine latérale possède huit à neuf ou dix atomes de carbone, elle peut être saturée ou comporter en 22, 24(25), 24(28) ou 25(27) une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées. **(Naudet, 1992)**. Le stérol le plus important dans les graisses animales est le cholestérol.

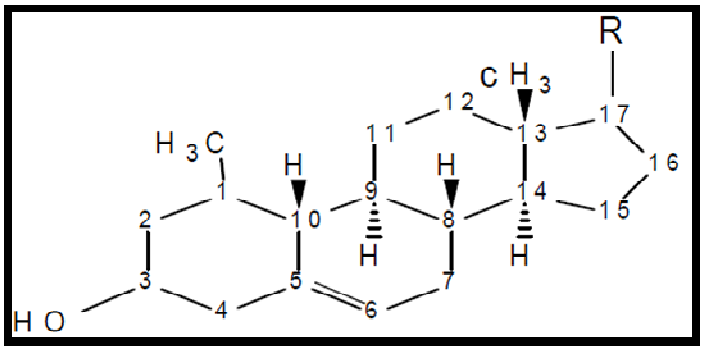


Figure 3 : Structure de base des stérols.

Les phytostérols diffèrent des autres stérols par une modification dans la chaîne latérale R. Cette dernière peut comporter un groupement méthyle ou éthyle fixé sur le carbone C 24 et dans des cas, une double liaison supplémentaire en C 22.

En voici quelques exemples :

- **Ergostérol :** le plus insaturé que l'on trouve dans l'ergot de seigle ;
- **Lanostérol et Agnostérol :** composants de la graisse de la laine de mouton ;
- **Stigmastérol :** on le trouve dans les lipides de plantes supérieures ;
- **Fucostérol :** synthétisé par les algues **(Akhisa et Kokke, 1991)**.

Les stérols constituent des précurseurs pour plusieurs composés comme les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes et la vitamine D.

4.1.1. Dérivés des stérols chez les végétaux

- **Brassinostéroïdes**

Ils forment un groupe important de stéroïdes végétaux comprenant une quinzaine de composés dont le plus important est le brassinolide. Leur structure est voisine de celle des hormones stéroïdes des mammifères. Ils agissent par un récepteur, réglant l'activité de nombreux gènes, tout particulièrement ceux réglant la fertilité et la croissance des plantes **(Szekeres *et al.*, 1995)**.

- **Alcaloïdes et hétérosides stéroïdiques**

Ils sont représentés par un grand nombre de composés (plus d'une centaine) synthétisés par les végétaux. Ils dérivent de la molécule des stéroïdes, en général par introduction de nouvelles fonctions (acide, alcool, amine...). Certains sont combinés à un sucre (glucose, galactose, arabinose, rhamnose...) lié à une fonction alcool ou acide du cycle. La majorité de ces composés est dotée d'activité pharmacologique **(Bruneton, 1999)**.

4.2. Tocophérols

Les tocophérols et tocotriénols peuvent être classés parmi les antioxydants primaires **(Drotleff et Ternes, 1998)**. La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones. Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol (Figure 4 et tableau 2).

La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou triméthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' (Figure 5 et Tableau 2) **(Cuvelier *et al.*, 2012)**.

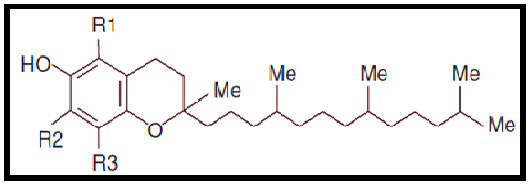


Figure 4 : Structure chimique de base des tocophérols. R1, R2 et R3 = H ou CH3.

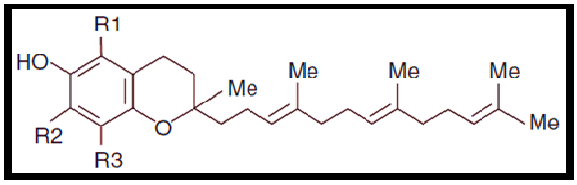


Figure 5 : Structure chimique de base des tocotriénols.R1, R2 et R3 = H ou CH3.

Tableau 2 : Structure des tocophérols et des tocotriénols.

	R_1	**R_2**	**R_3**
α	CH_3	CH_3	CH_3
β	CH_3	H	CH_3
γ	H	CH_3	CH_3
δ	H	H	CH_3

4.2.1. Biosynthèse des tocophérols

La figure 6 résume les principales étapes de biosynthèse des tocophérols (comme modèle l'*Arabidopsis*) qui nécessite deux substrats, l'homogentisate (acide HGA) et un C20 prenyldiphosphate (PrDP). L'homogentisate, impliqué dans la formation du noyau aromatique du groupe chromanol est issu de la transformation de la tyrosine *via* la voie des shikimate cytosolique. La désamination de la tyrosine aboutit à la formation de la *p*-hydroxyphénylpyruvate (HPP) lequel est oxydé en HGA par l'enzyme *p*-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD/PDS1). Quant au second substrat, le PrPD, il est impliqué dans la formation de la chaine linéaire des tocophérols ou des tocotriénols. PrPD prend deux formes, phytyl diphosphate (PDP) et geranylgeranyldiphosphate (GGDP). La prénylation de l'HGA par le PDP catalysée par l'homogentisate phytyltransferase (HPT) conduit à la formation du 2-méthyl-6-phytylbenzoquinol (2M6PBQ) qui est le précurseur des tocophérols. Cet intermédiaire est transformé soit en δ-tocophérol par la tocophérol cyclase ou bien en 2,3 diméthyl-5-phytyl-1,4-benzoquinol par la méthyl phytyl benzoquinol méthyl transférase. Ce dernier est transformé en γ-tocophérol par la tocophérol cyclase. L'étape finale est la conversion de γ-tocophérol et δ-tocophérol en, respectivement, α-tocophérol et β-tocophérol **(Hussain *et al.*, 2013)**.

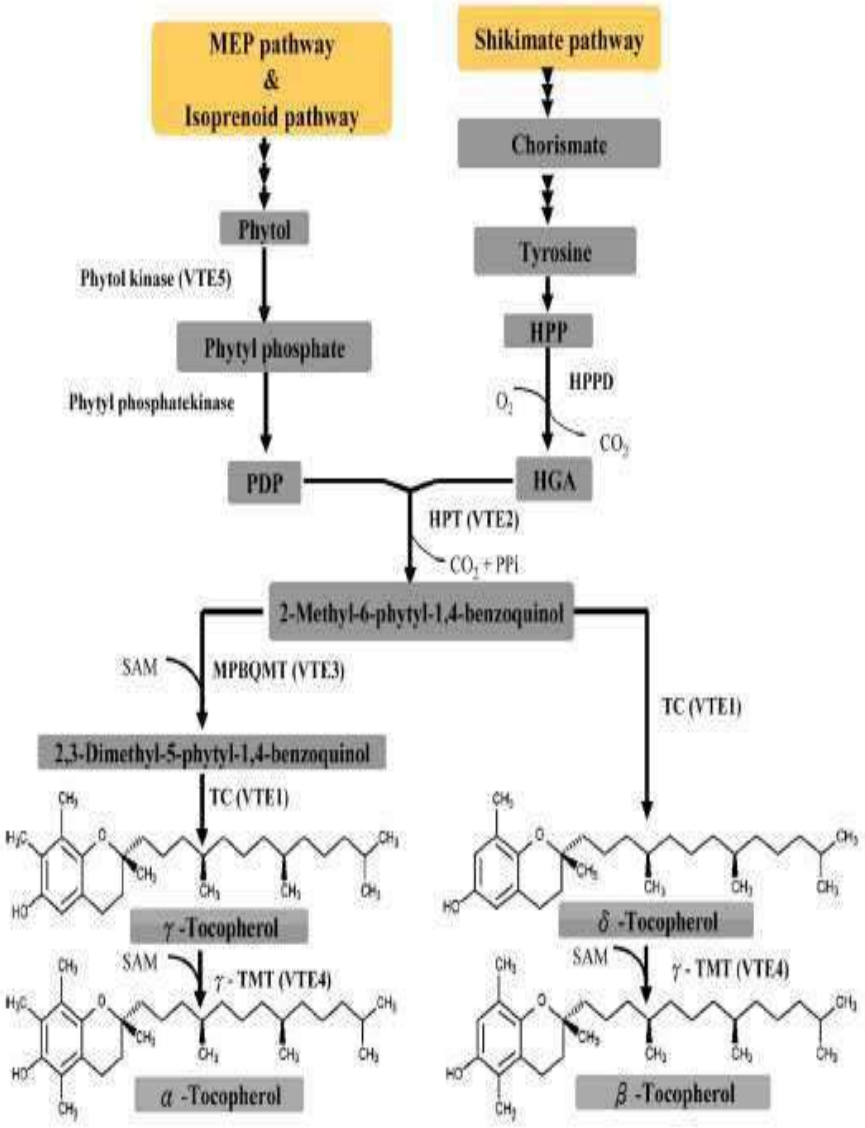


Figure 6 : Biosynthèse des tocophérols (comme modèle l'*Arabidopsis*). VTE signifie le gène codant l'enzyme correspondant **(Hussain *et al.*, 2013)**.

Chapitre 3 : Généralités sur les composés phénoliques

1. Définition

L'expression de composés phénoliques est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles et qui ne contient aucun atome d'azote et qui dérive de la biogénèse d'acide shikimique et/ou d'acétate **(Bloor, 2001 ; Hennebelle *et al.*, 2004).**

Il s'agit d'une classe de métabolites secondaires (n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction), extrêmement complexes, synthétisés par les plantes lors des différents stades de leur développement. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit (**Crozier *et al.*, 2006 ; Alarcon-Flores *et al*., 2012**). Ils possèdent des propriétés bénéfiques pour la santé (**Kalili et de Villiers, 2011**).

2. Structure de polyphénols végétaux

Les composés phénoliques ou polyphénols, constituent l'une des plus nombreuses et largement distribués groupes de substances dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques connus. La structure de polyphénols naturels varie à partir de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, tels que les tanins condensés. Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés nommés flavonoïdes différent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique **(Harborne, 1980 ; Crozier *et al.*, 2006**).

La plupart des grandes classes de polyphénols végétaux sont énumérés dans le tableau 3, en fonction du nombre d'atomes de carbone du squelette de base.

Tableau 3 : Exemples de principales classes de composés phénoliques **(Urquiaga et Leighton, 2000 ; Castellano *et al.*, 2012**).

Nombre d'atomes de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C6	Phénols simples	Catéchol
7	C6-C1	Acides phénoliques	Acide gallique
8	C6-C2	Acétophénone	3-Acétyl-6-méthoxybenzaldehyde
9	C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique
		Coumarines	Scopolétol
10	C6-C4	Naphtoquinones	juglone
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercétol
		Isoflavonoïdes	Daïdzéine
		Anthocyanes	Malvidine
N		Oligomères procyanidoliques tanins	

La figure 7 montre la structure chimique des principales classes de composés phénoliques où on distingue des flavonoïdes et des composés non flavonoïdes.

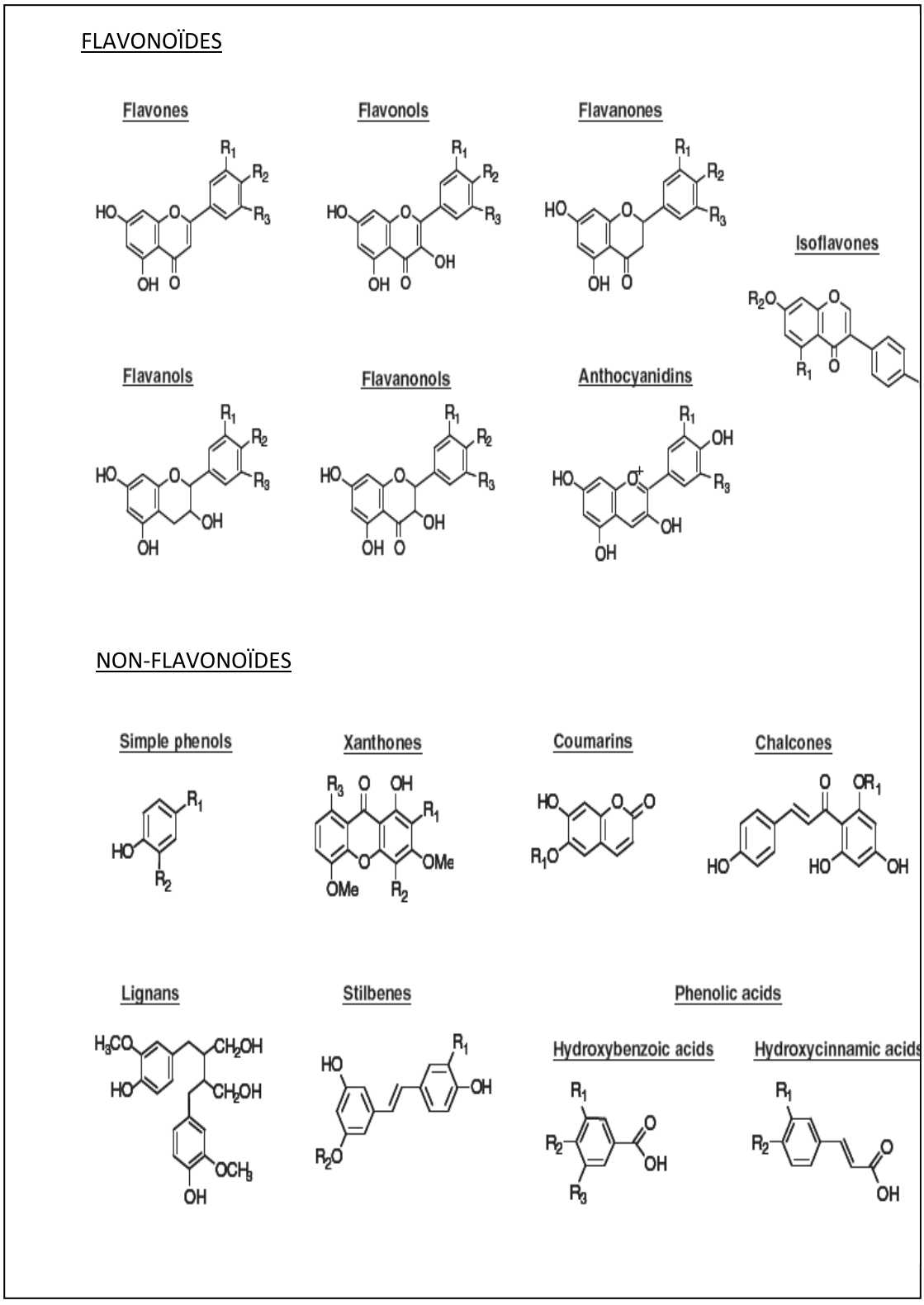


Figure 7 : Structure chimique des principales classes de composés phénoliques **(Kalili et de Villiers, 2011)**.

3. Classification des composés phénoliques

Les principales classes largement répandues sont:

3.1. Les polyphénols monomériques

3.1.1. Les acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués :

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique ;
- Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique **(Serve *et al.*, 1983)**.

3.1.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme (plus de 4000) de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur structure est basée sur le squelette C6-C3-C6 (Figure 8). Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones. Ils sont trouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plante renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde **(Havsteen, 2002 ; Ghedira, 2005)**.

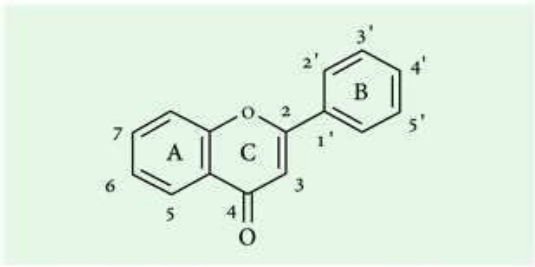


Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes.

3.2. Les polyphénols sous forme de polymères

3.2.1. Les tanins

Les tanins sont des composes poly-phénoliques ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre dure et imputrescible, en se fixant sur les protéines. Ils sont responsables de la saveur astringente des plantes. Ils sont divisés en deux grands

groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, non hydrolysables ou tanins catéchiques dérivant des catéchols et des proanthocyanidols par condensation (**Haslam, 1996 ; Urquiaga et Leighton, 2000**).

3.2.2. Lignines

Ces composés de haut poids molécules contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques **(Boerjan *et al.*, 2003)**.

4. Biosynthèse des composés phénoliques

4.1. La voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoide (Figure 9) **(Macheix *et al*., 2005).**

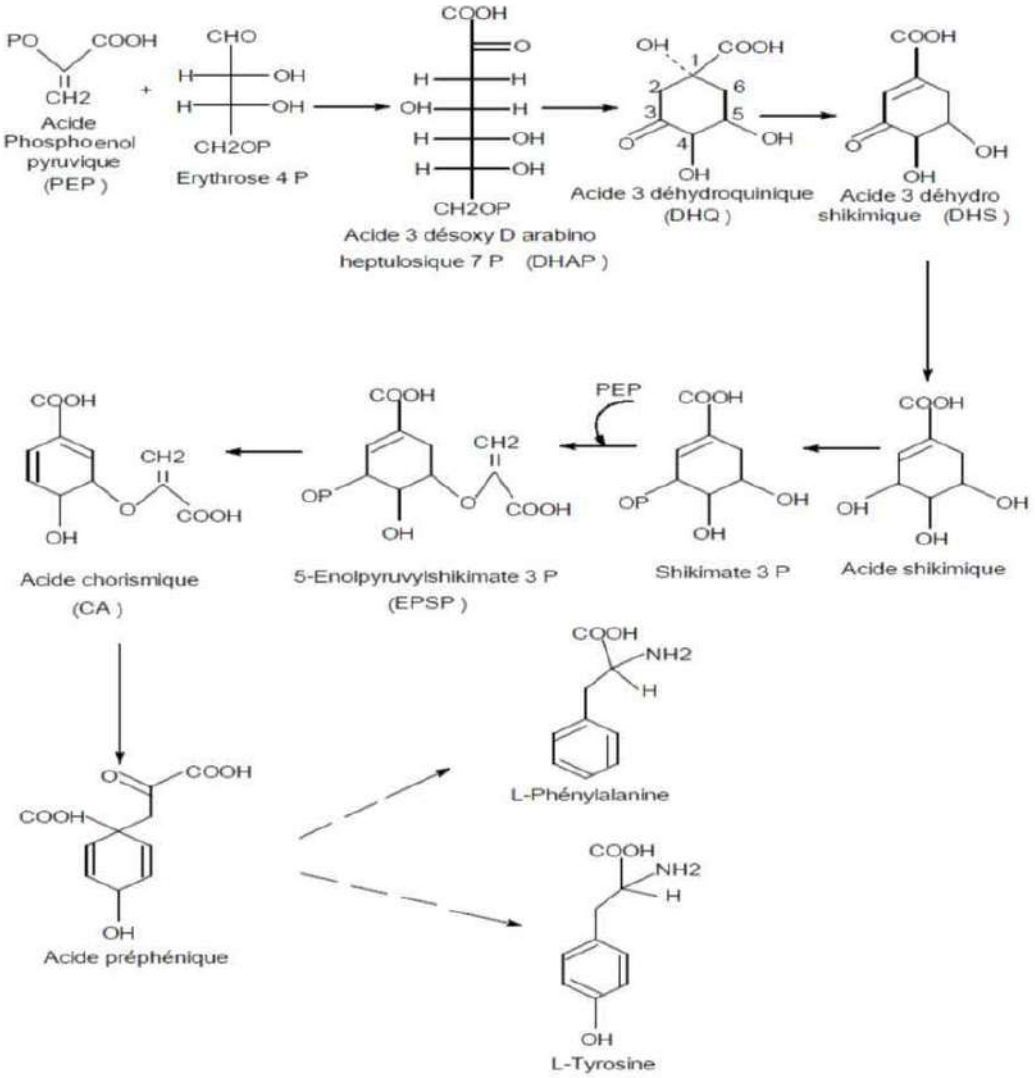


Figure 9 : La voie de shikimate **(Macheix *et al*., 2005)**.

4.2. La voie de phénylpropanoide

La voie de phénylpropanoide commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Figure 10).

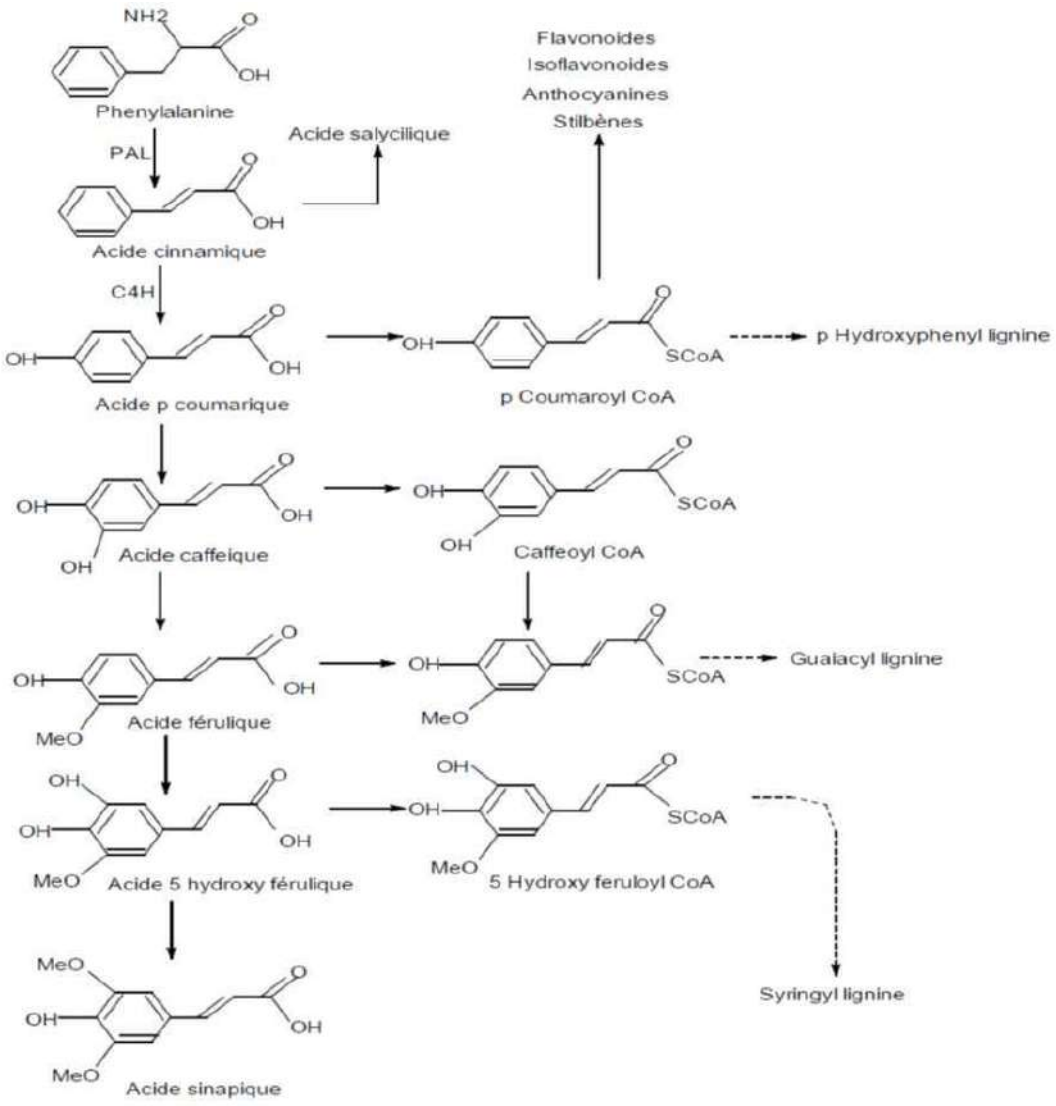


Figure 10 : La voie de phénylpropanoide **(Hoffmann *et al.*, 2004)**.

4.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Cette voie est résumée dans la figure 11.

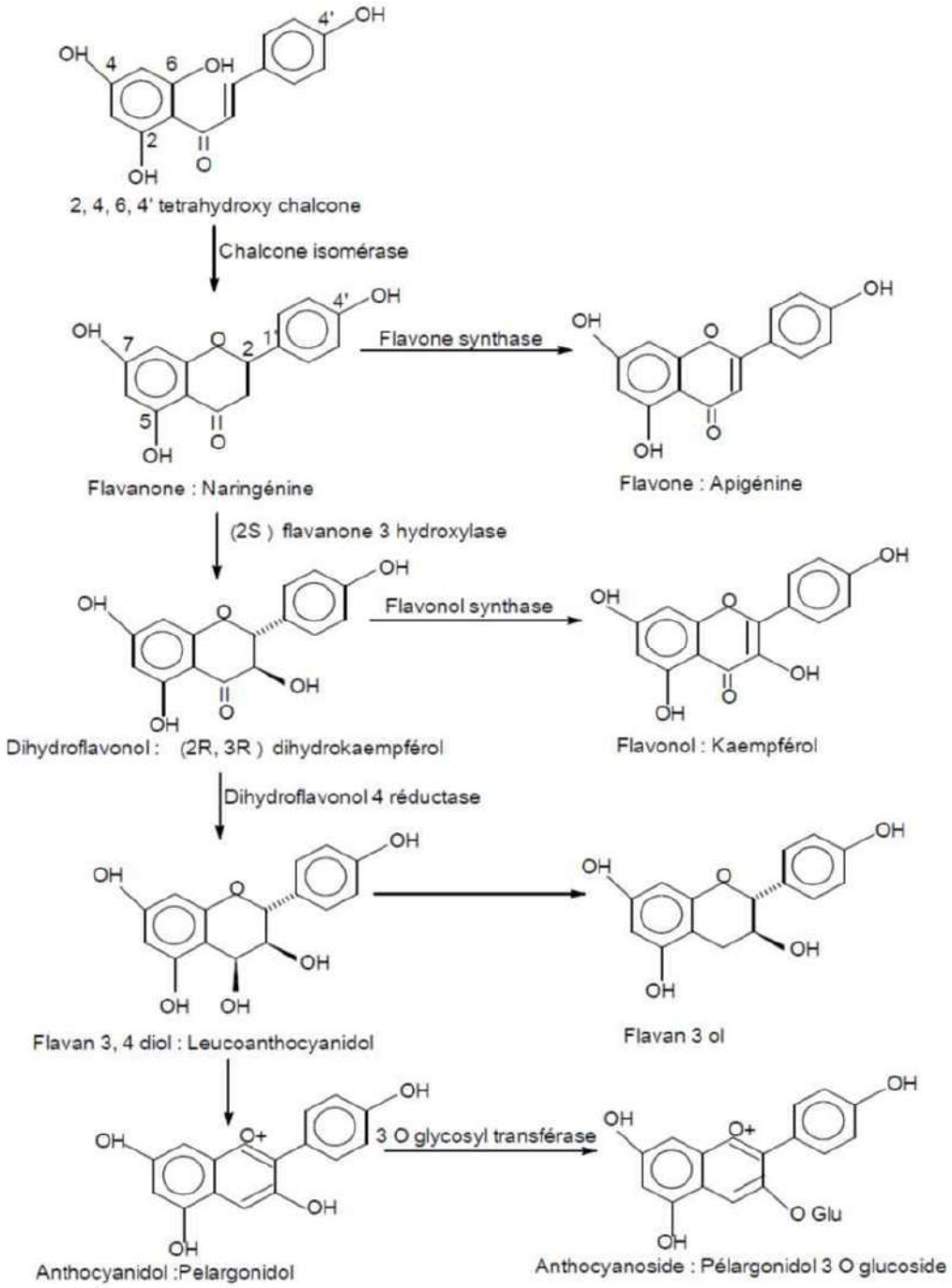


Figure 11 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes **(Bruneton, 1999)**.

5. Rôles et intérêts des composés phénoliques

5.1. Pour la plante

Les flavones, les flavonols et les anthocyanidines pourraient être impliqués dans l'attraction des insectes pollinisateurs vers les fleurs, tandis que les lignines et les lignanes seraient impliqués dans la croissance de la plante et dans sa défense. Les composés phénoliques semblent jouer un rôle déterminant dans la qualité des produits nutritifs issus des plantes tels que la couleur, la stabilité chimique, l'astringence,…etc. **(Kalili et de Villiers, 2011)**.

5.2. Propriétés bénéfiques des composés phénoliques

5.2.1. Activité antioxydante des polyphénols

La chélation des ions métalliques par les polyphénols est un phénomène de grand intérêt biologique qui pourrait jouer un rôle important dans leur pouvoir antioxydant. Ces ions sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène. En outre, l'autoxydation des ions Fe^{2+} et Cu^{2+} est une source de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène **(Halliwell, 1994 ; Hider *et al.*, 2001)**.

Les polyphénols sont susceptibles d'inhiber ce stress oxydant, non seulement en piégeant les EROs par réduction (Figure 12), mais aussi en formant avec les ions du fer et du cuivre des complexes inertes (sous une forme qui bloque leur activité redox). Ainsi, les polyphénols sont capables de protéger les lipides polyinsaturés contre les phénomènes d'oxydation générateurs de radicaux et aldéhydes lipidiques responsables du développement de plusieurs maladies **(Halliwell, 1994)**.

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante **(Jovanovic *et al.*, 1994)**. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxyles ($ROO^{\cdot}$), alkoxyles ($RO^{\cdot}$) et hydroxyle par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante :

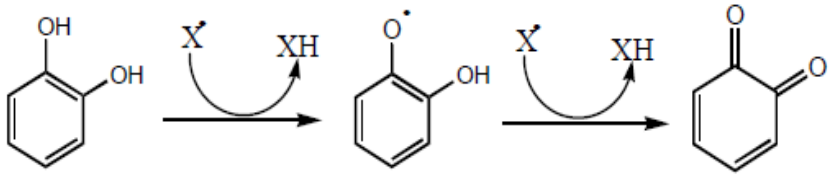


Figure 12 : Mécanisme de Piégeage des EROs par les flavonoïdes **(Jovanovic *et al.*, 1994)**.

D'une manière générale, les flavonoïdes les plus actifs (impliqués comme des piégeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxyles), sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) ;

2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo ;

3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 **(Bors *et al.*, 1990)** (Figure 13).

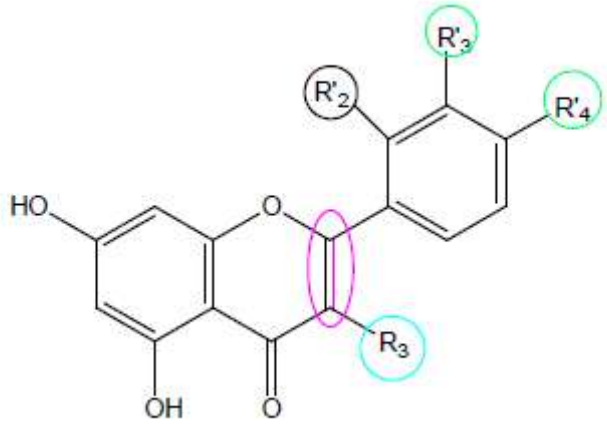


Figure 13: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes **(Bors *et al.*, 1990)**.

5.2.2. Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols - protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes : inhibition d'une grande variété d'enzymes, modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que du processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs) **(Havsteen, 2002)**.

Outre les effets antioxydants, l'inhibition de la production des EROs par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EROs **(Havsteen, 2002)**.

6. Propriétés thérapeutiques des polyphénols

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les catéchines du thé sont des inhibiteurs de l'angiogénèse *in vitro* **(Middleton *et al.*, 2000 ; Hennebelle *et al.*, 2004**).

Chapitre 4 : Oxydants, stress oxydatif et antioxydants

1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène

Dans la structure des atomes et des molécules, les électrons s'associent souvent en paire, chaque paire est mouvante dans une région ou espace défini autour du noyau. Cet espace est attribué à une orbitale atomique ou moléculaire, l'électron de chaque paire à un nombre quantum de spin +1/2 ou -1/2.

1.1. Définition

Un radical libre est défini comme un atome, un ion ou une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres. Le plus souvent l'électron non apparié se trouve sur l'orbitale externe de la molécule. Cet électron libre la rend très réactive et instable sur le plan énergétique.

Au point de vue énergétique, pour retrouver un état stable, les radicaux libres tendent à ne plus avoir d'électrons célibataires dans leurs cortège électronique. Ce résultat peut être atteint par soit la perte d'un électron, le radical est alors réducteur, soit par le gain d'un électron, le radical est alors oxydant**.**

Les radicaux libres ont une activité chimique variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxyde, hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et le peroxynitrite. C'est pourquoi le terme d'espèce réactive de l'oxygène (ERO) est préféré à celui de radicaux libres puisque le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre **(Favier, 2003 ; Halliwel et Whiteman, 2004)**.

Tableau 4 : Exemples d'espèces réactives de l'oxygène **(Favier, 2003 ; Delattre, 2005)**.

NOM	FORMULE	COMMENTAIRES
L'oxygène singulet	O_2^*	Molécule instable d'oxygène
Superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Un électron en plus (espèce radicalaire)
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Espèce réactive non radicalaire
Hydroxyle	$OH^{\cdot}$	Un radical hautement réactif
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$	Une espèce radicalaire potentiellement toxique.

1.2. Formation des EROs

La réduction de l'oxygène par l'ajout progressif des électrons pour devenir H_2O peut donner des molécules intermédiaires qui sont les espèces réactives d'oxygène (ERO) telles que le superoxyde et le peroxyde **(Gardès-Alber *et al.*, 2003)**.

1.3. Quelques espèces réactives de l'oxygène

1.3.1. Oxygène singulet O_2^*

L'oxygène fondamental (celui que nous respirons) possède 2 électrons célibataires à spins parallèles. Sous l'impact d'un photon il peut se transformer en oxygène singulet **(O_2^*)** (forme excitée de l'oxygène moléculaire). Il accouple ses 2 électrons célibataires qui se retrouvent dans la même case quantique avec des spins antiparallèles. Cette molécule est instable. Elle est produite principalement par photosensibilisation (risque cutané).

1.3.2. Super-oxyde $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde est un radical libre chargé négativement issu de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire.

Un électron peut alors s'ajouter dans la case vide : on obtient l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cet électron est anti-liant, donc l'interaction entre les 2 atomes O est moins forte et la molécule est très réactive. L'anion superoxyde possède 17 électrons pour16 protons avec un électron célibataire qui le rend instable. Il est produit par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles) et les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires. Il peut constituer un radical à la fois oxydant et réducteur.

1.3.3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde, ou par la réduction bivalente de l'oxygène. Il s'agit d'un agent très réactif. C'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre à proprement parler puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire. Cependant il est considéré comme un dérivé de l'oxygène, de par sa position essentielle au sein des réactions radicalaires.

Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène a la propriété de traverser les membranes biologiques. Il possède aussi un fort pouvoir oxydant participant indirectement à la toxicité des dérivés de l'oxygène **(Kakhlon et Cabantchik, 2002 ; Delattre, 2005 ; Harold *et al.*, 2007).**

1.3.4. Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$)

H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$ sont les précurseurs du radical hydroxyle par la réaction de Haber et Wiess. Le radical hydroxyle est le composé le plus réactif. Il agit en captent un électron d'une autre molécule. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène. Elles sont décrites sous le nom de réactions de Fenton.

On explique le rôle des ions métalliques dans la réaction de Fenton selon les réactions suivantes :

$$M^{n+} + H_2O_2 \longrightarrow M^{(n+1)+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Exemples

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe\,OH^{3+} + OH^{-}$$

Réaction de Haber-Weiss

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \xrightarrow[Fe]{} O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

La réaction entre l'ion ferreux et le peroxyde d'hydrogène produit l'ion ferrique et un radical hydroxyle **(Favier, 2003 ; Harold *et al.*, 2007 ; Borg et Reeber, 2008)**.

1.3.5. Oxyde de nitrogène $NO^{\cdot}$ et le peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$

Le $NO^{\cdot}$ est nécessaire pour le métabolisme humain mais en excès il peut être cytotoxique. De plus, les interactions $NO^{\cdot}/O_2^{\cdot}$ entraînées conduisent à la formation d'un radical, le peroxynitrite **(Alderton *et al.*, 2001 ; Ghafourifar et Cadenas, 2005)**.

La figure 14 résume la formation des principales espèces réactives de l'oxygène.

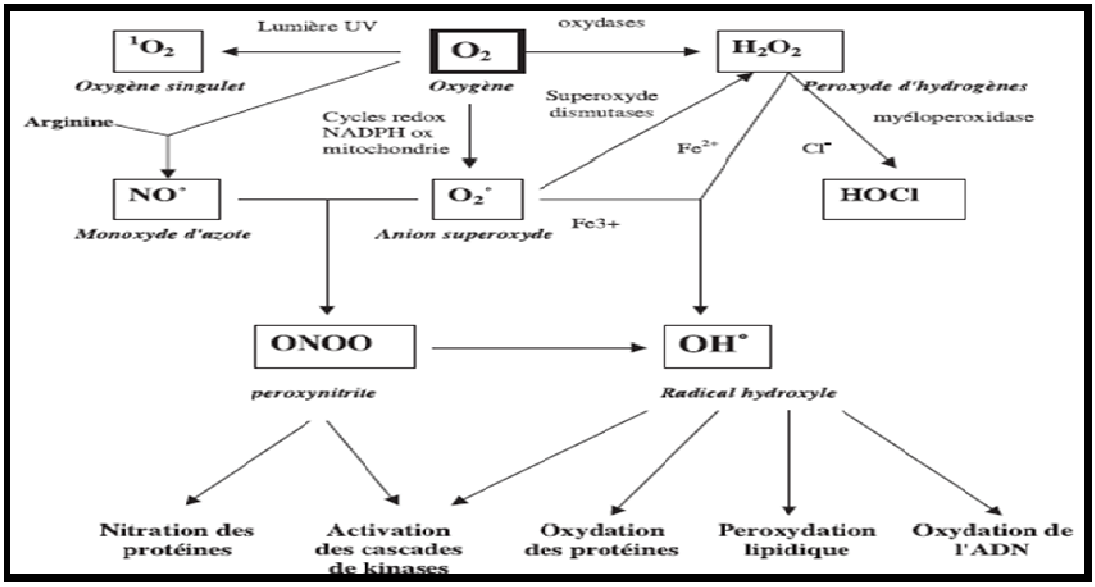


Figure 14 : Origines des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en Biologie **(Favier, 2003)**.

Il convient de préciser que l'instabilité des EROs rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures. Elles sont très élevées et peuvent aller de 105 à 1010 $mol.l^{-1}s^{-1}$. La durée de vie des EROs est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde **(Lechuer-Michel *et al.*, 2001)**. En effet, la toxicité des EROs n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité. Dans plusieurs cas, des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de diffuser et gagner des locations sensitives **(Kohen et Nyska, 2002)**.

1.4. Origines des EROs

1.4.1. Origines exogènes

Elles sont surtout d'origine physique et chimique comme le rayonnement ultra-violet, les ultrasons, air pollué, fumé de cigarette,… **(Magder, 2006)**.

1.4.2. Origines endogènes

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des oxydants :

- ✓ NADPH-oxydase, enzyme jouant un rôle clef dans la phagocytose par la production de H_2O_2 et HOCl ;
- ✓ Xanthine-oxydase qui est activée au cours de la reperfusion après ischémie ;
- ✓ NADH-déshydrogénase du transport électronique dans la membrane interne mitochondriale, et l'hème de l'hémoglobine et de la myoglobine oxydant le Fe^{2+} en Fe^{3+} pour donner les formes oxydées methémoglobine et metmyoglobine **(Li *et al*., 2002 ; Andreyev *et al.*, 2005 ; Valko *et al.*, 2006**).

L'origine cellulaires des EROs est principalement la mitochondrie et à moindre degré le réticulum endoplasmique.

- **La membrane mitochondriale**

C'est la source principale. Le métabolisme cellulaire est situé principalement à la membrane mitochondriale. En effet 95% de l'oxygène utilisé par la cellule est réduit en eau dans la mitochondrie en vue de la formation d'ATP. Cette réaction fait intervenir en particulier le coenzyme Q. Il peut se produire une fuite d'électrons au niveau de ce coenzyme par la NADH-coenzyme Q réductase, la coenzyme Q-cytochrome C réductase et le cytochrome C oxydase. Elle aura pour conséquence la formation de radicaux libres aux dépens de l'oxygène. Ainsi 5% de l'oxygène qui transite au niveau de la mitochondrie devient de l'anion super-oxyde. Cela représente une quantité non négligeable de composés potentiellement toxiques produits quotidiennement au sein des cellules de l'organisme **(Andreyev *et al.*, 2005 ; Borg et Reeber, 2008)**.

- **Le réticulum endoplasmique**

Au sein du réticulum endoplasmique (les microsomes) se trouve le cytochrome P450. Il s'agit d'une hydroxylase qui intervient dans le métabolisme des stéroïdes et médicaments. Le fer présent à l'intérieur de ce cytochrome est susceptible de réagir avec l'oxygène et de produire l'anion super-oxyde. Ce sera le déclencheur préférentiel de la peroxydation lipidique (**Borg et Reeber, 2008**).

1.5. Les espèces réactives de l'oxygène dans les systèmes biologiques

Les radicaux libres et d'autres espèces réactives sont constamment produits dans le corps humain **(Halliwell, 2001)**. Pendant les activités cellulaires normales, divers

processus à l'intérieur des cellules produisent des espèces réactives de l'oxygène (EROs). Les plus courantes sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le radical hydroxyde ($OH^{\bullet}$) **(Denisov et Afanas'ev, 2005 ; Harold e*t al.*, 2007)**.

En règle générale, une faible concentration d'EROs est essentielle pour les fonctions physiologiques normales comme l'expression des gènes, la croissance cellulaire et de la défense contre l'infection. Parfois, ils agissent également comme des agents stimulants pour les processus biochimiques dans la cellule **(Droge, 2002)**.

2. Stress oxydatif

Le terme général de stress oxydatif est utilisé pour décrire une situation de dommages causés par les EROs. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre, d'une part, les molécules pro-oxydantes particulièrement les espèces radicalaires réactives dérivées de l'oxygène (radical hydoxyle $OH^{\bullet}$, anion superoxyde $O_2^{-\bullet}$, …) et, d'autre part, les espèces antioxydantes (Figure 15). Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant» **(Favier, 2003 ; Guichardant *et al.*, 2006 ; Perkins, 2006)**.

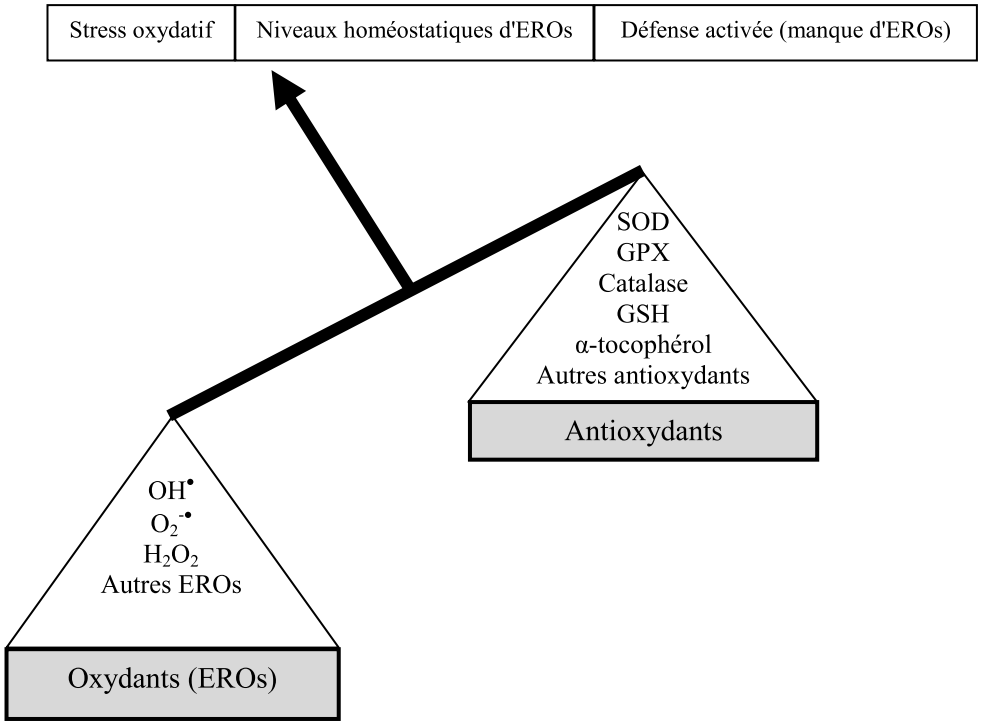


Figure 15 : Déséquilibre entre oxydants et antioxydants **(Rahman *et al*., 2012)**.

2.1. Implication du stress oxydatif dans la pathologie et dans le vieillissement

Les réactions d'oxydoréduction qui transfèrent les électrons d'une substance vers un agent oxydant sont nécessaires à la vie, mais peuvent produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Le stress oxydatif a été mis en cause dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines graves telles que certains cancers, les maladies cardiovasculaires, les maladies autoimmunes, les maladies dégénératives liées au vieillissement, sans que l'on sache encore s'il est cause ou conséquence de ces maladies (**Halliwel et Guetterridge, 1990 ; Esterbauer *et al*., 1993 ; Harrison *et al*., 2003 ; Sorg, 2004**). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés **(Halliwell et Gutterridge, 1999 ; Sohal et Mockett, 2002).**

2.1.1. Rôle dans l'inflammation

L'inflammation est la réponse à toute agression locale par une série de réactions non spécifiques, déclenchées quelque soit la cause initiale et se déroulant en trois temps : réactions vasculaire, infiltration cellulaire et fibrose tissulaire.

Si, dans l'ensemble, l'inflammation fait partie des réactions de défense de l'organisme à l'agression et de sa mise en état d'alerte d'y résister, dans bien des cas, elle dure trop, dépasse son but et provoque par elle-même des destructions tissulaires et des réactions non souhaitables, qui la transforme en phénomène pathologique. Cette réaction peut être causée par des agents variés (infectieux, physique, chimique,…). Elle peut être aiguë ou chronique **(Russo-marie *et al.*, 1998)**.

Les médiateurs de l'inflammation sont multiples. Nous pouvons citer les cytokines (IL-1, TNF-α,..), les prostaglandines, les leucotriènes et des protéines plasmatiques diverses **(Perronne, 1999 ; Nicolas *et al.*, 2001)**.

Dans toutes les inflammations, il existe une surproduction de radicaux oxygénés dans le milieu extracellulaire. Lorsque la production de ces radicaux est importante, la réaction inflammatoire s'auto-entretient. Dans les phagocytes, les EROs sont produites par activation de la NADPH oxydase, de la myélopéroxydase et des NO synthases. Ces EROs sont produites au sein des péroxysomes, au niveau des membranes des phagosomes et sur la membrane cytoplasmique, ce qui est à l'origine d'altération moléculaire des cellules **(Griendling *et al.*, 2000 ; Dedon et Tannenbaum, 2004)**.

Parmi ces radicaux, un dérivé du monoxyde d'azote (NO), le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) semble jouer un rôle déterminant dans les lésions tissulaires accompagnant ce processus pathologique **(Guenane *et al.*, 2006)**.

2.1.2. Rôle dans le vieillissement

Le système nerveux central est particulièrement sensible aux radicaux libres à cause de sa grande consommation d'oxygène, de la grande concentration en lipides et de sa faiblesse relative en enzyme antioxydants. Ces conditions conduisent à la dégénérescence des neurones et provoquent l'apparition des troubles de mémoire et, des fois, sont couplées aux maladies neurodégénératives qui sont très fréquentes en âge avancé. Ces effets ne se limitent pas à ce niveau parce qu'il a été rapporté que le radical OH• (espèce très réactive de l'oxygène) était capable de réagir avec l'ADN conduisant à divers processus, tels que l'oxydation des bases et des résidus des sucres ou la formation de cassures de chaîne par arrachement d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose. De plus, le radical •OH est responsable de la formation de pontages

ADN-protéines dans les nucléoprotéines (**Barouki, 2006 ; Daum-Badouard, 2006 ; Droge et Schipper, 2007)**.

3. Oxydation des lipides

3.1. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- l'auto-oxydation accélérée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ;
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photo sensibilisateurs ;
- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase.

Le premier mécanisme étant le plus important. C'est la réaction spontanée de l'oxygène atmosphérique avec des lipides, connue sous le nom auto-oxydation qui est le processus le plus commun conduisant à la dégradation par oxydation. Les acides gras polyinsaturés sont susceptibles de se décomposer par ce procédé, s'ils sont présents sous forme d'acides gras libres, ou s'ils sont présents dans les triglycérides (ou diglycérides ou monoglycérides) ou des phospholipides. **(Del Rio *et al.*, 2005 ; Cillard J et Cillard P, 2006)**.

La réaction se déroule en trois étapes (Figure 16) :

- **Initiation**

En présence d'un initiateur (In), les lipides insaturés (LH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical de lipide ($L^{\bullet}$).

- **Propagation**

Le lipide radical alkyle ($L^{\bullet}$) réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyle (LOO•). Ce radical fixe un atome d'hydrogène arraché à une autre molécule de lipide insaturé (LH) pour former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical de lipide (L•).

- **Terminaison**

Les radicaux peroxyles réagissent les uns avec les autres pour former des produits non radicalaires.

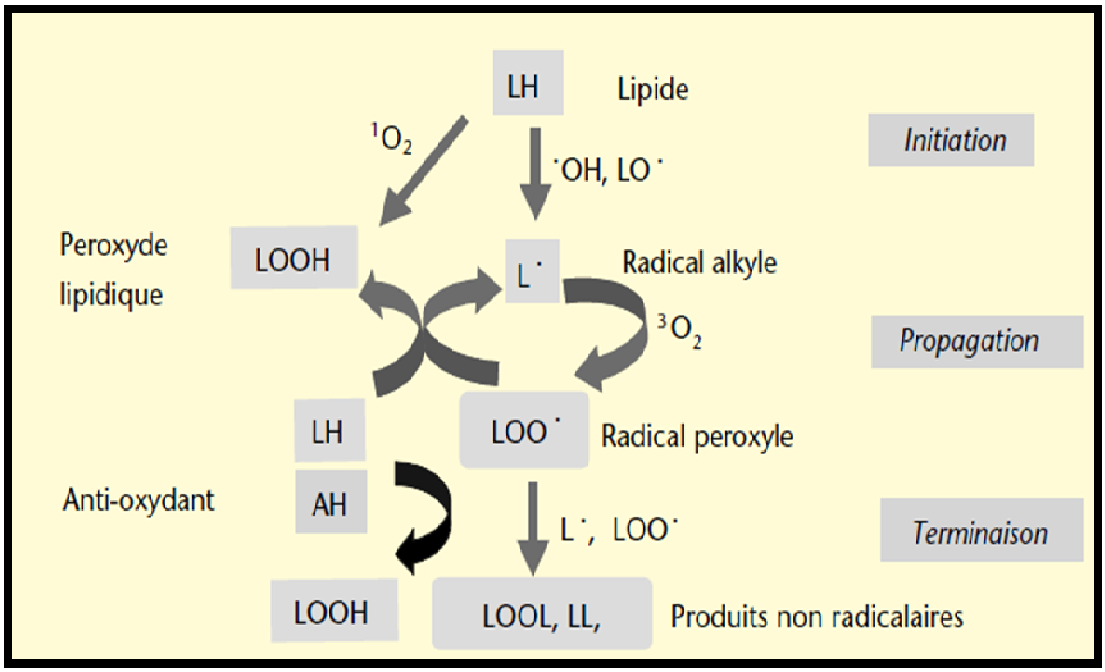


Figure 16 : Mécanisme de l'auto-oxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet **(Cillard J et Cillard P, 2006)**.

Les principaux produits résultants de la peroxydation des lipides sont le MDA (malondialdehyde), le 4-HNE (4 hydroxynonenal) (Figure 17) et le 4 HDA (4 hydroxyalkenal) (**Daum-Badouard, 2006**). Le 4-HNE est le produit de la peroxydation lipidique le plus génotoxique **(Uchida, 2003)**.

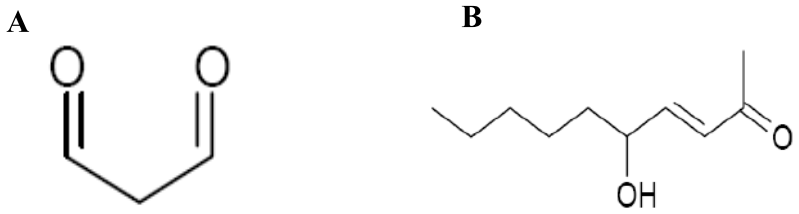


Figure 17 : Structure chimique du MDA (A) et du 4-HNE (B) **(Daum-Badouard, 2006)**.

4. Oxydation des protéines

Les radicaux libres touchent tous les acides aminés et provoquent la protéolyse des enzymes et des protéines. Cette protéolyse peut modifier et donner naissance à de nouvelles structures et des conformations protéiques différentes et par conséquent, changement de fonction ou des protéines dysfonctionnelles (activité enzymatique,

transduction d'un signal ou système de transport). Ces modifications sont marquées par la formation de ponts disulfures et des liaisons carbonyles. L'oxydation des protéines peut être due à des produits de peroxydation tels que le MDA et le 4-HNE qui se conjuguent avec les acides aminés (histidine, cystéine, lysine) des protéines natives **(Alamovitch *et al.*, 2007 ; Borg et Reeber 2008).**

5. Oxydation des acides nucléiques

Les espèces réactives H_2O_2 et $O_2^{\bullet -}$ peuvent générer le radical OH•. C'est l'espèce la plus réactive de l'oxygène et sa réaction avec l'ADN est susceptible de conduire à divers processus, tels que l'oxydation des bases et des résidus des sucres ou la formation de cassures de chaîne par arrachement d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose. De plus, le radical OH• est responsable de la formation de pontages ADN-protéines dans les nucléoprotéines.

Les aldéhydes réactifs (MDA et 4-HNE) générés par la peroxydation lipidique interagissent avec les bases de l'ADN **(Guetens *et al.*, 2002 ; Daum-Badouard, 2006)**.

6. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir, à des concentrations relativement faibles, sans danger avec les radicaux libres (chaque molécule ne peut réagir qu'avec un seul électron libre) et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Ils peuvent être d'origine endogène ou exogène **(Halliwell, 1994)**.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaine de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur **(Berset et Cervelier, 1996)**.

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs actions (enzymatiques ou non enzymatiques) ou bien selon leur source (endogène ou exogène) **(Halliwell *et al.*, 1992)**.

6.1. Les systèmes enzymatiques antioxydants

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Elle catalyse la conversion de l'anion superoxyde O_2^- en H_2O_2 :

$$2O_2^- + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Plusieurs iso-formes de la SOD existent et différent par leur séquence protéique et leurs cofacteurs **(Fridovich, 1995)**. Ainsi, la MnSOD comprend 4 sous-unités contenant chacune un atome de manganèse. Elle est localisée dans la mitochondrie. On distingue également la Cu-Zn SOD sous forme d'un dimère dont chaque unité possède 1 atome de cuivre et 1 atome de zinc. Elle est présente chez la plupart des espèces au niveau du cytoplasme (Tablaeu 5). La formation de la MnSOD est inductible par un stress oxydant, contrairement à celle de la Cu-ZnSOD **(Murley *et al.*, 2001 ; Finaud *et al.*, 2006)**.

6.1.2. Les catalases (CAT)

CAT est présente dans toutes les cellules et en particulier dans les peroxysomes, les structures cellulaires qui utilisent l'oxygène afin de détoxifier des substances toxiques et produire H_2O_2. La catalase convertit H_2O_2 en eau et oxygène. La catalase peut également utiliser H_2O_2 afin de détoxifier des substances toxiques par une réaction de la peroxydase. Cette réaction a besoin d'un substrat tel que le phénol, l'alcool (éthanol) ou l'acide formique (**Pal Yu, 1994 ; Finaud *et al.*, 2006)**. (Tableau 5).

$$H_2O_2 + H_2A\ (\text{substrat}) \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + A$$

6.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium (rôle de cofacteur) incorporé dans une molécule de sélénocystéine (dans laquelle l'oxygène du groupement hydroxyle de la sérine est remplacé par le sélénium) **(Chaudiere et Tappel, 1983)**. Elles se définissent comme des enzymes de structure très proche ayant la propriété de réduire les peroxydes. Il existe une forme de GPX cytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-

intestinale ainsi qu'une iso-enzyme réduisant directement les phospholipides oxydés, la HPGPx (hydroperoxyde-glutathion peroxydase) **(Ursini *et al.*, 1999)**.

Actuellement toutes les glutathions peroxydases connues sont des enzymes à sélénium.

Tableau 5 : Localisation et actions des enzymes antioxydants (**Finaud *et al.*, 2006)**.

Antioxydants	Cofacteurs	Localisation cellulaire	Cibles
Mn-SOD	Manganèse	Mitochondrie	Anion superoxyde Peroxynitrite
Cu-Zn-SOD	Zinc et cuivre	Cytosol-mitochondrie (membrane)	Anion superoxyde Peroxynitrite
CAT	Fer	Peroxysome, cytosol et mitochondrie	Peroxyde d'hydrogène
GPX	Sélénium	cytosol et mitochondrie	Peroxyde d'hydrogène Peroxyntrite

6.2. Les antioxydants moléculaires

6.2.1. Les antioxydants endogènes

Parmi ces molécules, le glutathion se positionne en première position.

6.2.1.1. Le glutathion

Le glutathion GSH est un polypeptide composé de trois acides aminés (cystéine, acide glutamique et glycine). Il est, sous forme réduite, l'antioxydant le plus important des cellules, les protégeant notamment des dérivés actifs de l'oxygène. Ces substances hautement réactives, si elles sont non contrôlées, endommageront ou détruiront les composantes clés cellulaires (par exemple les membranes, l'ADN) en l'espace de microsecondes. Le glutathion attaque directement les composés oxygénés à l'intérieur de la cellule et joue un rôle clé dans le recyclage d'autres antioxydants bien connus, tels que les vitamines C et E. Au cœur des défenses antioxydantes, le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants.

Le GSH est un composé piégeur pouvant réagir avec l'hydroxyle ou un peroxyde pour donner un radical thyil ($GS^{\bullet}$) conduisant à la rupture de la chaine par la formation d'une molécule **(Souchard *et al.*, 2002 ; Haleng *et al.*, 2007**).

$$GSH + HO^{\bullet} \rightarrow GS^{\bullet} + H_2O$$
$$2GS^{\bullet} \rightarrow GSSG$$

6.2.2. Les antioxydants exogènes

6.2.2.1. La vitamine E (ou α-tocophérol)

La vitamine E, représentée en majorité par l'alpha-tocophérol, est un composé antioxydant puissant, notamment du fait de son caractère lipophile, qui lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire. En échangeant un électron libre, le tocophérol se transforme en radical tocophéroxyle, peu réactif de par sa structure cyclique. Le radical tocophéroxyle peut être régénéré par l'ascorbate, qui devient alors radicalaire. Lors d'un stress oxydatif, ces deux vitamines agissent conjointement en formant une chaîne de détoxication des radicaux libres **(Pryor, 2000 ; Hussain *et al.*, 2013)**.

6.2.2.2. La vitamine C (ou acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est généralement considérée comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain. Grâce au faible potentiel redox du couple ascorbate/radical ascorbyle, la vitamine C est capable de céder un électron à pratiquement tous les radicaux libres pouvant intervenir dans un système biologique, comme les radicaux superoxydes, hydroxyles, tocophéroxyles ou peroxyles **(Will et Byers, 1996 ; Valko *et al.*, 2006)**.

6.2.2.3. Les polyphénols

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques ont été exposées dans le chapitre correspondant (pages 29 et 30).

6.2.2.4. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques **(Pelli et Lyly, 2003).**

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles fréquemment utilisés.

7. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Liu (2010) a dressé une pyramide positionnant les quatre éléments dont il faut tenir compte pour l'exploration du pouvoir antioxydant (Figure 18). Il s'agit du substrat susceptible d'être oxydé, du microenvironnement dans lequel la réaction a lieu, de la nature et de la source de l'oxydant et en dernier lieu la méthode d'évaluation.

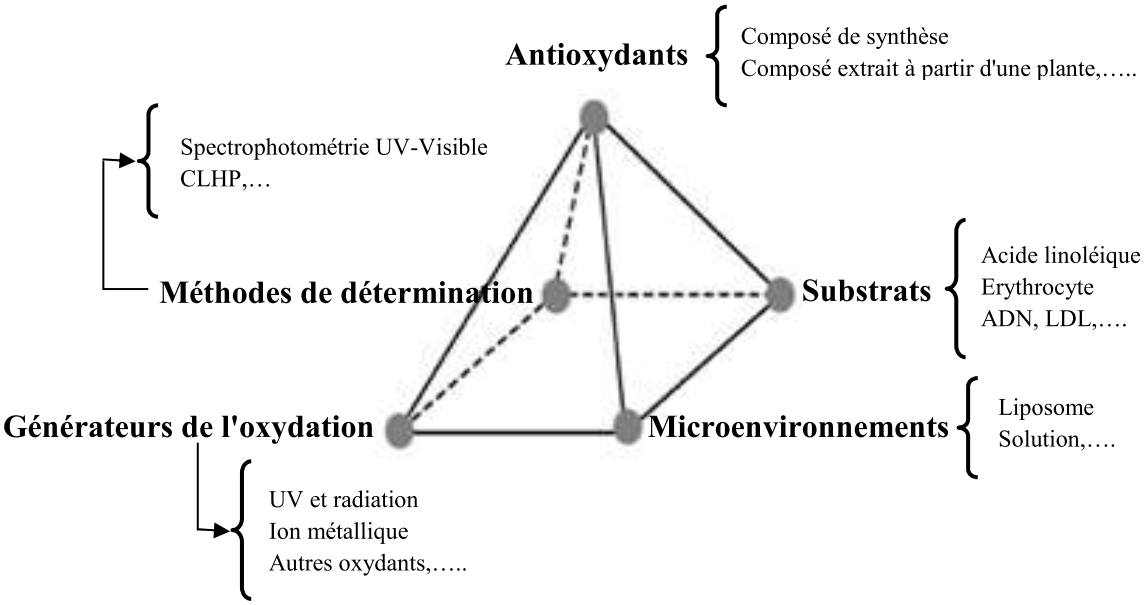


Figure 18 : Eléments à prendre en considération pour l'exploration du pouvoir anti oxydant d'une préparation donnée **(Liu, 2010)**.

Ainsi, nous pouvons distinguer des méthodes chimiques et des méthodes biologiques (sur lipoprotéines, érythrocytes, ADN,…).

D'une manière générale, les méthodes d'exploration de l'activité antioxydante peuvent être divisées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron **(Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005)**. Le premier groupe englobe des méthodes employées

souvent pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. Cette activité est exprimée par la mesure du degré de l'inhibition de l'oxydation **(Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998)**. Le second groupe intéresse les tests mesurant la capacité du piégeage (neutralisation) d'un radical libre ($OH^{\cdot}$, $O^{\cdot -}_2$, $NO^{\cdot}$,…) **(Sanchez-Moreno, 2002)**. Nous pouvons en citer à titre d'exemples :

- La méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) **(Cao *et al*., 1993)** ;
- La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) **(Benzie et Strain, 1996)** ;
- La méthode d'ABTS (le balayage ou bien la neutralisation du radical cationique 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). Le résultat est en général exprimé en TEAC (capacité antioxydante équivalente de Trolox) **(Miller *et al*., 1993)** ;
- Le balayage du radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) **(Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Molyneux, 2004)** ;
- La méthode de DMPD (le balayage du radical cation N, N`- p-di-méthylique –phénylènediamine) **(Li *et al*., 1994)**.

Partie 2 :
Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé, en grande partie, au laboratoire de Recherche des Sciences Fondamentales (Université Amar TELIDJI, Laghouat). Une partie a été réalisée au laboratoire d'Instrumentation et des Sciences Analytiques (Marseille, France).

Au départ, notre série d'étude comprenait une trentaine d'arbres répartis sur sept sites différents situés dans les régions de Laghouat et d'Ain Ouassara. Les fruits, cueillis durant le mois de septembre 2009, ont été triés, sur la base de leur couleur, en fruits verts, noirs et rouges. Les résultats extrêmement intéressants obtenus avec ces échantillons nous ont incités à faire d'autres récoltes en 2011 et en 2013. Ces dernières ont servi à étendre l'étude de l'effet de la progression de la maturation des fruits sur la composition et l'activité antioxydante de leurs huiles et de leurs tourteaux.

Il est primordial de préciser que les expérimentations effectuées sur ces échantillons l'ont été, en grande partie, sur la base des résultats obtenus avec la cueillette de 2009.

Il est aussi important de noter que des expérimentations qui n'étaient pas prévues au départ ont été accomplies afin d'apporter le maximum d'informations.

C'est pour ces raisons que nous avons jugé judicieux de répartir la partie expérimentale en trois chapitres complémentaires où chacun s'intéresse à une (ou plusieurs) récolte (s) d'une saison.

Chapitre 1 : Cueillette 2009

1. Matériel biologique

1.1. La récolte des échantillons

La récolte des fruits de *Pistacia atlantica* a été effectuée au mois de septembre 2009 au niveau de six sites différents de la Wilaya de Laghouat et au niveau de la région d'Ain Ouassara (Wilaya de Djelfa) (Figures 19 et 20 et Tableau 6). L'emplacement géographique des sept sites est donné comme suit :

1 : Dayet Tilghimt (à 95 km au sud de Laghouat sur la RN1) ;

2 : Dayet Ennous (à 22 km à l'ouest de Laghouat sur la RW230, entre Elkheneg et Elhouita) ;

3 : Daya (à 85 km au sud de Laghouat sur la RN1, entre Bellil et Tilghimt) ;

4 : Daya (à Nili, à 60 km au sud de Laghouat sur la RN1) ;

5 : Daya (à 40 km au sud de Laghouat sur la RN1) ;

6 : Daya (à 20 km au sud de Laghouat sur la RN1) ;

7 : Daya (à 20 km au sud d'Ain Ouassara, Wilaya de Djelfa, sur la RN1) ;

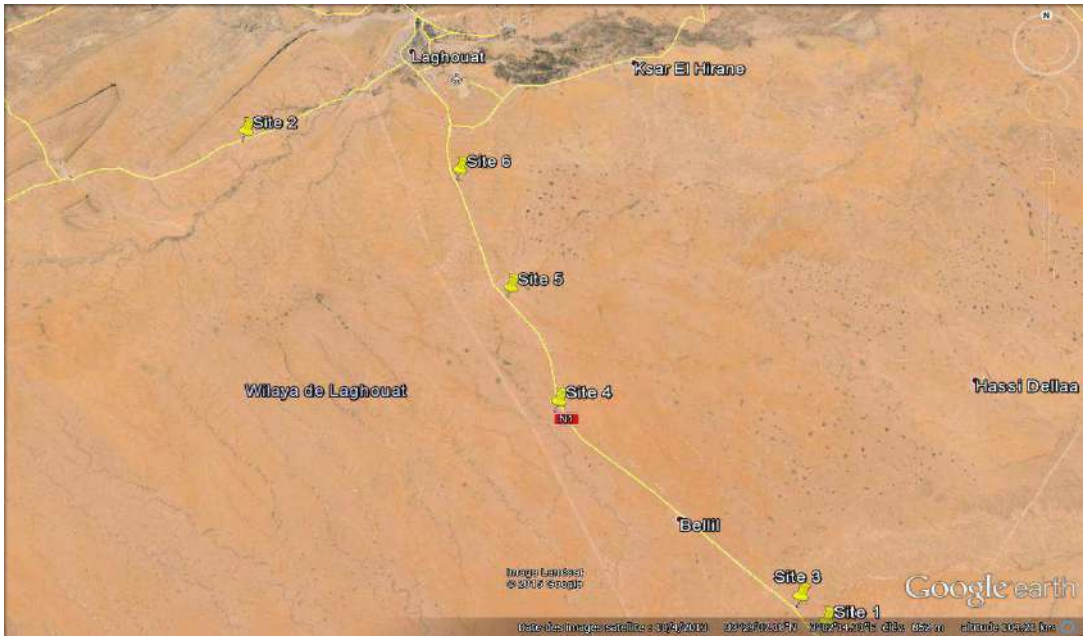


Figure 19 : Emplacement géographique des sites de cueillette des fruits de *Pistacia atlantica* de la région de Laghouat (capture d'écran Google Earth 2015).

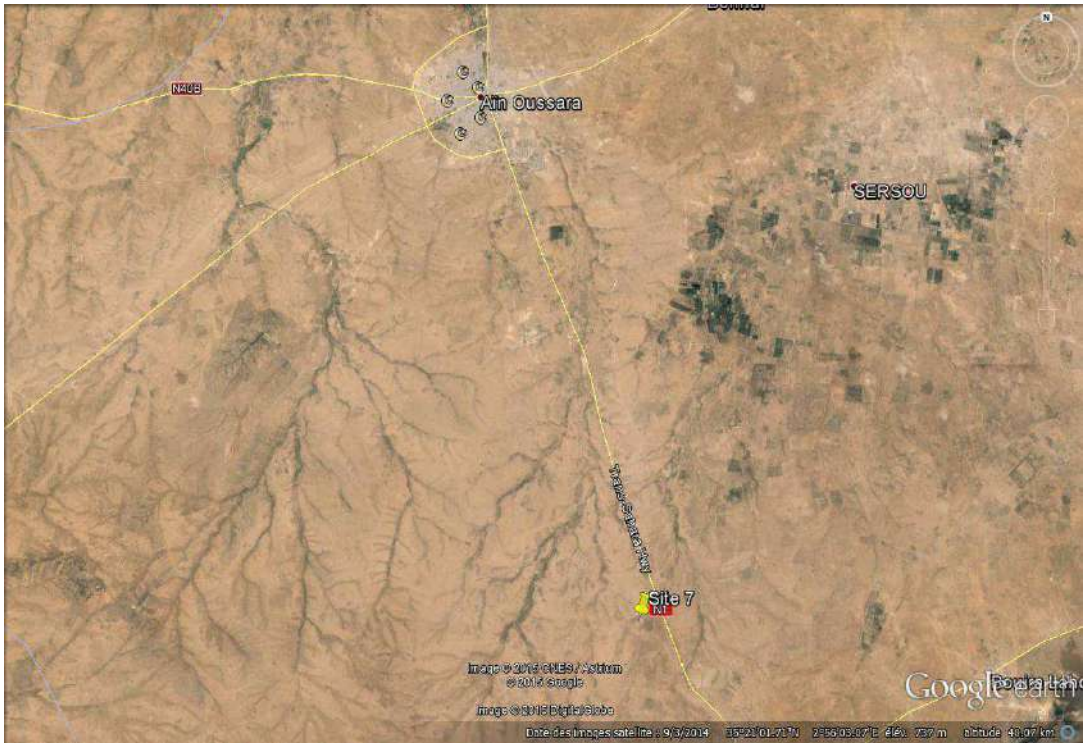


Figure 20 : Emplacement géographique du site de cueillette des fruits de *Pistacia atlantica* de la région d'Ain Ouassara (capture d'écran Google Earth 2015).

Tableau 6 : Caractéristiques géographiques des différents sites et nombre de pieds par site. (* **Seltzer, 1946**).

Site	Longitude	Latitude	Altitude	Etage bioclimatique*	Nombre de pieds
1 : Dayet Tilghimt	3°21'16.07"E	33°09'17.84"N	736 m	Aride	14
2 : Dayet Ennous	2°39'44.19"E	33°41'23.50"N	836 m		3
3 : Daya (entre Tilghimt et Bellil)	3°19'34.35"E	33°10'48.13"N	742 m		4
4 : Daya (Nili)	3°02'57.26"E	33°23'07.40"N	829 m		3
5 : Daya PK 440 RN1	2°59'32.58"E	33°30'37.07"N	873 m		2
6 : Daya PK 420 RN1	2°55'42.70"E	33°38'42.79"N	812 m		1
7 : Daya PK 220 RN1 (Ain Ouassara)	2°58'37.93"E	35°15'51.22"N	776 m	Semi aride	3

NB : Les données relatives à l'étage bioclimatique remontent à 1946. L'impact des changements climatiques, plusieurs décennies après, n'est pas à négliger.

Les fruits ont été cueillis en faisant le tour de l'arbre.

La figure 21 montre des fruits fraichement cueillis. Nous y distinguons des fruits rouges et verts (à gauche) et des fruits rouges et noirs (à droite).

Figure 21 : Fruits de *Pistacia atlantica* fraichement cueillis (26/9/2009).
A gauche, des fruits rouges et verts et à droite, des fruits rouges et noirs.

Après séchage, à l'abri de la lumière pendant une durée de 10 jours, les fruits ont été répartis, selon leur couleur, en échantillon vert, noir ou rouge. Les échantillons verts et noirs sont considérés comme matures tandis que ceux de couleur rouge sont considérés comme immatures. Nous avons attribué à chaque échantillon un code en deux chiffres et une lettre indiquant respectivement le site, l'arbre et la couleur du fruit. Ainsi, à titre d'exemple, le code 1.1V indique un fruit vert cueilli à partir de l'arbre numéro 1 du site 1. Les lettres N et R indiquent respectivement la couleur noire et la couleur rouge.

2. Méthodes

La démarche expérimentale pour ce chapitre peut être récapitulée selon l'organigramme suivant (Figure 22) :

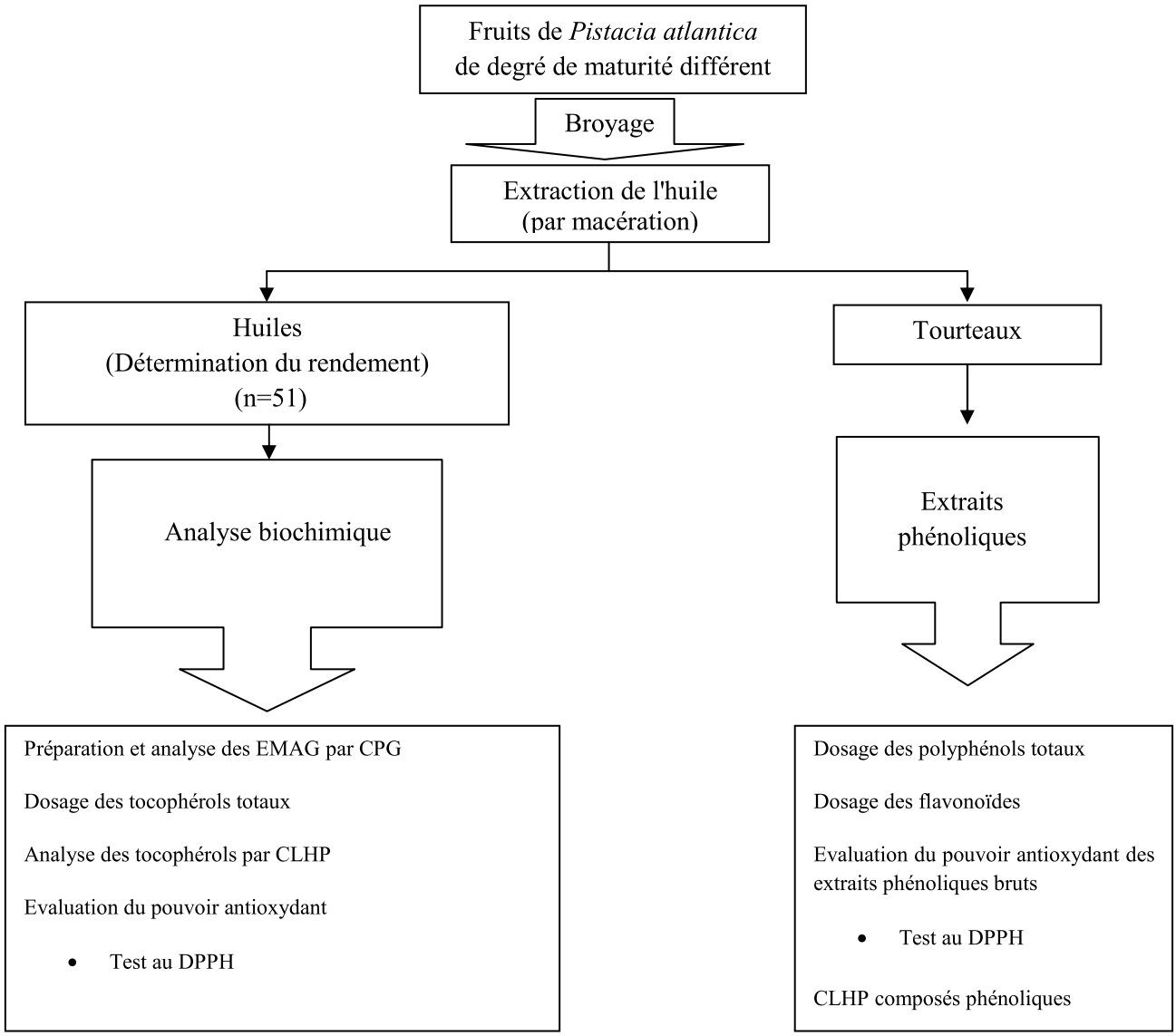


Figure 22 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2009.

2.1. Extraction des huiles

L'extraction de l'huile de *Pistacia atlantica* est réalisée par une double macération avec de l'hexane, sur les fruits finement broyée (50 à 100 g) à l'aide d'un mortier traditionnel.

L'extraction est menée à température ambiante sous agitation pendant 48 heures avec renouvellement du solvant. Après séchage par le sulfate de sodium anhydre et filtration, l'hexane est évaporé sous pression réduite à 40 °C**.** L'extrait obtenu est une huile brute**.** Les échantillons obtenus sont conservés à une température de +4°C dans des flacons en verre jusqu'à utilisation.

Chaque extrait est pesé, ce qui nous a permis de déterminer le rendement en huile à l'aide de la relation (1)

$$\text{Teneur en huiles} = \frac{\text{Masse de l'extrait X 100}}{\text{Masse de la prise d'essai (matière végétale broyée)}} \quad (1)$$

2.2. Analyse des acides gras

2.2.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés selon un protocole mis au point au niveau de notre laboratoire. Dans un ballon, 25 ml de solution méthanolique de soude ($NaOCH_3$ 0,5 %) sont ajoutés à 0,5 g d'huile. Le mélange est porté à ébullition à reflux pendant 30 min. Après refroidissement, les esters méthyliques sont récupérés par une double extraction liquide- liquide en utilisant 20 ml d'hexane et 20 ml d'eau distillée. La phase organique est lavée plusieurs fois par de l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage par sulfate de sodium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé à 40°C sous pression réduite.

Finalement, les EMAG sont purifiés, par flash chromatographie à l'aide d'une petite colonne (pipette Pasteur) remplie de gel de silice avec le chloroforme comme éluant.

- **Préparation de la pipette colonne**

Nous avons mis au fond d'une pipette Pasteur, un peu de coton puis, cette dernière a été remplie, jusqu'à 3 cm, de gel de silice en haut. Le gel est ensuite humidifié avec 1 ml de chloroforme.

- **Préparation de l'échantillon**

L'extrait d'EMAG est solubilisé dans 1 ml de chloroforme.

- **Élution**

L'échantillon est introduit par le haut de la colonne de gel de silice, puis élué avec 2,5 ml de chloroforme. Les EMAG ainsi purifiés sont conservés à +4°C jusqu'à leur analyse.

2.2.2. Analyse des esters d'acides gras par CPG

Les EMAG sont analysés par une chromatographie en phase gazeuse en présence de standards purs connus.

- Le model d'appareil : Chrompack CP 9002.
- Type de détecteur : FID (250 °C).

- Température de l'injecteur : 250 °C
- Programmation de la température du four : Isotherme.
- La colonne utilisée : DB23 (50% Cyanopropyl), 30 m, diamètre intérieur 0,32 mm, épaisseur du film 0,32 µm.
- Gaz vecteur : Azote à un débit de 1 ml/min
- Volume de l'échantillon injecté 1 µl.

2.3. Dosage des tocophérols totaux

Le dosage des tocophérols totaux a été effectué selon la méthode de dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel **(Emmerie et Engel, 1939)**.

- **Principe**

Cette technique est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}).

Ce dernier, en présence du phénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable absorbant à 510 nm.

- **Protocole**

Une droite d'étalonnage tracée à partir d'α-tocophérol commercial (vitamine E), permet de relier l'absorbance et la concentration de tocophérol exprimée en g/l. A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans le butanol une concentration de 1 g/l de solution mère et des solutions filles ayant des concentrations bien déterminées. Par la suite, à 1ml de chaque solution fille sont ajoutés 1ml de réactif phénantroline 0,4 % et 0,5 ml de $FeCl_3$ 0,12 % dans l'éthanol. Après 5 min, l'absorbance est lue à 510 nm.

Nous avons réalisé le dosage sur l'huile brute. Les échantillons d'huiles sont traités de la même façon. Le test est effectué deux fois. La concentration des tocophérols totaux dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la vitamine E et exprimée en milligrammes équivalents de vitamine E par 100 grammes d'huile (mg Vit E / 100g d'H).

Il est à indiquer que nous n'avons réalisé ce dosage que pour quelques échantillons représentatifs.

2.4. Analyse des tocophérols par CLHP

Une CLHP a été réalisée selon **(Nielsen et Hansen, 2008)** avec quelques modifications. Avant l'analyse, 25 à 35 mg de chaque échantillon huileux ont été

dilués dans 1ml de *n*-hexane. 20 µl de chaque solution sont injectés et analysés par CLHP (à 25°C).

- ❖ Le model d'appareil : Agilent 1290 Infinity équipé d'une pompe quaternaire modèle 1260.
- ❖ Type de détecteur : FLD 1260. Excitation à 295 nm, émission à 330 nm
- ❖ La colonne utilisée : SI 60 (polaire), 250 mm, diamètre intérieur 4,6 mm, épaisseur du film 5 µm (Lichrosorb, Merck KGaA, Allemagne).
- ❖ Phase mobile : *n*-hexane/isopropanol, 99/1, v/v en mode isocratique.
- ❖ Débit : 1ml/min
- ❖ Volume de l'échantillon injecté 20 µl.

Une mixture d'α-, de β-, de γ- et de δ-tocophérol standards est utilisée afin d'identifier les différents isomères de tocophérols. Des co-injections avec des échantillons sont également menées.

Une gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'α-tocophérol commercial. Ainsi, La concentration des tocophérols individuels dans chaque extrait a été calculée à partir de cette gamme et exprimée en milligrammes équivalents d'α-tocophérol par 100 grammes d'huile (mg Vit E / 100g d'H). La somme des tocophérols individuels donne la teneur en tocophérols totaux.

2.5. Évaluation du pouvoir antioxydant des huiles par le test au DPPH

- **Principe**

L'activité antioxydante de nos extraits exprime leur capacité à réduire les radicaux libres. Elle est étudiée par la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violette foncée lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle (Figure 23) **(Molyneux, 2004)**. La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) est effectuée par spectrophotométrie à 517 nm.

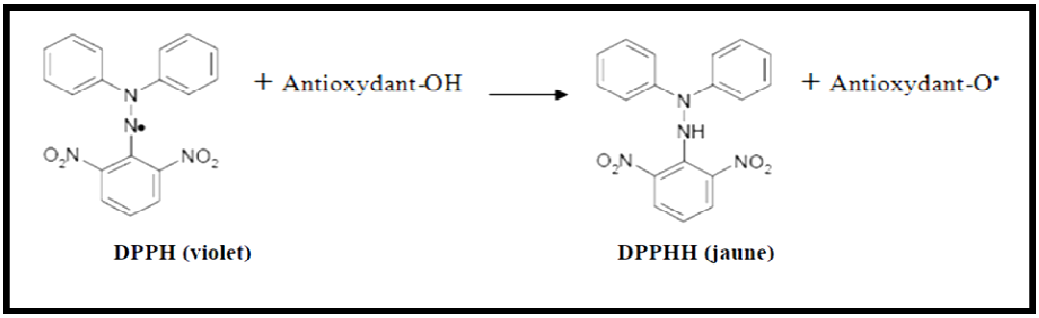


Figure 23 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH **(Molyneux, 2004)**.

- **Protocole**

Nous avons préparé la solution de DPPH de 250 µM dans le méthanol. 1ml de DPPH est ajouté à 1 ml d'une solution de vitamine E préparée dans le butanol ou les solutions des extraits. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH et le butanol est estimée à 517 nm. L'activité anti radicalaire est calculée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs}_{517nm} \text{ Contrôle} - \text{Abs}_{517nm} \text{ Echantillon})}{\text{Abs}_{517nm} \text{ Contrôle}} \text{ X } 100$$

La régression linéaire pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant permet de déterminer le paramètre EC_{50} «Efficient Concentration» qui est défini comme étant la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH. L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en EC_{50}.

2.6. Extraction, dosage, activité antioxydante et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux

2.6.1. Extraction des composés phénoliques

Pour l'extraction de ces composés, nous avons adopté la méthode couramment employée (**Hertog et Hollman, 1992 ; Djeridane *et al.*, 2006)** avec modifications (entre autre acétone à la place de l'alcool) . Les tourteaux sont soumis à un broyage fin à l'aide d'un mortier traditionnel. Après tamisage (Ø= 250µm), 10 g de la poudre obtenue sont ensuite macérées dans 100 ml d'un mélange acétone/eau (70/30 : V/V) pendant 48 heures à température ambiante avec renouvellement du solvant après 24 heures. Après filtration par un papier filtre, l'acétone a été évaporé sous pression réduite à 40 °C pour obtenir à la fin une phase aqueuse. Cette dernière est soumise à un lavage plusieurs fois avec de l'éther de pétrole afin de dépigmenter et d'achever la délipidation de la préparation. Il s'ensuit une triple extraction liquide – liquide avec l'acétate d'éthyle suivie d'un séchage par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis une filtration. Le solvant est évaporé sous pression réduite à 40 °C et l'extrait phénolique brut est repris dans 5ml de méthanol. Les extraits obtenus sont conservés à une température de (+4°C), dans des flacons en verre, jusqu'à utilisation.

2.6.2. Dosage des phénols totaux

- **Principe**

Le dosage des phénols totaux a été effectué selon la méthode de Singleton avec le réactif de Folin–Ciocalteu **(Singleton *et al.*, 1999 ; Naczk et Shahidi, 2004)**. Ce réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui permet le dosage des phénols dans le visible à une longueur d'onde de 760 nm.

- **Protocole**

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu. 100 µl de l'extrait est mélangé avec 500 µl du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué dans l'eau distillée). Après 2 minutes, 2 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 2 % ont été ajoutés. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm.

Une gamme étalon d'acide gallique à différentes concentrations a également été préparée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par g de matière végétale sèche.

2.6.3. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique de Zhishen employant le trichloride d'Aluminium. Elle est basée sur la complexation des flavonoïdes par l'Aluminium en utilisant le trichloride d'Aluminium ($AlCl_3$) comme réactif **(Zhishen *et al.*, 1999)**.

- **Protocole**

Un volume de 1 ml d'une solution d'$AlCl_3$ à 2 % (préparé dans le méthanol), est ajouté à 1 ml de l'extrait. Après une incubation pendant 20 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 409 nm.

Une gamme étalon de la rutine (dans le méthanol) à différentes concentrations a également été préparée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de rutine par g de matière végétale sèche.

2.6.4. Évaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts par le test au DPPH

L'activité antioxydant des extraits phénoliques a été évaluée *in vitro* par la méthode de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH de la même manière que pour les huiles. Cependant, l'eau distillée est utilisée comme diluant et la vitamine C est utilisée comme un antioxydant de référence.

2.6.5. CLHP des composés phénoliques

Avant analyse par CLHP, les extraits phénoliques sont filtrés sur 0,45 µm. les extraits des fruits matures (verts et noirs) sont dilués au 1/40 par contre ceux des fruits rouges (immatures) sont dilués au 1/50. 20 µl de chaque solution sont injectés et analysés par CLHP à 25°C.

Le chromatographe est de type LC Agilent 1200 series équipé d'un détecteur DAD et d'un passeur automatique piloté par le logiciel Chem Station. Deux colonnes Chromolith Performance RP-18 (4,6 mm x 100 mm) de la marque Merck précédées d'une pré-colonne Chromolith Performance RP-18 montées en série, ont été utilisées

- Type de détecteur : DAD (260 nm et 320 nm)
- Phase mobile : Eau acidifiée/Acétonitrile-Méthanol (70/30 v/v)
- Programme de variation de la phase mobile : 90% Eau acidifiée/10% Acétonitrile-Méthanol v/v pendant 10 min, puis 70% Eau acidifiée/30% Acétonitrile- Méthanol v/v pendant 15 min, puis 50% Eau acidifiée/50% Acétonitrile- Méthanol v/v pendant 5 min puis, 100% Acétonitrile- Méthanol pendant 5 min puis, 90% Eau acidifiée/10% Acétonitrile- Méthanol v/v pendant 10 min.
- Débit : 1 ml/min
- Volume de l'échantillon injecté 20 µl.

3. Analyse statistique des données

Le test de Student (échantillons inférieurs à 30) est utilisé pour la comparaison des moyennes. Le XLSTAT est utilisé, d'une part, pour l'analyse des données par ACP et, de l'autre part, pour les classifications ascendantes hiérarchiques (dendrogrammes) en vue de visualiser d'éventuelles dissimilarités entre les groupes étudiés.

Chapitre 2 : Cueillettes 2011

1. Matériel biologique

1.1. La récolte des échantillons

Cette récolte a été effectuée aux mois d'aout et septembre 2011 au niveau de trois sites différents de la région de Laghouat. Nous avons choisi l'arbre du site 1 pour le suivi de la maturation (arbre A).

Les trois sites sont répartis comme suit :

PK 440 sur la RN1 (site 5) : 6 échantillons à partir d'un seul arbre cueillis en aout et septembre ;

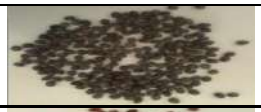
Dayet Ennouss (PK 22 sur la Rw230, vers Elhouita, site 2) : 2 échantillons à partir d'un seul arbre cueillis en septembre ;

Telghimt (PK 495 sur la RN1, site 1) : 4 échantillons, à partir de quatre pieds différents, cueillis en septembre.

Les données géographiques des trois sites ont déjà été rapportées dans le chapitre 1 (Tableau 6).

Pour réaliser les expériences, nous avons utilisé douze échantillons de fruits du Pistachier de l'Atlas. Il est important de préciser que la maturation des fruits de *Pistacia atlantica* ne se fait pas de la même manière au niveau d'un arbre donné. En effet, il y a des fruits qui achèvent leur maturation prématurément et d'autres mettent du temps. C'est pourquoi ce n'est pas surprenant de trouver des fruits matures au début d'aout et des fruits immatures à la fin de septembre. Les couleurs des fruits, lieu et date de récolte sont consignés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques des fruits de la saison 2011.

Code	Arbre	Couleur des fruits		Lieu de récolte	Date de récolte
5.A.V1 (mat)	**A**	Vert		PK 40 -RN1-	15-08-2011
5.A.RF1 (int)	**A**	Rouge foncé		PK 40 -RN1-	15-08-2011
5.A.RC1 (imm)	**A**	Rouge claire		PK 40 -RN1-	15-08-2011
5.A.V2 (mat)	**A**	Vert		PK 40 -RN1-	17-09-2011
5.A.RF2 (int)	**A**	Rouge foncé		PK 40 -RN1-	17-09-2011
5.A.RC2 (imm)	**A**	Rouge claire		PK 40 -RN1-	17-09-2011
2.B.V (mat)	**B**	Vert		PK 22 -Rw230- vers Elhouita,	Septembre 2011
2.B.RC (imm)	**B**	Rouge très claire (vers le Jaune)		PK 22 -Rw230- vers Elhouita,	Septembre 2011
1.C.N (mat)	**C**	Noir		Telghimt	Septembre 2011
1.D.C (imm)	**D**	Rouge claire		Telghimt	Septembre 2011
1.E.N (mat)	**E**	Noir		Telghimt	Septembre 2011
1.F.V (mat)	**F**	Vert		Telghimt	Septembre 2011

L'arbre A du site 5 (PK 440, RN1) ayant servi à deux cueillettes espacées d'un mois nous a permis d'avoir une nouvelle catégorie de fruits de couleur rouge foncée. Ces derniers sont considérés comme de fruits avec une maturité intermédiaire ou moyenne, ce qui nous permettra de suivre la variation des paramètres étudiés pour la première série ainsi que d'autres selon le degré de maturation.

2. Méthodes

La démarche expérimentale pour ce chapitre se résume selon l'organigramme ci-dessous (Figure 24) :

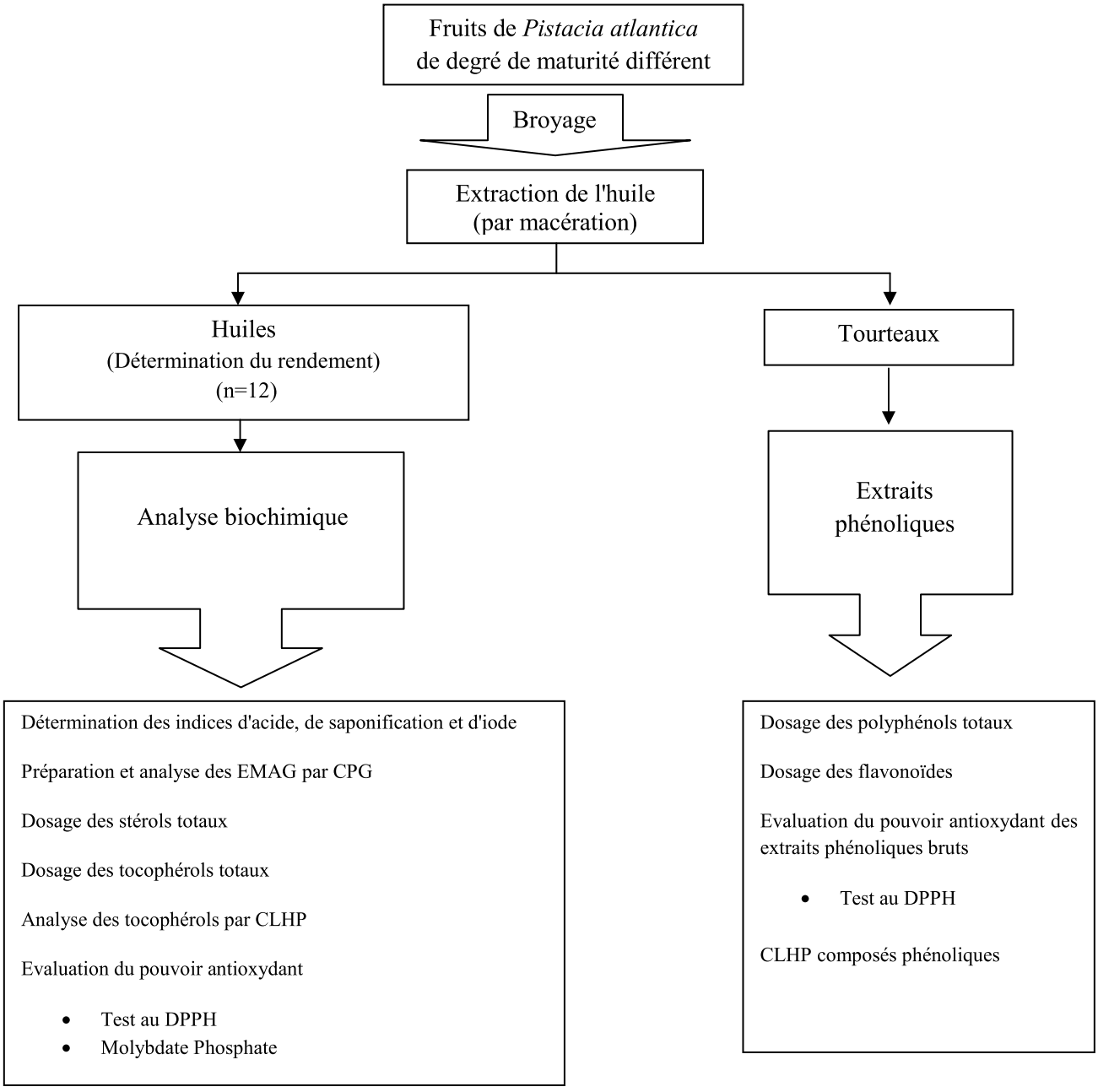


Figure 24 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2011.

2.1. Extraction des huiles

Les huiles sont extraites de la même manière que pour celles de la récolte de 2009**.** Leurs teneurs sont déterminées comme précédemment.

2.2. Analyses chimiques des huiles

Les indices chimiques caractérisant une matière grasse (indice d'acide, indice de saponification et indice d'iode entre autres) n'étaient pas prévus au départ (récolte 2009) car ils ont déjà été déterminés pour l'huile de *Pistacia atlantica* par le Pr Yousfi (**Yousfi *et al.*, 2003**). Les résultats obtenus pour la première série d'étude, concernant notamment les fruits rouges considérés comme immatures, nous ont incités à s'y intéresser. Ainsi, il nous serait possible de suivre leur variation au cours de la maturation des fruits. Ils sont déterminés selon les normes AFNOR (Association Française de Normalisation). Il s'agit de NF T60-204 pour l'indice d'acide, de NF T60-206 pour l'indice de saponification et de NF T60-203 pour l'indice d'iode **(AFNOR, 1984)**.

2.2.1. Détermination de l'indice d'acide

Dans un erlenmeyer de 50 ml, une prise d'essai de 0,5 g d'huile est dissoute dans 10 ml d'éthanol absolu avec 2 gouttes de Phénolphtaléine. Après agitation pour homogénéiser le mélange, l'ensemble est titré par une solution hydro-alcoolique de potasse de concentration 0,1 N, jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose persistante).

2.2.2. Détermination de l'indice de saponification

Dans un ballon de 250 ml, une prise d'essai de 1 g d'huile est dissoute dans 25 ml d'une solution hydro-éthanolique de KOH à 0,5 N, puis porté à l'ébullition sous reflux pendant 45 minutes. Une fois le temps d'ébullition terminé, deux gouttes de phénophtaléine sont ajoutées à ce mélange et l'excès de potasse est titré avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,5 N jusqu'à disparition de la coloration rose. Un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires.

De la différence entre le volume de la solution d'acide chlorhydrique employé dans le titrage à blanc et celui utilisé pour l'essai, nous déduisons la quantité de KOH nécessaire pour saponifier complètement l'huile ; puis en calculant cette quantité en milligrammes pour 1 gramme d'huile, nous obtenons l'indice de saponification.

2.2.3. Détermination de l'indice d'iode (II)

Ce paramètre permet de mesurer le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les huiles.

Une masse de 0,1 g huile est versée dans un erlenmeyer de 200 ml avec 5 ml de chloroforme et 12,5 ml de réactif de Wijs. L'erlenmeyer est bouché puis porté à l'obscurité pendant 60 minutes, enfin 7,5 ml de solution d'iodure de potassium et 50 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de Sodium 0,1 N jusqu'à décoloration jaune pâle. Finalement, 1 ml d'empois d'amidon est ajouté et le dosage est terminé jusqu'à décoloration. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions.

2.3. Analyse des acides gras

Les EMAG sont préparés et analysés d'une manière identique à celle abordée au premier chapitre.

2.4. Estimation de la fraction insaponifiable

Ce protocole n'a été appliqué que pour deux échantillons représentatifs. Il s'agit des échantillons 5.A.RC2 (de couleur rouge claire considéré immature) et 5.A.V2 (de couleur verte considéré mature), et ce en vue d'estimer la fraction insaponifiable selon le degré de maturité.

- **Saponification de l'huile**

Dans un ballon de capacité de 250 ml, une masse d'huile de 2 g et 50 ml d'une solution hydro-alcoolique de potasse de 1N sont mélangées. Le mélange obtenu est chauffé à reflux pendant 1h 30 mn. Après l'écoulement de ce temps, 50 ml d'eau distillée et 50 ml de diéthylether sont ajoutés, suivie d'une double extraction, avec séparation des fractions saponifiable et insaponifiable.

- **Traitement de la phase organique**

La phase éthérée obtenue est lavé plusieurs fois par l'eau distillée jusqu'à la neutralisation. Cette phase est séchée par le sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le rendement de la fraction insaponifiable est déterminé par le calcul de la différence entre le ballon contenant la fraction insaponifiable et le ballon vide.

2.5. Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles

2.5.1. Dosage des stérols totaux

Comme il a été évoqué pour les indices chimiques, les stérols totaux et individuels avaient déjà été étudiés par le Pr Yousfi **(Yousfi *et al.*, 2002)**. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement à la variation des stérols totaux selon le degré de maturation. Il nous a été impossible d'effectuer une analyse par CPG des stérols individuels.

- **Principe**

Le principe est basé sur la solubilisation des stérols par addition de réactif de Liebermann (le réactif spectrale de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique).

Le dosage de stérol est réalisé par la formation d'un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm **(Burck *et al.*, 1974)**.

- **Protocole**

A partir de solutions choloroformiques de cholestérol à différentes concentrations, une série de préparations a été préparé afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de la concentration. A 1 ml de chaque solution sont ajoutés 2 ml du réactif de Liebermann. Après incubation à l'obscurité pendant 25 minutes, l'absorbance à 550 nm de chaque solution est lue. Nous obtenons ainsi la courbe liant la densité optique en fonction de la concentration.

Le dosage sur l'huile brute est effectué de la même manière. Le test est effectué deux fois. La concentration des stérols dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec le cholestérol et exprimée en milligrammes équivalents de cholestérol par grammes d'huile (mg Chol/g d'H).

2.5.2. Dosage des tocophérols totaux

Le dosage des tocophérols a été effectué selon la même méthode abordée au chapitre 1

2.5.3. Analyse des tocophérols par CLHP

Elle est identique à celle exposée au chapitre 1.

2.6. Évaluation du pouvoir antioxydant

Nous nous sommes intéressés à l'activité antioxydante des huiles des fruits de la deuxième récolte par deux tests de référence. Le test au DPPH déjà abordé au chapitre

1 et le test au Molybdate Phosphate permettant d'apprécier le pouvoir réducteur des extraits.

2.6.1. Test au DPPH

Protocole identique à celui du chapitre 1

2.6.2. Test au Molybdate Phosphate

- **Principe**

Ce test est un essai spectrophotométrique rapide et direct qui a été développé pour la détermination quantitative de la capacité réductrice d'un anti oxydant. Il est basé sur la réduction de l'ion Mo (VI) à l'ion Mo (V) par l'échantillon développant ainsi un complexe phosphomolybdique vert à pH acide donnant une absorbance à 695 nm **(Prieto *et al*., 1999)**.

- **Protocole**

Le réactif de ce test est un mélange de solutions aqueuses d'acide sulfurique (0,6 M), de phosphate sodique (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM).

A partir d'une solution mère de chaque huile à tester, des solutions filles ayant des concentrations bien déterminées sont préparées. Un volume de 2 ml du réactif est ajouté à 200 µl de chaque solution fille. Après incubation à 95°C, dans un bain-marie pendant 90 minutes et refroidissement, la lecture est faite à une longueur d'onde de 695 nm. L'absorbance est exprimée en fonction de la concentration en huile. Le pouvoir antioxydant de nos échantillons est exprimé en capacité équivalente de la vitamine E. Ce test n'a pu être accompli que pour trois échantillons représentatifs de degré de maturité différent.

2.7. Extraction, dosage et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux

L'extraction, le dosage, l'évaluation de l'activité antioxydante et l'analyse par CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica* de la deuxième cueillette sont effectués comme pour ceux de la première cueillette.

3. Analyse statistique des données

Le test de Student (échantillons inférieurs à 30) est utilisé pour la comparaison des moyennes. Le XLSTAT est utilisé pour les classifications ascendantes hiérarchiques (dendrogrammes) en vue de comparer nos huiles avec d'autres huiles végétales.

Chapitre 3 : Cueillettes 2013

1. Matériel biologique

1.1. La récolte des échantillons

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à trois arbres de trois régions de la région de Laghouat (Nili, Dayet Ennouss et PK 420 sur la RN1). Deux arbres donnant un fruit mature vert (Dayet Ennouss et PK 420 sur la RN1) et un arbre donnant un fruit mature noir (Nili). Ce dernier a servi à deux cueillettes espacées de deux semaines (en aout), tandis que les deux autres ont servi à trois cueillettes espacées de quinze jours (aout et septembre). Au total nous en avons obtenu vingt et un (21) échantillons répartis en deux groupes. Treize échantillons de maturité différente (obtenus après tri selon la couleur) et huit autres échantillons où chacun est constitué d'un "mélange" de fruits de différents degrés de maturité.

Il est primordial de justifier le choix de ces derniers échantillons. Ils ont été obtenus par la prise, au hasard, de 50 à 100 g de fruits (par arbre et par cueillette) avant l'opération de tri selon leur couleur. Ces "mélanges" ont été inclus dans l'étude par souci de suivre la variation des paramètres étudiés selon la date de la récolte quelque soit la couleur du fruit. Ceci pourrait fournir des informations utiles sur ces "mélanges" (non triés) d'autant plus que la cueillette, par la population, est, en général, aléatoire. En outre, le fastidieux travail de tri selon la couleur, graine par graine, ne serait pas pratique dans le cas de grandes quantités de fruits.

Les trois sites concernées par ce chapitre sont :

Site 1 : Nili, à 60 km au sud de Laghouat sur la RN1 : 6 échantillons (immature, mature et mélange) issus de deux cueillettes ;

Site 2 : Dayet Ennouss (PK 22 sur la Rw230, vers Elhouita) : 12 échantillons (immature, maturité intermédiaire, mature et mélange) issus de trois cueillettes ;

Site 3 : PK 420 sur la RN1 : 3 échantillons mélange issus de trois cueillettes.

Les données géographiques des trois régions ont déjà été rapportées dans le chapitre 1 (Tableau 6).

Le séchage des fruits a été effectué dans un endroit aéré à l'ombre à une température ambiante. Les caractéristiques des fruits étudiés sont mentionnées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des fruits de la saison 2013.

Code	Arbre	Couleur des fruits		Lieu de récolte	Date de récolte
4.G.RC.1 (imm)	G	Rouge clair		Nili PK 460 RN1	16/08/2013
4.G.N.1 (mat)		Noir		Nili PK 460 RN1	
4.G.MEL.1 (mél)		Rouge et Noir		Nili PK 460 RN1	
4.G.RC.2 (imm)		Rouge clair		Nili PK 460 RN1	30/08/2013
4.G.N.2 (mat)		Noir		Nili PK 460 RN1	
4.G.MEL.2 (mél)		Rouge et Noir		Nili PK 460 RN1	
6.H.MEL.1 (mél)	H	Rouge et jaune avec quelques fruits verts		PK 420 RN1	16/08/2013
6.H.MEL.2 (mél)		Vert et rouge		PK 420 RN1	02/09/2013
6.H.MEL.3 (mél)		Vert et rouge		PK 420 RN1	16/09/2013

2.B.RC.1 (imm)	B	Rouge très clair		Dayet Ennous PK 22 RW230	16/08/2013
2.B.RF.1 (int)		Rouge très foncé (vers le vert)		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.V.1 (mat)		Vert		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.MEL.1 (mél)		Vert et rouge		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.RC.2 (imm)		Rouge très clair (vers le jaune)		Dayet Ennous PK 22 RW230	02/09/2013
2.B.RF.2 (int)		Rouge très foncé (vers le vert)		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.V.2 (mat)		Vert		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.MEL.2 (mél)		Vert et rouge clair		Dayet Ennous PK 22 RW230	

2.B.RC.3 (imm)		Rouge très clair (vers le jaune)		Dayet Ennous PK 22 RW230	16/09/2013
2.B.RF3 (int)		Rouge très foncé (vers le vert)		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.V.3 (mat)		Vert		Dayet Ennous PK 22 RW230	
2.B.MEL.3 (mél)		Vert et rouge		Dayet Ennous PK 22 RW230	

2. Méthodes

La démarche expérimentale pour ce chapitre se résume selon l'organigramme suivant (Figure 25) :

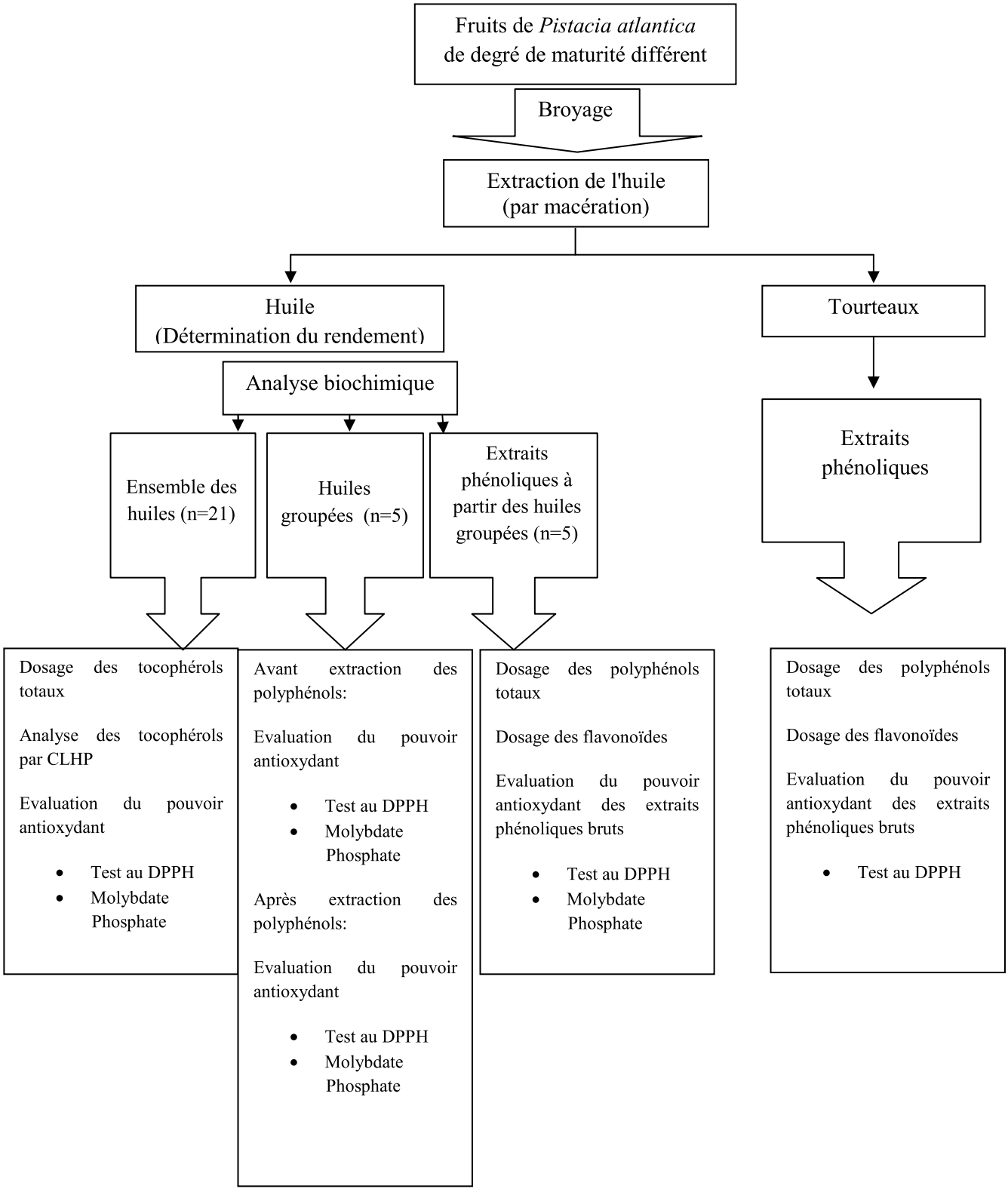


Figure 25 : Organigramme résumant la démarche expérimentale pour les fruits de la saison 2013.

2.1. Extraction et étude des huiles

Les vingt et un (21) échantillons huileux (obtenus d'une manière identique à celle pour les récoltes de 2009 et de 2011) sont, dans un premier temps, étudiés individuellement avant le regroupement d'échantillons avec le même stade de maturation afin d'accomplir d'autres tests nécessitant des quantités importantes d'huile.

2.1.1. Première partie : Etude individuelle des 21 échantillons huileux

Ces échantillons ont été traités de la même manière que ceux des chapitres précédents à savoir le dosage de tocophérols totaux, l'analyse de ces derniers par CLHP et évaluation de leur pouvoir antioxydant.

2.1.2. Deuxième partie : Etude de cinq échantillons obtenus après groupement des huiles

Avant de procéder à l'extraction des composées phénoliques et étant donné leur nature hydrosoluble (faible rendement dans l'huile), nous avons jugé utile de grouper les échantillons d'huile selon leur degré de maturité (Tableau 9) afin d'augmenter la masse d'extraits phénoliques obtenus.

Tableau 9 : Composition des échantillons huileux groupés.

Echantillon	Huiles groupées	Masse des huiles groupées (g)
I (Immature)	4.G.RC.1 + 4.G.RC.2 +4.G.MEL.1	31,13
II (Mature)	4.G.N.1 + 4.G.N.2 + 4.G.MEL.2	25,27
III (Immature)	2.B.RC.1 + 2.B.RC.2 + 2.B.RC.3 + 2.B.RF.1	22,74
IV (mature)	2.B.V.1 + 2.B.V.2 + 2.B.V.3 + 2.B.RF.3	26,39
V (mélange)	6.H.MEL.1 + 6.H.MEL.2 + 6.H.MEL.3 + 2.B.RF.2	38,88

2.1.2.1. Etude des échantillons huileux

Dans un souci de clarifier le rôle de chacun des éléments dotés d'activité antioxydante, nous avons traité les cinq échantillons d'huiles groupées de la même manière que celle décrite précédemment pour l'ensemble des huiles à savoir activité antioxydante par le test au DPPH et au Molybdate Phosphate, et ce avant et après l'extraction des composés phénoliques.

2.1.2.2. Extraction des composés phénoliques à partir de l'huile

L'extraction des polyphénols à partir de l'huile des fruits du pistachier de l'Atlas a été effectuée selon l'organigramme suivant (Figure 26) :

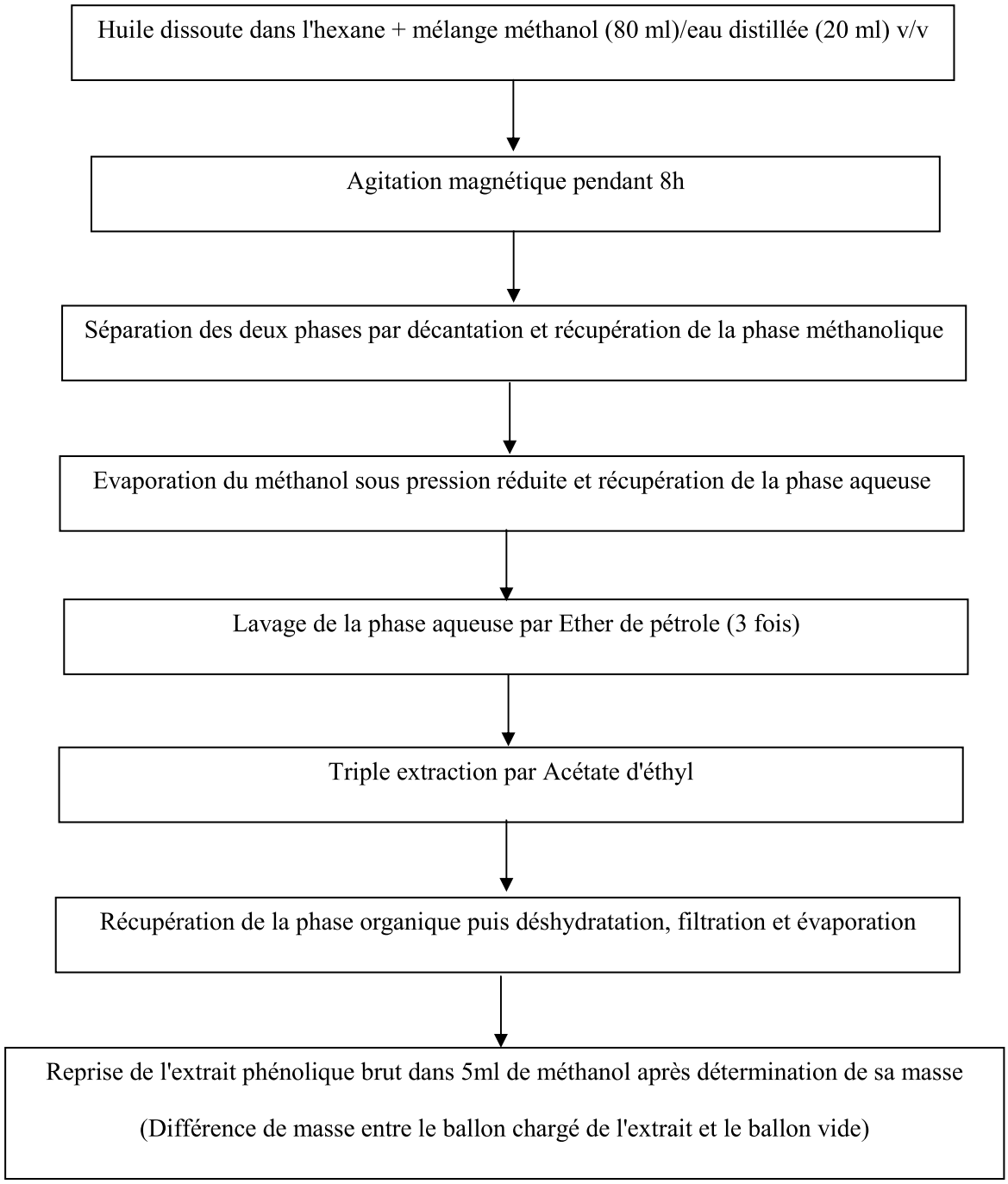


Figure 26 : Organigramme présentant le protocole d'extraction des polyphénols à partir de l'huile des fruits du Pistachier de l'Atlas.

2.1.2.3. Analyses quantitatives des composés phénoliques

Le rendement en composés phénoliques est défini comme étant le rapport entre la masse d'extraits obtenu après extraction et la masse de l'huile groupée de chaque échantillon. La détermination des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits phénoliques obtenus à partir de l'huile est effectuée comme précédemment. Il en est de même pour l'activité antioxydante.

2.2. Extraction, dosage et activité antioxydante des extraits phénoliques à partir des tourteaux

L'extraction, le dosage et l'activité antioxydante des extraits phénoliques à partir des tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica* de la saison 2013 sont effectués d'une manière identique à celle abordée en chapitres 1 et 2.

3. Analyse statistique des données

Le test de Student (pour échantillons inferieurs à 30) est utilisé pour la comparaison des moyennes.

Partie 3 :
Résultats et discussion

Chapitre 1 : Cueillette 2009

1. Teneur en huiles

Au terme de l'opération d'extraction des huiles, nous avons obtenu cinquante et un (51) échantillons huileux à partir de fruits cueillis sur trente arbres. Les fruits verts et noirs (considérés comme matures) ont fourni une huile brute jaune d'un aspect limpide, tandis que celle issue de fruits rouges (considérés comme immatures) a une couleur verte et une odeur très agréable. Cette huile se solidifie partiellement à température ambiante.

Le rendement d'extraction varie considérablement selon la couleur du fruit. Ainsi, les rendements les plus conséquents ont été obtenus pour les fruits verts et noirs. La teneur en huiles varie de 29,65 à 46,78 et de 32,52 à 49,8 % (m/m) pour, respectivement, les fruits verts et noirs. Pour les fruits rouges, elle est comprise entre 6,73 et 13,24 % (Tableaux 10, 11 et 12). Nous constatons un rendement légèrement en baisse, précisément pour les fruits matures, par rapport à ce qui a été rapporté précédemment où la teneur était 52% **(Yousfi *et al.*, 2003)**. Ceci serait dû incontestablement à la méthode d'extraction que nous avons adoptée (macération à température ambiante) qui fournit en général un rendement légèrement inférieur par rapport à l'extraction au Soxhlet.

Tableau 10 : Teneur en huiles dans les fruits verts de *Pistacia atlantica.*

Ech (Vert)	**1.1V**	**1.3V**	**1.5V**	**1.6V**	**1.7V**	**1.9V**	**1.10V**	**1.11V**	**1.13V**	**2.1V**	**3.1V**
Rendement (% m/m)	42,21	39,31	45,7	46,78	37,64	39,57	36,68	34,29	40,27	29,65	37,28

Suite du tableau 10.

Ech (Vert)	**3.3V**	**3.4V**	**4.1V**	**4.2V**	**4.3V**	**5.1V**	**5.2V**	**6.1V**	**7.1V**	**7.3V**
Rendement (% m/m)	32,68	42,35	30,78	34,18	34,18	31,78	40,35	29,94	35,26	41,25

Tableau 11 : Teneur en huiles dans les fruits noirs de *Pistacia atlantica.*

Ech (Noir)	**1.1N**	**1.2N**	**1.4N**	**1.7N**	**1.8N**	**1.12N**	**3.2N**	**4.3N**	**7.2N**	**7.3N**
Rendement (% m/m)	32,53	39,89	45,34	38,91	49,8	39,24	48,56	41,67	39,24	43,21

Tableau 12 : Teneur en huiles dans les fruits rouges de *Pistacia atlantica*.

Ech (Rouge)	**1.1R**	**1.2R**	**1.3R**	**1.5R**	**1.10R**	**1.14R**	**2.1R**	**2.2R**	**2.3R**	**3.2R**
Rendement (% m/m)	11,29	7,79	8,86	10,48	6,73	7,47	11,27	6,98	7,79	7,29

Suite du tableau 12.

Ech (Rouge)	**3.3R**	**3.4R**	**4.1R**	**4.2R**	**4.3R**	**5.1R**	**5.2R**	**6.1R**	**7.1R**	**7.2R**
Rendement (% m/m)	9,45	11,95	12,65	8,68	12,47	7,95	12,49	8,42	8,68	13,24

La comparaison entre les deux groupes principaux (mature et immature, tableau 13) indique clairement une différence significative (38,73±5,39 contre 9,6%±2,16, p<0,001). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par la littérature pour les fruits de *Pistacia lentiscus* **(Charef *et al.*, 2008 ; Trabelsi *et al.*, 2012)**.

Tableau 13 : Teneurs moyennes en huiles dans les fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons	Moyenne immature (Rouge)	Moyenne mature (Vert)	Moyenne mature (Noir)	Moyenne mature (Noir et Vert)
Rendement (% m/m)	9,60±2,16**	37,24±4,97	41,84±5,11	38,73±5,39

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Concernant l'emplacement géographique des pieds, nous ne notons pas de différences significatives entre les sept sites quoique les échantillons 2.1V et 6.1V représentant respectivement les sites 2 (Dayet Ennouss) et 6 (PK 420 RN1) avaient un rendement inférieur par rapport à leurs paires des autres sites (Tableau 14).

Tableau 14 : Teneurs moyennes en huiles dans les fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique des arbres.

Echantillons	**Rendement (% m/m)**
1.V	40,27±4,07
2.V	29,65
3.V	37,44±4,84
4.V	33,05±1,96
5.V	36,07±6,06
6.V	29,94
7.V	38,26±4,24
1.N	40,95±5,94
3.N	48,56
4.N	41,67
7.N	41,23±2,81
1.R	8,77±1,79
2.R	8,68±2,28
3.R	9,56±2,33
4.R	11,27±2,24
5.R	10,22±3,21
6.R	8,42
7.R	10,96±3,22

Il est à indiquer que certains échantillons huileux (issus notamment de fruits rouges) dont le rendement était très faible n'ont pas été testés ultérieurement.

2. Analyse des acides gras par CPG

Les résultats de l'analyse chromatographique de nos échantillons sont récapitulés dans les tableaux 15, 16 et 17 où les proportions relatives des différents acides gras constitutifs sont indiquées. Quant aux différents chromatogrammes, nous en présentons quelques uns en Annexe.

Nous y notons la présence, à des proportions très variées, de huit acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales. Il s'agit des acides palmitique, oléique, et linoléique, fortement représentés, et, à des proportions faibles, des acides palmitoléique, stéarique, linolénique, arachidique, gondoïque. L'acide myristique (C14:0) est détecté dans la plupart des échantillons mais à un taux très faible.

Tableau 15 : Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits verts (matures) de *Pistacia atlantica*.

Ech (Vert)	**1.1V**	**1.3V**	**1.5V**	**1.6V**	**1.7V**	**1.9V**	**1.10V**	**1.11V**	**1.13V**	**2.1V**	**3.1V**	**3.3V**	**3.4V**	**4.1V**	**4.2V**	**4.3V**	**5.1V**	**5.2V**	**6.1V**	**7.1V**	**7.3V**
C14:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:00	23,76	20,07	23,66	25,38	21,18	20,38	23,29	22,81	22,08	24,59	22,24	23,64	22,11	21,17	20,18	27,25	19,38	22,97	25,45	21,91	20,65
C16:1ω7	1,32	1,38	0,81	0,86	0,8	0,89	1,76	0,82	1,44	2,4	1,23	1,28	1,5	0,76	1,24	1,33	0,75	0,61	1,5	1,27	0,86
C18:00	2,42	2,21	1,95	2,1	1,96	2,34	1,92	1,79	1,73	1,82	1,41	2,29	1,72	1,83	1,38	0,94	1,37	1,99	1,2	1,33	1,66
C18:1ω9	44,24	49,46	45,84	48,32	45,06	49,78	47,91	47,68	46,84	44,33	48,23	45,38	42,58	47,23	47,67	46,57	51,86	48,59	41,61	53,51	51,46
C18:2ω6	26,43	24,76	26,02	21,77	29,22	23,93	23,46	24,73	26,31	24,41	25,68	25,56	30	27,61	27,92	22,18	25,72	24,37	28,61	21,07	24,41
C18:3ω3	1,2	1,3	1,16	0,73	0,84	1,27	0,63	0,94	1,01	0,46	1,12	1,51	1,18	0,91	0,74	0,49	0,79	0,6	1,36	0,88	0,62
C20:00	0,22	0,5	0,53	0,07	0,46	-	-	0,17	0,36	-	-	-	0,16	0,35	0,1	0,25	-	-	-	-	0,31
C20:1ω9	0,39	-	-	0,5	0,41	-	0,28	0,7	-	-	-	-	0,41	-	0,32	0,29	-	-	-	-	-
Autres AG	0,02	0,32	0,03	0,27	0,07	1,41	0,75	0,36	0,23	1,99	0,09	0,34	0,34	0,14	0,77	0,7	0,13	0,87	0,27	0,03	0,03
AGI	**73,58**	**76,9**	**73,83**	**72,18**	**76,33**	**75,87**	**74,04**	**74,87**	**75,6**	**71,6**	**76,26**	**73,73**	**75,67**	**76,51**	**77,89**	**70,86**	**79,12**	**74,17**	**73,08**	**76,73**	**77,35**
AGS	**26,4**	**22,78**	**26,14**	**27,55**	**23,6**	**22,72**	**25,21**	**24,77**	**24,17**	**26,41**	**23,65**	**25,93**	**23,99**	**23,35**	**21,66**	**28,44**	**20,75**	**24,96**	**26,65**	**23,24**	**22,62**
AGI/AGS	**2,79**	**3,38**	**2,82**	**2,62**	**3,23**	**3,34**	**2,94**	**3,02**	**3,13**	**2,71**	**3,22**	**2,84**	**3,15**	**3,28**	**3,60**	**2,49**	**3,81**	**2,97**	**2,74**	**3,30**	**3,42**
Cox	**3,42**	**3,33**	**3,39**	**2,88**	**3,64**	**3,24**	**3,03**	**3,23**	**3,40**	**3,06**	**3,37**	**3,41**	**3,77**	**3,51**	**3,51**	**2,86**	**3,34**	**3,13**	**3,66**	**2,90**	**3,16**

AGI : Acides gras insaturés, AGS : Acides gras saturés, Cox : *Calculated oxidizabillity value.*

Tableau 16 : Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits noirs (matures) de *Pistacia atlantica*.

Ech (Noir)	**1.1N**	**1.2N**	**1.4N**	**1.7N**	**1.8N**	**1.12N**	**3.2N**	**4.3N**	**7.3N**
C14:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:00	22,05	18,46	24,97	23,69	19,28	22,14	21,75	21,06	17,63
C16:1ω7	1,45	2,52	1,76	0,88	0,69	0,76	0,67	1,06	0,84
C18:00	1,76	2,79	1,19	1,64	0,72	2,04	2,32	1,99	1,73
C18:1ω9	46,78	42,38	46,18	42,09	50,89	48,57	44,02	48,78	50,7
C18:2ω6	25,8	29,34	24,54	30,13	26,95	25,58	29,37	25,31	27,76
C18:3ω3	1,24	2,8	1,08	1,34	0,96	0,72	0,99	1	0,8
C20:00	0,15	-	-	-	-	-	0,28	0,17	0,35
C20:1ω9	0,36	1,47	-	-	0,47	-	0,47	0,39	-
Autres AG	0,41	0,24	0,28	0,23	0,04	0,19	0,13	0,24	0,19
AGI	**75,63**	**78,51**	**73,56**	**74,44**	**79,96**	**75,63**	**75,52**	**76,54**	**80,1**
AGS	**23,96**	**21,25**	**26,16**	**25,33**	**20**	**24,18**	**24,35**	**23,22**	**19,71**
AGI/AGS	**3,16**	**3,69**	**2,81**	**2,94**	**4,00**	**3,13**	**3,10**	**3,30**	**4,06**
Cox	**3,39**	**4,05**	**3,22**	**3,81**	**3,49**	**3,28**	**3,68**	**3,31**	**3,54**

AGI : Acides gras insaturés, AGS : Acides gras saturés, Cox : *Calculated oxidizabillity value*.

Tableau 17 : Pourcentages relatifs des acides gras constitutifs de l'huile des fruits rouges (immatures) de *Pistacia atlantica.*

Ech (Rouge)	**1.1R**	**1.5R**	**2.1R**	**3.3R**	**3.4R**	**4.1R**	**4.3R**	**5.2R**	**7.2R**
C14:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:00	16,06	15,55	15,46	15,38	15,72	15,06	21,44	14,19	14,07
C16:1ω7	1,86	0,66	0,77	0,96	0,22	1,14	0,88	0,51	0,81
C18:00	1,47	1,88	2,22	2,27	1,97	1,34	1,76	2,39	1,64
C18:1ω9	47,12	46,02	48,33	45,63	48,5	48,73	46,83	51,67	52,15
C18:2ω6	31,61	33,93	32,15	33,02	31,06	31,81	27,5	28,73	28,87
C18:3ω3	1,63	1,24	1,04	1,61	0,93	0,71	1,02	0,4	0,67
C20:00	-	0,48	-	0,18	0,14	0,45	0,13	0,27	0,39
C20:1ω9	-	-	-	0,29	0,5	0,35	0,32	0,76	0,41
Autres AG	0,25	0,24	0,03	0,66	0,96	0,76	0,12	1,84	0,99
AGI	**82,22**	**81,85**	**82,29**	**81,51**	**81,21**	**82,74**	**76,55**	**82,07**	**82,91**
AGS	**17,53**	**17,91**	**17,68**	**17,83**	**17,83**	**16,85**	**23,33**	**16,85**	**16,1**
AGI/AGS	**4,69**	**4,57**	**4,65**	**4,57**	**4,55**	**4,91**	**3,28**	**4,87**	**5,15**
Cox	**4,08**	**4,22**	**4,02**	**4,21**	**3,89**	**3,92**	**3,52**	**3,56**	**3,64**

AGI : Acides gras insaturés, AGS : Acides gras saturés, Cox : *Calculated oxidizabillity value*.

A notre connaissance, c'est pour la première fois où la variation de la composition en acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* selon le degré de maturation est abordée. Les travaux antérieurs se sont intéressés à des huiles issues de fruits matures **(Yousfi *et al.*, 2002 ; Benhassaini *et al.*, 2007)**.

Les acides gras saturés dans nos huiles sont les acides palmitique, stéarique et arachidique dont les proportions varient de 19,71 à 28.44 % pour les huiles des fruits matures et de 16,1 à 23,33% pour les huiles des fruits immatures. L'acide palmitique étant le composé majoritaire parmi les acides gras saturés. Il représente entre 14,07 à 21,44 % (moyenne 15,88 %±2,19, tableau 18) pour les fruits immatures, et entre 17,63 et 28,59 % (moyenne 22,04 %±2,17, tableau 18) pour les fruits matures. La différence entre ces deux moyenne est significative ($p<0,001$). L'acide stéarique est détecté dans toutes les huiles mais avec des proportions faibles ne dépassant pas la valeur 2,79 %. Concernant les acides gras insaturés, les acides palmitoléique, oléique, linoléique et linolénique sont détectés dans toutes les huiles. Ils représentent un pourcentage total de 67,6 à 82,1 % dans les huiles des fruits matures, et de 76,55 à 82,91 % dans les huiles des fruits immatures. Ils sont représentés essentiellement par l'acide oléique (C18:1ω9) dont les proportions varient de 45,63 à 52,15 % pour les fruits rouges (moyenne 48,33 %±2,30) et de 42,09 à 53,51 % pour les fruits verts et noirs (moyenne 47,16 %±3,03, tableau 18) ainsi que l'acide linoléique (C18:2ω6) dont les proportions respectives sont de 27,5 à 33,93 % (moyenne 30,96 %±2,15, tableau 18) et de 20,41 à 30,13 % (moyenne 25,83 %±2,58). Ces deux dernières moyennes sont significativement différentes ($p<0,001$). Ce résultat est étayé par la littérature où il a été rapporté une diminution de la proportion de l'acide linoléique au cours de la maturation des fruits de *Pistacia lentiscus* **(Charef *et al.*, 2008 ; Trabelsi *et al.*, 2012)**. Concernant l'acide linolénique (C18:3ω3), nous ne notons pas de variation remarquable de son taux selon le degré de maturité. Cependant, Trabelsi *et al.* (2012) en ont rapporté un taux relativement élevé, lors des stades précoces de la maturation, pour l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Tableau 18 : Pourcentages relatifs moyens des acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica.* Fruits immatures (Rouges), fruits matures (Verts et Noirs).

Echantillons	Moyenne immature (Rouge)	Moyenne mature (Vert)	Moyenne mature (Noir)	Moyenne mature (Noir et Vert)
C14:00	Tr	Tr	Tr	Tr
C16:00	15,88±2,19	22,39±2,02	21,23±2,41	22,04±2,17
C16:1ω7	0,87±0,46	1,18±0,42	1,18±0,62	1,18±0,48
C18:00	1,88±0,37	1,78±0,40	1,80±0,60	1,78±0,46
C18:1ω9	48,33±2,30	47,35±2,96	46,71±3,33	47,16±3,03
C18:2ω6	30,96±2,15	25,25±2,60	27,20±2,05	25,83±2,58
C18:3ω3	1,03±0,42	0,95±0,30	1,21±0,63	1,03±0,43
C20:00	Tr	Tr	Tr	Tr
C20:1ω9	Tr	Tr	Tr	Tr
AGI/AGS	**4,58±0,53****	**3,10±0,33**	**3,35±0,46**	**3,18±0,38**
Cox	**3,89±0,27****	**3,30±0,25**	**3,53±0,27**	**3,36±0,27**

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures). AGI : acide gras insaturé, AGS : acide gras saturé, Cox : *calculated oxidizabillity value*. Tr : Traces.

Il est crucial d'indiquer que le rapport acides gras insaturés/acides gras saturés est significativement élevé pour les huiles des fruits immatures (4,58±0,53) par rapport aux huiles issues des fruits matures (3,18±0,38, p<0,001) (Tableau 18). Il en est de même pour le Cox (*Calculated oxidizabillity value*) qui est déterminé par la formule Cox=[1(C18:1%)+10,3(C18:2%)+21,6(C18:3%)]/100 **(Fatemi et Hammond, 1980)**. Ce paramètre varie de 3,89±0,27 pour les échantillons immatures à 3,35±0,31pour les échantillons matures (p<0,001).

La comparaison des échantillons selon leur emplacement géographique révèle quelques légères différences. Ces dernières sont beaucoup plus prononcées pour les échantilons issus du site 7 (Ain Ouassara) qui monternt une richesse en acides gras insaturés par rapport à leurs paires des autres sites (Tableau 19).

Notre étude sur la composition en acides gras de l'huile de *Pistacia atlantica*, notamment pour les échantillons matures, montre des valeurs comparables en acide gras par rapport à ceux de l'huile de *Pistacia lentiscus* **(Charef *et al.*, 2008 ; Trabelsi *et al.*, 2012)**.

Les proportions d'esters méthyliques d'acides gras EMAG confirment une similitude entre les huiles des fruits de Pistachier de l'Atlas et les autres huiles végétales alimentaires comme les huiles du tournesol, du soja et du maïs **(Rezanka, 1999 ; Eromosele C-O et Eromosele I-C, 2002)**.

Tableau 19 : Pourcentages relatifs moyens des acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre (le chiffre indique le numéro du site. R : rouge, V : vert, N : noir).

Echantillon	C16:00	C18:1ω9	C18:2ω6	AGI/AGS
1.V	22,51±1,74	47,24±1,91	25,18±2,13	3,03±0,26
2.V	20,59	44,33	20,41	2,22
3.V	22,66±0,85	45,40±2,83	27,08±2,53	3,07±0,20
4.V	22,87±3,83	47,16±0,55	25,90±3,23	3,12±0,57
5.V	21,18±2,54	50,23±2,31	25,05±0,95	3,39±0,60
6.V	25,45	41,61	28,61	2,74
7.V	21,28±0,89	52,49±1,45	22,74±2,36	3,36±0,08
1.N	21,77±2,50	46,15±3,45	27,06±2,23	3,29±0,46
3.N	21,75	44,02	29,37	3,10
4.N	21,06	48,78	25,31	3,30
7.N	17,63	50,70	27,76	4,06
1.R	15,81±0,36	46,57±0,78	32,77±1,54	4,63±0,08
2.R	15,46	48,33	32,15	4,65
3.R	15,55±0,24	47,07±0,24	32,04±1,39	4,56±0,01
4.R	18,25±4,51	47,78±1,34	29,66±3,05	4,10±1,15
5.R	14,19	51,67	28,73	4,87
7.R	14,07	52,15	28,87	5,15

AGI : Acides gras insaturés, AGS : Acides gras saturés.

3. Teneurs en tocophérols totaux

Nous n'avons effectué ce dosage que pour vingt trois (23) échantillons représentatifs. Les résultats sont exposés dans le tableau 20. Les résultats sont exprimés en mg équivalents Vit E par 100g d'huile. D'après nos résultats, ces huiles contiendraient plus de tocophérols que de ce qu'il en a été rapporté **(Maameri, 2008)**.

Nous notons avec intérêt une différence hautement significative entre les huiles des fruits immatures (115,92±10,47 mg/100g) et celles des fruits matures (83,53±14,69 mg/100g, $p<0,001$). Nous ne disposons pas de données publiées sur la variation de tocophérols totaux au cours de la maturation des fruits de *Pistacia atlantica* ou une autre espèce apparentée.

Les fruits, particulièrement les verts, cueillis à Dayet Ennouss (site 2) ont donné des huiles plus riches en tocophérols par rapport aux autres sites.

Tableau 20 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons		Tocophérols totaux (mg EE/100g H)	Moyenne (mg EE/100g H)
Mature (Vert)	**1.3V**	67,17	80,88±15,81
	1.5V	86,18	
	2.1V	108,83	
	3.3V	77,31	
	4.1V	65,29	
	4.3V	92,73	
	5.2V	94,43	
	6.1V	74,69	
	7.1V	61,29	
Mature (Noir)	**1.1N**	98,19	86,93±13,51
	1.2N	101,42	
	1.4N	90,32	
	1.7N	97,64	
	3.2N	81,83	
	4.3N	70,53	
	7.3N	68,58	
Mature (Noir et vert)			83,53±14,69
Immature (Rouge)	**1.5R**	112,89	115,92±10,47**
	2.1R	119,46	
	3.4R	110,68	
	4.1R	134,76	
	4.3R	110,87	
	5.2R	121,06	
	7.2R	101,74	

EE : Equivalents vitamine E. ***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

4. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP

L'analyse des tocophérols individuels par CLHP (colonne polaire) a été réalisée pour dix-huit échantillons verts, huit échantillons noirs et neuf échantillons rouges.

Les différents isomères ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standards commerciaux (Figure 27). Par souci de maximum de précision, nous avons même mené des coninjections (échantillons 5.2V et 4.3R avec β-Toc, figures 28 et 29).

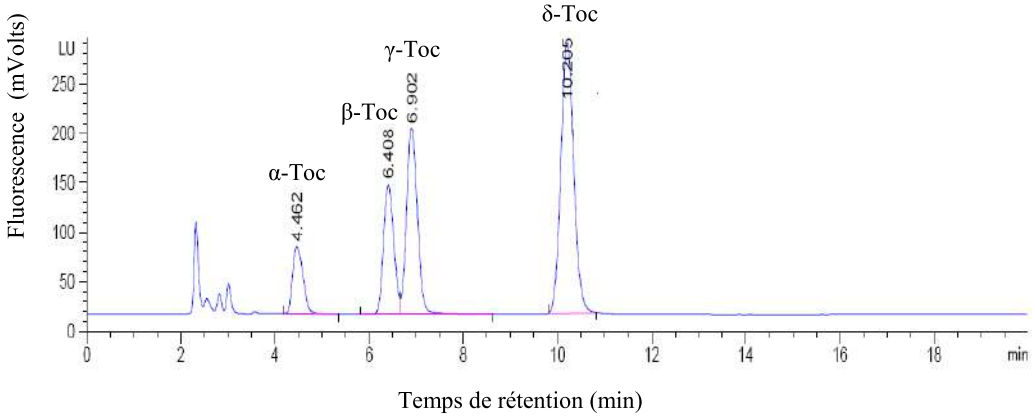


Figure 27 : Profil chromatographique des standards commerciaux de tocophérols.

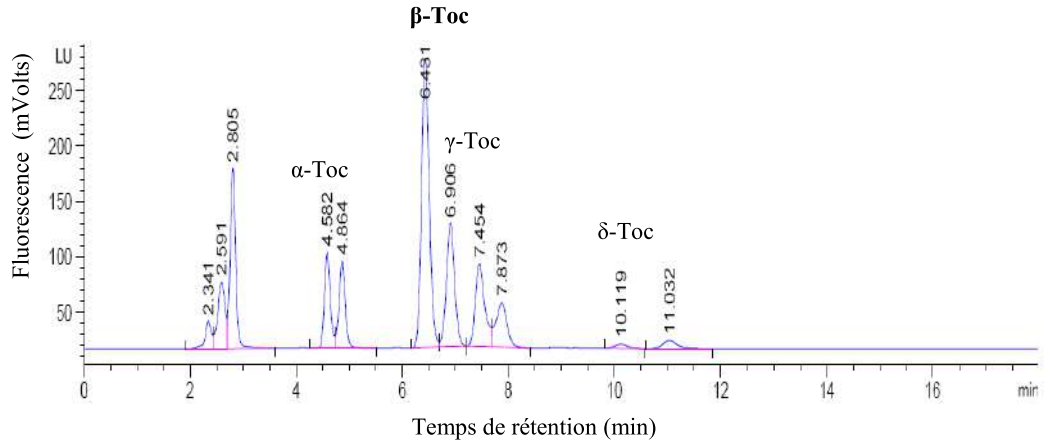


Figure 28 : Profil chromatographique d'une coinjection de l'échantillon 5.2V avec le β-Toc (standard commercial).

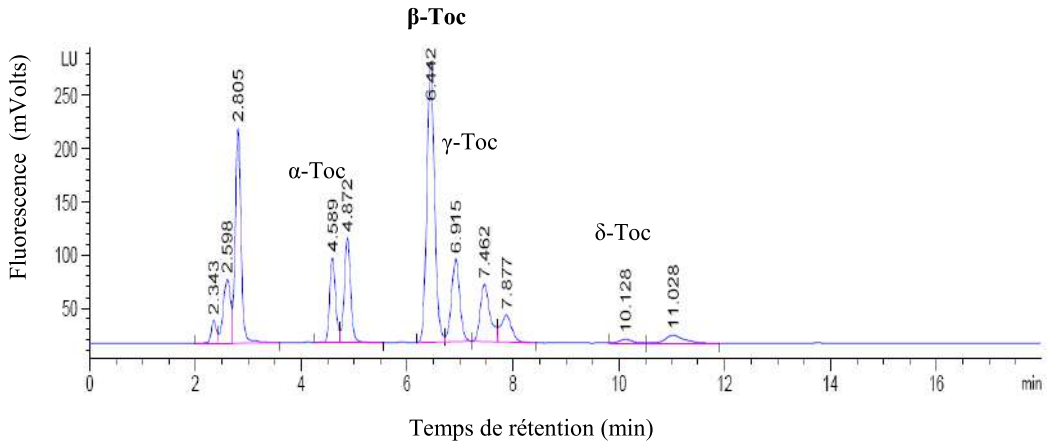


Figure 29 : Profil chromatographique d'une coinjection de l'échantillon 4.3R avec le β-Toc (standard commercial).

Les isomères α-Toc, γ-Toc et δ-Toc ont été détectés dans toute la série d'étude. β-Toc n'est pas détecté dans la majorité des échantillons et s'il est détecté, il est sous forme de trace. Les autres pics observés correspondraient plus probablement aux tocotrienols, lesquels sont plus polaires que les tocophérols. Ils ont été identifiés ainsi sur la base de la comparaison de nos profils avec ceux obtenus dans des conditions similaires et rapportés dans la littérature **(Kamal-Eldin *et al.*, 2000 ; Nielsen et Hansen, 2008)**. Les figures 30, 31 et 32 montrent quelques chromatogrammes d'échantillons représentatifs. D'autres profils sont mentionnés en Annexe.

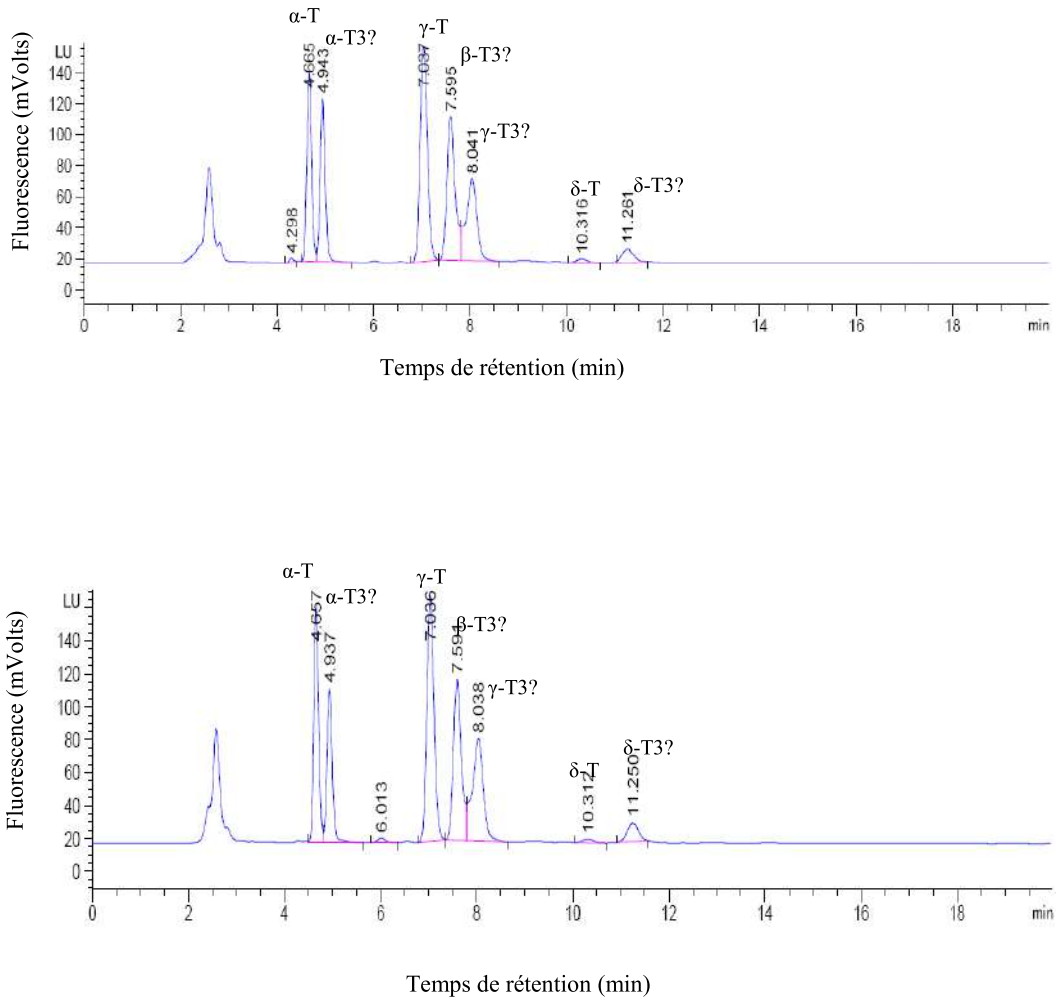


Figure 30 : Profils chromatographiques des échantillons 4.1V (en haut) et 5.2V (en bas). T3? : tocotrienol probable.

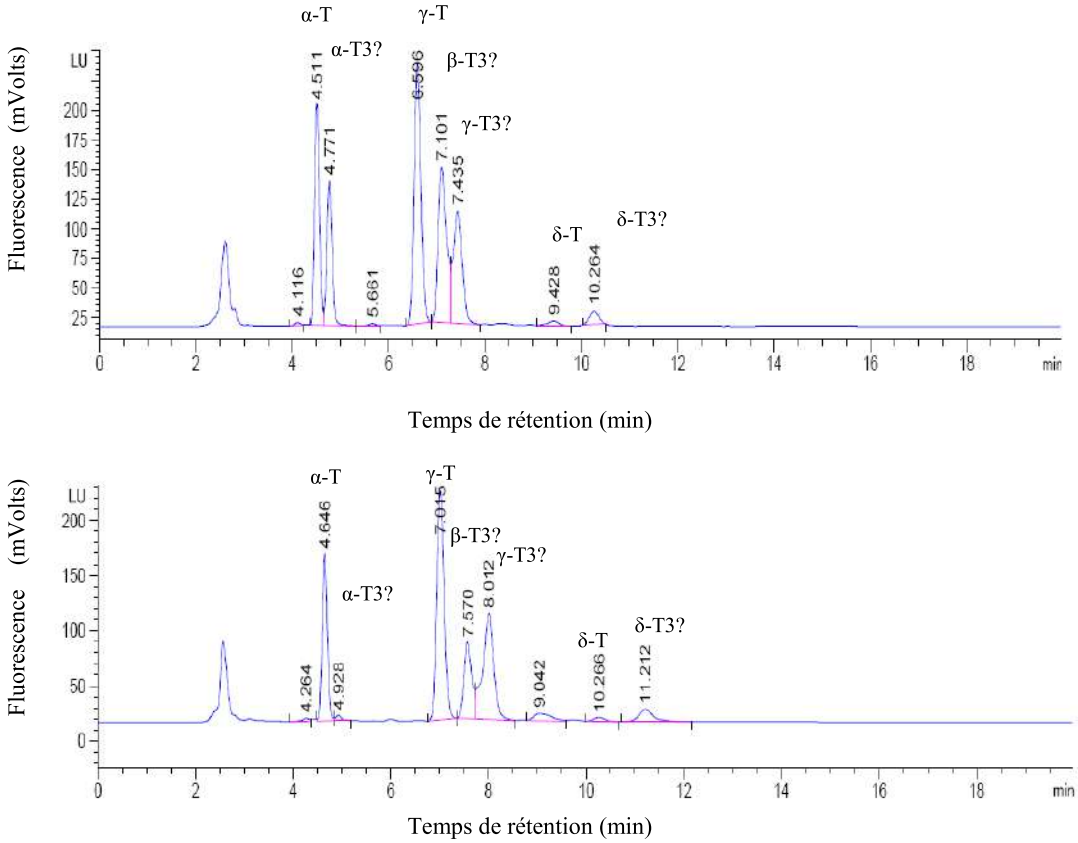


Figure 31 : Profils chromatographiques des échantillons 1.1N (en haut) et 1.8N (en bas). T3? : tocotrienol probable.

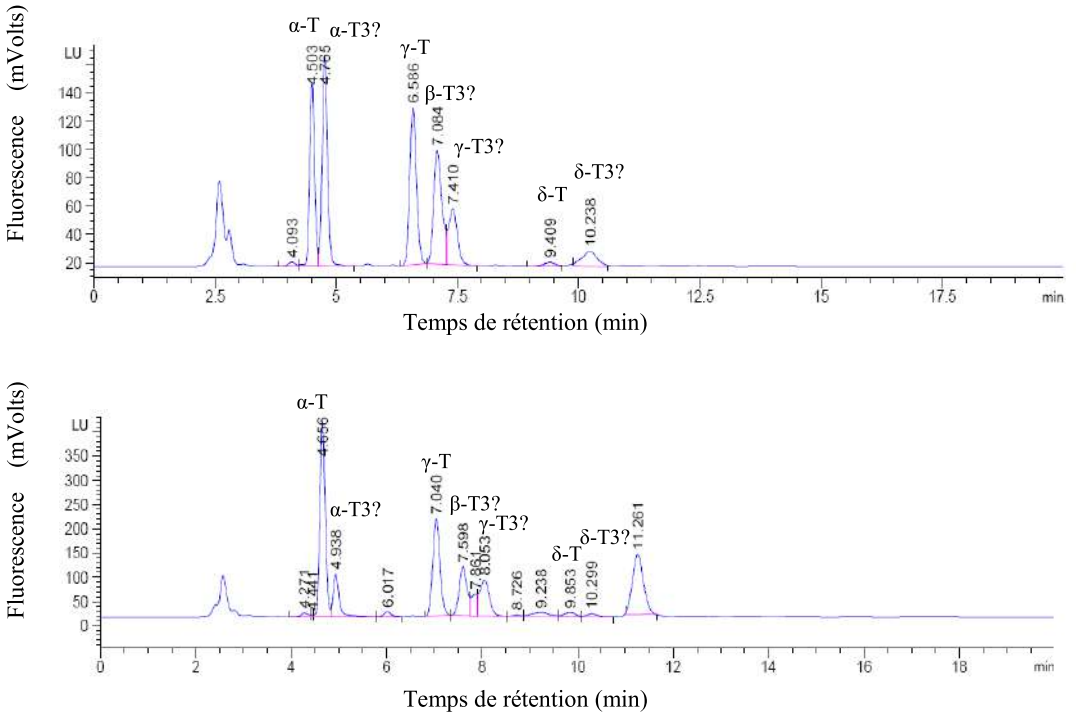


Figure 32 : Profils chromatographiques des échantillons 4.3R (en haut) et 3.3R (en bas). T3? : tocotrienol probable.

Les teneurs en tocophérols individuels ont été déterminées en utilisant l'équation suivante : **Aire=287289xCon (mg/ml)-102**

Elle a été obtenue après emploi d'un standard externe l'α-Toc. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'α-tocophérol par 100 grammes d'huile. Ils sont montrés dans les tableaux 21, 22 et 23. Nous y distinguons les mêmes différences constatées pour les tocophérols totaux quantifiés par colorimétrie, mais avec des valeurs réduites qui pourraient être expliquées par des facteurs interférants (tout composé réducteur dans l'huile tel que les polyphénols par exemple) qui aurait pu réagir avec le réactif lors du dosage colorimétrique.

Tableau 21 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits verts de *Pistacia atlantica*. Résultats exprimés en mg Equivalents vit E/100 g d'huile et en pourcentage par rapport à la teneur totale en tocophérols.

Ech (Vert)	**1.1V**	**1.3V**	**1.5V**	**1.6V**	**1.7V**	**1.10V**	**1.11V**	**2.1V**	**3.1V**
α-Toc	10,69	11,6	15,94	9,73	13,97	16,14	10,92	14,83	12,94
γ-Toc	16,62	12,39	20,04	10,91	13,68	19,6	17,15	27,69	14,71
δ-Toc	1,39	1,46	1,18	1,26	1,35	1,44	1,07	1,48	1,32
Total	**28,7**	**25,45**	**37,16**	**21,9**	**29**	**37,18**	**29,14**	**44**	**28,97**
Pourcentage des différents isomères constitutifs (%)									
α-Toc	37,25	45,58	42,90	44,41	48,17	43,41	37,47	33,70	44,67
γ-Toc	57,91	48,68	53,93	49,83	47,17	52,72	58,85	62,93	50,78
δ-Toc	4,84	5,74	3,18	5,75	4,66	3,87	3,67	3,36	4,56
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

Suite du tableau 21.

Ech (Vert)	**3.3V**	**3.4V**	**4.1V**	**4.3V**	**5.1V**	**5.2V**	**6.1V**	**7.1V**	**7.3V**
α-Toc	16,02	14,52	9,61	17,73	10,55	12,22	13,48	11,54	12,56
γ-Toc	17,75	12,2	14,1	18,52	10,22	21,05	17,04	12,97	20,29
δ-Toc	1,59	1,29	1,15	1,61	1,23	1,22	1,6	1,36	1,48
Total	**35,36**	**28,01**	**24,86**	**37,86**	**22**	**34,49**	**32,12**	**25,87**	**34,33**
Pourcentage des différents isomères constitutifs (%)									
α-Toc	45,31	51,84	38,66	46,83	47,95	35,43	41,97	44,61	36,59
γ-Toc	50,20	43,56	56,72	48,92	46,45	61,03	53,05	50,14	59,10
δ-Toc	4,50	4,61	4,63	4,25	5,59	3,54	4,98	5,26	4,31
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

Tableau 22 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits noirs de *Pistacia atlantica*. Résultats exprimés en mg Equivalents vit E/100 g d'huile et en pourcentage par rapport à la teneur totale en tocophérols.

Ech (Noir)	**1.1N**	**1.2N**	**1.4N**	**1.7N**	**1.8N**	**3.2N**	**4.3N**	**7.3N**
α-Toc	15,5	18,45	19,35	15,75	16,82	11,9	11,69	11,5
γ-Toc	25,02	17,04	16,28	14,35	17,87	14,13	13,51	11,33
δ-Toc	1,89	1,41	1,41	1,42	1,55	1,45	1,6	1,46
Total	**42,41**	**36,9**	**37,04**	**31,52**	**36,24**	**27,48**	**26,8**	**24,29**
Pourcentage des différents isomères constitutifs (%)								
α-Toc	36,55	50,00	52,24	49,97	46,41	43,30	43,62	47,34
γ-Toc	59,00	46,18	43,95	45,53	49,31	51,42	50,41	46,64
δ-Toc	4,46	3,82	3,81	4,51	4,28	5,28	5,97	6,01
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

Tableau 23 : Teneurs en tocophérols individuels dans les huiles des fruits rouges de *Pistacia atlantica*. Résultats exprimés en mg Equivalents vit E/100 g d'huile et en pourcentage par rapport à la teneur totale en tocophérols.

Ech (Rouge)	**1.1R**	**1.5R**	**2.1R**	**3.3R**	**3.4R**	**4.1R**	**4.3R**	**5.2R**	**7.2R**
α-Toc	16,77	28,23	30,45	37,41	33,20	33,55	22,55	38,4	21,85
γ-Toc	33,15	24,31	21,49	25,51	14,53	33,18	21,22	13,07	24,47
δ-Toc	1,90	1,48	1,76	2,28	1,95	1,86	1,91	3,01	2,22
Total	**51,82**	**54,02**	**53,7**	**65,2**	**49,68**	**68,59**	**45,68**	**54,48**	**48,54**
Pourcentage des différents isomères constitutifs (%)									
α-Toc	32,36	52,26	56,70	57,38	66,83	48,91	49,37	70,48	45,01
γ-Toc	63,97	45,00	40,02	39,13	29,25	48,37	46,45	23,99	50,41
δ-Toc	3,67	2,74	3,28	3,50	3,93	2,71	4,18	5,52	4,57
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

Pour les échantillons immatures, la teneur en tocophérols totaux varie de 45,68 à 68,59 mg/100 g, tandis qu'elle est comprise entre 21,9 et 44 mg/100 g pour les fruits matures (verts et noirs). La différence entre les deux moyennes est significativement élevée (54,63±7,56 contre 31,5±6,06 mg/100 g, $p<0,001$) (Tableau 24).

De ce qui précède, l'huile des fruits du Pistachier de l'Atlas, notamment au stade immature, apparait plus riche en tocophérols par rapport aux autres huiles végétales alimentaires telles que l'huile de tournesol (67 mg/100 g), l'huile d'olive (20 mg/100g), l'huile d'amande (39 mg/100 g), l'huile d'arachide (17 mg/100 g) et l'huile

de soja (11mg /100 g) **(Karleskind, 1992 ; Hussain *et al.*, 2013)**, ce qui lui confère des vertus diététiques importantes ainsi qu'une protection contre l'oxydation des lipides **(Hussain *et al.*, 2013)**.

Concernant les différents isomères (α-Toc, γ-Toc et δ-Toc), nous commençons par leurs proportions avant de passer à leurs teneurs. Ainsi, α-Toc semble être le plus dominant dans les fruits rouges et γ-Toc dans les fruits verts et noirs (53,26±11,45 contre 43,7±5,2% pour α-Toc, $p<0,005$ et 51,71±5,46 contre 42,96±11,8% pour γ-Toc). δ-Toc est détecté dans tous les échantillons mais avec des proportions faibles ne présentant aucune différence entre les deux groupes étudiés (Tableau 24).

A notre connaissance, c'est la première fois où les tocophérols individuels de l'huile des fruits de cette plante sont analysés par une colonne de silice polaire qui permet, outre la bonne séparation des quatre isomères des tocophérols, l'analyse de ceux des tocotrienols. Nos résultats sont différents de ceux rapportés, pour la même espèce par Saber-Tehrani *et al.* (2013) obtenus par une colonne apolaire RP18 où l' α-Toc était de loin le plus dominant isomère (> 92%). Nos données semblent être en accord avec celles publiées par Matthäus et Özkan (2006) pour *Pistacia terebinthus* où α-Toc et γ-Toc étaient les plus dominants.

Tableau 24 : Teneurs moyennes en tocophérols individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*. Résultats exprimés en mg Equivalents vit E/100 g d'huile et en pourcentage par rapport à la teneur totale en tocophérols).

Echantillon	Moyenne immature (Rouge)	Moyenne mature (Vert)	Moyenne mature (Noir)	Moyenne mature (Noir et Vert)
α-Toc	29,16±7,43	13,05±2,42	15,12±3,11	13,69±2,76
γ-Toc	23,44±6,99	16,50±4,37	16,19±4,14	16,40±4,22
δ-Toc	2,04±0,43	1,36±0,16	1,52±0,16	1,41±0,18
Total	54,63±7,56**	30,91±6,04	32,84±6,29	31,50±6,06
Pourcentage des différents isomères constitutifs (%)				
α-Toc	53,26±11,45*	42,60±5,02	46,18±5,00	43,70±5,20
γ-Toc	42,96±11,80	52,89±5,45	49,05±4,76	51,71±5,46
δ-Toc	3,79±0,90	4,52±0,78	4,77±0,88	4,59±0,81
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

***p<0,001, *p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Les teneurs des différents isomères sont différentes entre les deux groupes (mature et immature). La teneur en α-Toc varie entre 16,77 et 38,4 mg/100g (moyenne 29,16±7,43 mg/100g) pour les fruits rouges considérés comme immatures et entre 9,61 et 19,35 mg/100g (moyenne 13,69±2,76 mg/100g) pour les fruits verts et noirs considérés comme matures. Celle en γ-Toc est comprise entre 13,07 et 33,18 mg/100g (moyenne 23,44±6,99 mg/100g) pour les fruits immatures et entre 10,22 et 27,69 mg/100g (moyenne 16,4±4,22 mg/100g) pour l'autre groupe. Il est important de noter qu'en dépit d'un pourcentage moins important en γ-Toc pour les fruits rouges, sa teneur est plus élevée. Les proportions fables en δ-Toc recèlent une charge pondérale différente entre les deux groupes où la teneur varie de 1,48 à 3,01 mg/100g (moyenne 2,04±0,43 mg/100g) pour les fruits rouges et de 1,07 à 1,89 mg/100g (moyenne 1,41±0,18 mg/100g) pour l'autre groupe. Nous relevons avec intérêt une différence, significativement très élevée, entre les deux groupes concernant les trois isomères ($p<0,001$). (Tableaux 21, 22, 23 et 24).

La comparaison des échantillons par site révèle quelques différences pour les tocophérols totaux et les trois isomères (Tableau 25).

Tableau 25 : Teneurs moyennes en tocophérols individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre. Résultats exprimés en mg Equivalents vit E/100 g d'huile.

Ech	α-Toc	γ-Toc	δ-Toc	Total
1.V	12,71±2,62	15,77±3,53	1,31±0,14	29,79±5,66
2.V	14,83	27,69	1,48	44,00
3.V	14,49±1,54	14,89±2,78	1,40±0,17	30,78±4,00
4.V	13,67±5,74	16,31±3,13	1,38±0,33	31,36±9,19
5.V	11,39±1,18	15,64±7,66	1,23±0,01	28,25±8,83
6.V	13,48	17,04	1,6	32,12
7.V	12,05±0,72	16,63±5,18	1,42±0,08	30,10±5,98
1.N	17,17±1,68	18,11±4,08	1,54±0,21	36,82±3,86
3.N	11,9	14,13	1,45	27,48
4.N	11,69	13,51	1,6	26,8
7.N	11,5	11,33	1,46	24,29
1.R	22,50±8,10	28,73±6,25	1,69±0,30	52,92±1,56
2.R	30,45	21,49	1,76	53,7
3.R	35,31±2,98	20,02±7,76	2,12±0,23	57,44±10,97
4.R	28,05±7,78	27,20±8,46	1,89±0,04	57,14±16,20
5.R	38,4	13,07	3,01	54,48
7.R	21,85	24,47	2,22	48,54

Ainsi, les échantillons verts de Dayet Ennouss (site 2) et noirs de Dayet Tilghimt (Site 1) sont relativement riches en tocophérols totaux par rapport à leurs paires des autres sites. Il en est de même pour γ-Toc. Le pied d'Ain Ouassara (site 7) se montre le plus pauvre en α-Toc notamment les fruits rouges. Les fruits rouges de l'arbre du site 5 (Daya PK 440 RN1) se distinguent par des teneurs basses en γ-Toc et élevées en δ-Toc par rapport aux autres fruits rouges des autres sites. Ces différences pourraient être expliquées par des facteurs climatiques et/ou pédologiques.

5. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* par le test au DPPH

Les graphes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents échantillons huileux dans la solution de DPPH ont été tracés. Les régressions linéaires obtenues avaient un coefficient de détermination supérieur à 0,95, ce qui nous a permis de calculer, à partir de l'équation du graphe, la concentration de l'huile donnant 50 % d'inhibition du radical libre DPPH (EC_{50}) pour chaque échantillon. Cette valeur est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, laquelle est d'autant plus importante que l'EC_{50} est bas. La vitamine E a été utilisée comme standard. Les résultats sont représentés dans les tableaux 26, 27 et 28.

Tableau 26 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits verts de *Pistacia atlantica.*

Ech (Vert)	**1.1V**	**1.3V**	**1.5V**	**1.6V**	**1.7V**	**1.9V**	**1.10V**	**1.11V**	**1.13V**	**2.1V**	**3.1V**
EC_{50} (mg/ml)	34,55	26,70	24,31	33,83	24,62	27,62	28,87	35,39	26,16	34,18	25,29

Suite du tableau 26.

Ech (Vert)	**3.3V**	**3.4V**	**4.1V**	**4.2V**	**4.3V**	**5.1V**	**5.2V**	**6.1V**	**7.1V**	**7.3V**
EC_{50} (mg/ml)	31,45	32,72	32,96	25,92	32,38	33,60	33,5	36,28	34,63	32,96

Tableau 27 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits noirs de *Pistacia atlantica*.

Ech (Noir)	**1.1N**	**1.2N**	**1.4N**	**1.7N**	**1.8N**	**1.12N**	**3.2N**	**4.3N**	**7.3N**
EC_{50} (mg/ml)	26,61	25,67	28,64	20,79	29,62	23,46	25,18	28,51	23,14

Tableau 28 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits rouges de *Pistacia atlantica*.

Ech (Rouge)	**1.1R**	**1.3R**	**1.5R**	**2.1R**	**2.3R**	**3.3R**	**3.4R**	**4.1R**	**4.3R**	**5.2R**	**7.2R**
EC_{50} (mg/ml)	20	20,20	18,95	18,36	19,43	18,38	19,61	18,68	20,08	20,4	18,84

Nous remarquons que les fruits rouges (immatures) ont une moyenne de 19,36±0,75 mg/ml (valeurs comprises entre 18,36 et 20,4 mg/ml) et les fruits verts et noirs (matures) ont une moyenne de 29,32±4,36 mg/ml (valeurs comprises entre 20,79 et 36,28 mg/ml). La différence entre les deux groupes est significativement élevée ($p<0,001$). Ainsi, les huiles extraites des fruits immatures ont le pouvoir antioxydant le plus élevé. Il est crucial d'indiquer que le test de Student indique que les huiles des fruits noirs auraient une activité antioxydante plus importante par rapport à celles des fruits verts. Les moyennes respectives sont 25,73±2,93 mg/ml et 30,85±3,99 mg/ml, $p<0,005$ (Tableau 29). Tous les échantillons testés se montrent moins actifs par rapport à l'antioxydant de référence, la vitamine E, dont l'EC_{50} est de 28 µg/ml.

A ce que nous sachions, il n'y a pas de résultats publiés concernant l'activité antioxydante des huiles extraites des fruits de *Pistacia atlantica*, encore moins sa variation selon le degré de maturation des fruits. La plupart des travaux rapportés se sont intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de cet arbre, qui a été jugée appréciable **(Benhamou *et al.*, 2008 ; Gourine *et al.*, 2010 ; Peksel *et al.*, 2013)**.

Tableau 29 : Valeurs moyennes de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillon	Moyenne immature (Rouge)	Moyenne mature (Vert)	Moyenne mature (Noir)	Moyenne mature (Noir et Vert)	Vit E
EC50 (mg/ml)	19,36±0,75**	30,85±3,99	25,73±2,93	29,32±4,36	0,028

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Par ailleurs, nos résultats concernant le pouvoir antioxydant des différents échantillons huileux ne montrent pas d'effets notables de l'emplacement géographique des arbres (Tableau 30).

Tableau 30 : Valeurs moyennes de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre.

Echantillons	**EC_{50} (mg/ml)**
1.V	29,12±4,35
2.V	34,18
3.V	29,82±3,97
4.V	30,42±3,91
5.V	33,55±0,07
6.V	36,28
7.V	33,79±1,18
1.N	25,80±3,28
3.N	25,18
4.N	28,51
7.N	23,14
1.R	19,72±0,67
2.R	18,90±0,76
3.R	19,00±0,87
4.R	19,38±0,99
5.R	20,4
6.R	18,84
7.R	29,12

6. Dosage, activité antioxydante et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux

Les résultats extrêmement intéressants obtenus avec les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* et qui mettent clairement en évidence une variation, en fonction du degré de maturation des fruits, de leur composition ainsi que de leur activité antioxydante nous ont incités à nous intéresser aux tourteaux. Nous en avons extrait des composés phénoliques en vue du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de leur pouvoir antioxydant par le test au DPPH. Nous avons même été tentés par une analyse par CLHP de ces composés.

Il est à indiquer que, pour des contraintes de temps et le nombre important des échantillons testés, nous nous sommes contentés d'une macération dans le mélange acétone/eau (70/30 : v/v) pendant 48 h (avec renouvellement du solvant) et d'une triple extraction à l'acétate d'éthyle et de ce fait, nous n'avons pas atteint l'épuisement. Pour cette raison la discussion du rendement de l'extrait phénolique brut n'est pas abordée.

6.1. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes dans les tourteaux

Le dosage colorimétrique des phénols totaux et des flavonoïdes a abouti aux résultats indiqués dans les tableaux 31, 32 et 33. Ils sont exprimés, respectivement, en milligrammes équivalents d'acide gallique et en milligrammes équivalents de la rutine par grammes de poudre végétale. Il en ressort d'emblée une nette différence entre les échantillons selon notamment le degré de maturation (couleur du fruit). Ainsi, la charge en phénols totaux est très significativement élevée ($p<0,001$) dans les fruits rouges (61,69±10,01 mg/g) par rapport aux fruits verts et noirs (21,64±6,21 mg/g). La variation de la teneur en composés phénoliques est de 40,56 à 71,12 mg/g pour les fruits immatures et de 14,05 à 35,58 mg/g pour les fruits matures. Il est à noter qu'au sein même du groupe des fruits matures, une différence significative est observée entre les fruits verts (23,25±6,68 mg/g) et les fruits noirs (17,89±2,38 mg/g, $p<0,05$) (Tableau 34 et figure 33).

Concernant les flavonoïdes, nous ne notons pas de différences tangibles selon le degré de maturation où les valeurs varient pour toute la série d'étude de 2,48 à 19,67 mg/g avec des valeurs moyennes de 10,15±1,62 mg/g pour les fruits immatures (rouges) et de 10,07±4,73 mg/g pour les fruits matures (verts et noirs). Cependant, et étonnement, la teneur en flavonoïdes est significativement faible dans les fruits noirs (4,82±1,14 mg/g) comparativement aux fruits rouges (10,15±1,62 mg/g, $p<0,001$) et aux fruits verts (12,32±3,77 mg/g, $p<0,001$). Ces derniers en paraissent les plus riches (Tableau 34 et figure 33).

Le pourcentage des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux varie considérablement selon les groupes étudiés (rouge, vert et noir). Il varie aussi au sein du même groupe. En effet, ce pourcentage varie de 13,57 à 40,21 % pour les fruits noirs et de 31,03 à 90,15 % pour les fruits verts. Pour ces derniers, les flavonoïdes semblent être les composés phénoliques les plus dominants. Quant aux fruits rouges, ils ne représentent qu'une proportion largement inférieure oscillant entre 12,46 % et 21,77 %. Ces différences spectaculaires entre les trois groupes rendent compte de l'extrême complexité de la composition en composés phénoliques qui pourrait varier entre les fruits de couleurs différentes du même arbre, entre les fruits de même couleur de deux arbres du même site ou bien entre les fruits de même couleur issus d'arbres de localisation différente.

Tableau 31 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits verts de *Pistacia atlantica*.

Ech (Vert)	**1.1V**	**1.3V**	**1.5V**	**1.6V**	**1.7V**	**1.9V**	**1.10V**	**1.11V**	**1.13V**	**2.1V**	**3.1V**
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	22,89	24,45	21,82	16,26	15,24	27,05	35,58	18,20	17,27	30,84	17,84
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	14,73	13,66	19,67	12,23	9,45	16,85	16,16	7,79	8,85	18,04	9,90
Taux de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)	64,35	55,87	90,15	75,22	62,01	62,29	45,42	42,80	51,24	58,50	55,49

Suite du tableau 31

Ech (Vert)	**3.3V**	**3.4V**	**4.1V**	**4.2V**	**4.3V**	**5.1V**	**5.2V**	**6.1V**	**7.1V**	**7.3V**
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	15,41	25,14	30,08	29,84	21,30	32,78	17,69	33,74	18,50	16,34
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	9,52	16,62	13,77	12,21	12,75	12,97	7,36	11,29	5,74	9,25
Taux de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)	61,78	66,11	45,78	40,92	59,86	39,55	41,61	33,46	31,03	56,58

Tableau 32 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits noirs de *Pistacia atlantica*.

Ech (Noir)	**1.1N**	**1.2N**	**1.4N**	**1.7N**	**1.8N**	**1.12N**	**3.2N**	**4.3N**	**7.3N**
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	20,9	20,33	16,02	14,05	19,30	18,25	17,72	15,12	19,34
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	4,98	5,25	5,12	5,65	4,06	2,48	3,96	5,71	6,15
Taux de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)	23,83	25,80	31,93	40,21	21,04	13,57	22,35	37,74	31,82

Tableau 33 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits rouges de *Pistacia atlantica*.

Ech (Rouge)	**1.1R**	**1.3R**	**1.5R**	**2.1R**	**2.3R**	**3.3R**	**3.4R**	**4.1R**	**4.3R**	**5.2R**	**7.2R**
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	69,15	61,40	46,80	70,22	71,12	70,10	59,80	67,74	63,88	60,75	40,56
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	9,32	7,65	9,02	12,95	11,50	11,48	8,83	11,85	10,37	9,90	8,83
Taux de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)	13,48	12,46	19,27	18,44	16,17	16,37	14,77	17,49	16,23	16,30	21,77

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche.

Il ressort de nos résultats que des composés phénoliques autres que les flavonoïdes (phénols simples, tannins,…) pourraient être majoritaires dans les tourteaux des fruits rouges immatures et à moindre degré dans ceux des fruits matures noirs. Ce constat mérite d'être étayé par des études plus approfondies.

Tableau 34 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons	Moyenne immature (Rouge)	Moyenne mature (Vert)	Moyenne mature (Noir)	Moyenne mature (Noir et Vert)
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	61,96±10,01**	23,25±6,68	17,89±2,38	21,64±6,21
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	10,15±1,62	12,32±3,77	4,82±1,14	10,07±4,73
Pourcentage des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)	16,61±2,62	54,29±14,19	27,59±8,54	46,28±17,71

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

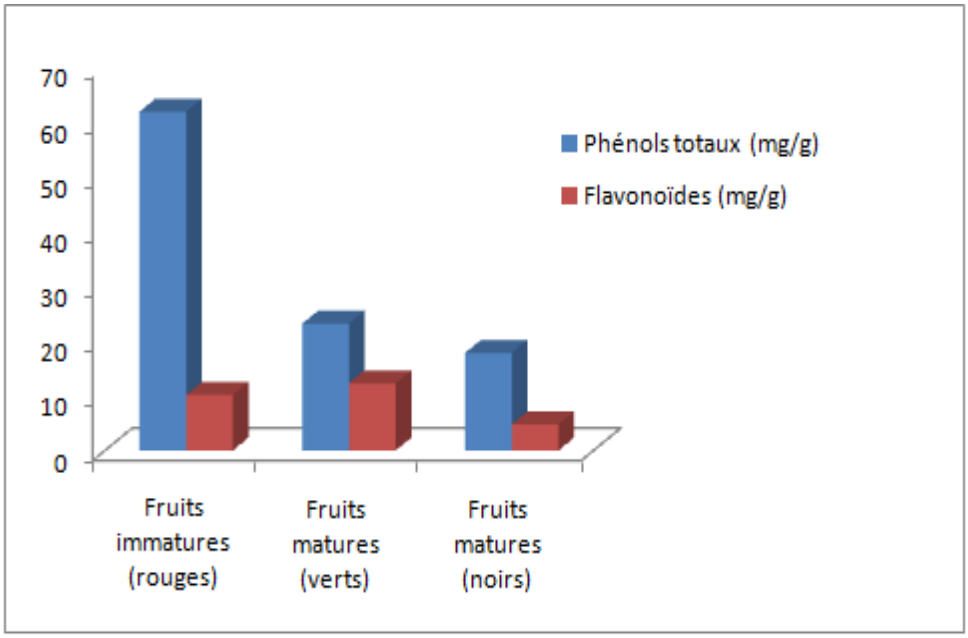


Figure 33 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

La comparaison selon l'emplacement géographique des pieds indique que les fruits verts et rouges du site 7 (Ain ouassara) ont des charges en phénols totaux et en flavonoïdes basses par rapport à leurs paires des autres sites. Par contre, les fruits

rouges de Dayet Ennous (site 2) en sont les plus riches (Tableau 35). Ces différences pourraient être expliquées par des facteurs climatiques et/ou pédologiques.

Tableau 35 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica* selon l'emplacement géographique de l'arbre.

Echantillons	Phénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg ER/g MS)	Pourcentage des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)
1.V	22,08±6,44	13,27±4,03	61,04±14,84
2.V	30,84	18,04	58,50
3.V	19,46±5,06	12,01±3,99	61,13±5,34
4.V	27,07±5,00	12,91±0,79	48,85±9,84
5.V	25,24±10,67	10,16±3,96	40,58±1,45
6.V	33,74	11,29	33,46
7.V	17,42±1,53	7,49±2,48	43,80±18,07
1.N	18,14±2,65	4,59±1,16	26,06±9,18
3.N	17,72	3,96	22,35
4.N	15,12	5,71	37,74
7.N	19,34	6,15	31,82
1.R	59,12±11,35	8,66±0,89	15,07±3,68
2.R	70,67±0,64	12,23±1,03	17,31±1,61
3.R	64,95±7,28	10,15±1,87	15,57±1,13
4.R	65,81±2,73	11,11±1,05	16,86±0,89
5.R	60,75	9,90	16,30
7.R	40,56	8,83	21,77

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche.

Les écart-types relativement élevés du pourcentage des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux pour les sites 1 (Tilghimt) et 7 (Ain Ouassara) qui sont respectivement 14,84 et 18,07 % (Tableau 35), rendent compte de l'hétérogénéité de la composition des composés phénolique pour un même site.

Très peu de données sont rapportées par la littérature concernant les composés phénoliques au niveau des fruits du *Pistacia atlantica*. La plupart des travaux publiés sont concentrés principalement autour des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* où des teneurs élevées en composés phénoliques sont évoquées **(Djidel *et al.*, 2013 ; Arab *et al.*, 2014 ; Dahmoune *et al.*, 2014)**. En comparant nos résultats avec ceux de Maamri pour les fruits de *Pistacia atlantica* **(Maamri, 2008)**, il semblerait que les nôtres soient en faveur d'une charge plus marquée en phénols totaux et en flavonoïdes. D'autre part, Belyagoubi-Benhamou (2011) a rapporté une teneur

considérable en phénols totaux (285 mg/g) au niveau des fruits rouges immatures de *Pistacia atlantica*, de la région de Tlemcen, récoltés au mois de mai. Celle des flavonoïdes était moins importante (12 mg/g). Cependant, elle n'a pas rapporté d'information sur les fruits matures (de couleur verte ou noire). Ces résultats confortent les nôtres plaidant en faveur d'une forte diminution de la teneur en composés phénolique au cours de la maturation. Enfin, un travail réalisé en Iran sur les fruits du *Pistacia atlantica subsp. kurdica* avait indiqué des teneurs ne dépassant pas 45 mg/g pour les phénols totaux et 15 mg/g pour les flavonoïdes sans tenir compte du degré de maturation **(Asghar-Hatamnia *et al.*, 2014)**.

6.2. Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts

Le pouvoir antioxydant de quelques échantillons représentatifs a été évalué par le test au DPPH. Les résultats, exprimés en EC_{50} (µg/ml), indiquent que les fruits immatures recèlent l'activité antioxydante la plus importante (EC_{50} : 28,94±7,73 µg/ml) comparativement aux fruits matures (EC_{50} : 167,08±26,77 µg/ml, $p<0,001$) (Tableau 36). Tous les échantillons testés sont moins actifs que l'antioxydant de référence, la vitamine C dont l'EC_{50} est 5,4 µg/ml.

En dépit du nombre limité des échantillons matures testés, nous relevons une étendue de la série assez importante où les valeurs d'EC_{50} oscillent entre 100,14 et 193,50 µg/ml. Ainsi les fruits de l'arbre du site 6 (PK 420, RN1) et ceux de l'arbre du site 4 (Nili) sont respectivement les plus et les moins actifs.

Tableau 36 : Valeurs de l'EC_{50} des extraits phénoliques de quelques fruits de *Pistacia atlantica.*

Echantillons		EC_{50} (µg/ml)	Moyenne (µg/ml)
Mature (Vert)	**1.1V**	197,71	160,05±30,14
	1.6V	173,55	
	1.9V	174,22	
	2.1V	166,72	
	3.3V	176,06	
	4.3V	157,63	
	5.1V	134,34	
	6.1V	100,14	
Mature (Noir)	**1.1N**	168,80	181,16±10,53
	1.2N	184,91	
	3.2N	177,43	
	4.3N	193,50	
Mature (Noir et vert)			167,08±26,77
Immature (Rouge)	**1.1R**	31,98	28,94±7,73**
	1.3R	21,63	
	2.3R	21,45	
	3.4R	24,23	
	4.3R	40,51	
	5.2R	33,84	

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

A l'instar des composés phénoliques, il n'y a pas assez de données disponibles dans la littérature sur l'activité antioxydante des extraits phénoliques de fruits de *Pistacia atlantica*. Il a été rapporté une puissante activité antioxydante des extraits phénoliques de feuilles de *Pistacia atlantica* **(Peksel *et al.*, 2013)** et ceux de feuilles de *Pistacia lentiscus* **(Atmani *et al.*, 2009)**.

6.3. Profils chromatographiques des composés phénoliques de quelques échantillons représentatifs

Les résultats obtenus avec les huiles ainsi que ceux relatifs aux tourteaux nous ont incités à procéder à une analyse par CLHP des différents extraits phénoliques. Il nous a été impossible de réaliser des CLHP couplées à la spectrométrie de masse ou d'employer des standards afin d'identifier les différents composés phénoliques. De ce fait, nous nous contentons de la comparaison de quelques profils pour des échantillons représentatifs des deux groupes étudiés : immature (fruits rouges) et mature (fruits verts et fruits rouges). Il s'agit en effet des échantillons verts 1.5V et 1.10V, des échantillons noirs 1.8N et 1.12N et des échantillons rouges 3.3R et 4.3R. La détection est effectuée à 320 nm et 260 nm à l'exception de l'échantillon 3.3R où elle n'a pu être

effectuée qu'à 260 nm. Les profils chromatographiques sont présentés dans les figures 34, 35 et 36. D'autres profils sont mentionnés en Annexe.

La comparaison des différents profils chromatographiques (aux deux longueurs d'onde choisies) montre une différence extrêmement intéressante notamment pour le premier pic dont le temps de rétention est approximativement 2,92 min. En effet, ce dernier représente plus de 25 % pour les échantillons immatures 3.3R et 4.3R, alors qu'il ne dépasse pas 20 % et 13 % pour, respectivement, les échantillons matures de couleur noir 1.8N et 1.12N et les échantillons matures de couleur verte 1.5V et 1.10V.

Le pic dont le temps de rétention est compris, selon les échantillons et la longueur d'onde de détection, entre 22,80 et 24,90 représente lui aussi une proportion variable. Elle est comprise entre 7 et 12 % pour les échantillons rouges, entre 10 à 60 % pour les échantillons noirs et entre 25 et 75 % pour les échantillons rouges. Ces différences sont dans l'ensemble comparables à celles observées pour la proportion des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux déterminée après leur dosage colorimétrique (Tableau 34). Partant de ces observations, nous nous interrogeons si ce pic était représentatif d'un flavonoïde notamment une flavone, la lutéoline, qui a déjà été isolée et caractérisée à partir d'extraits de *Pistacia atlantica* **(Yousfi *et al.*, 2009)**. La réponse à cette interrogation par l'affirmatif ne peut être donnée que par une identification par spectrométrie de masse ou bien par l'emploi de standards connus, tache qui malheureusement n'a pu être accomplie. Néanmoins, nous pouvons dire que l'aspect des profils est différent selon le degré de maturation des fruits révélant une hétérogénéité, sur le plan qualitatif et quantitatif, des composés phénoliques en fonction de la maturation.

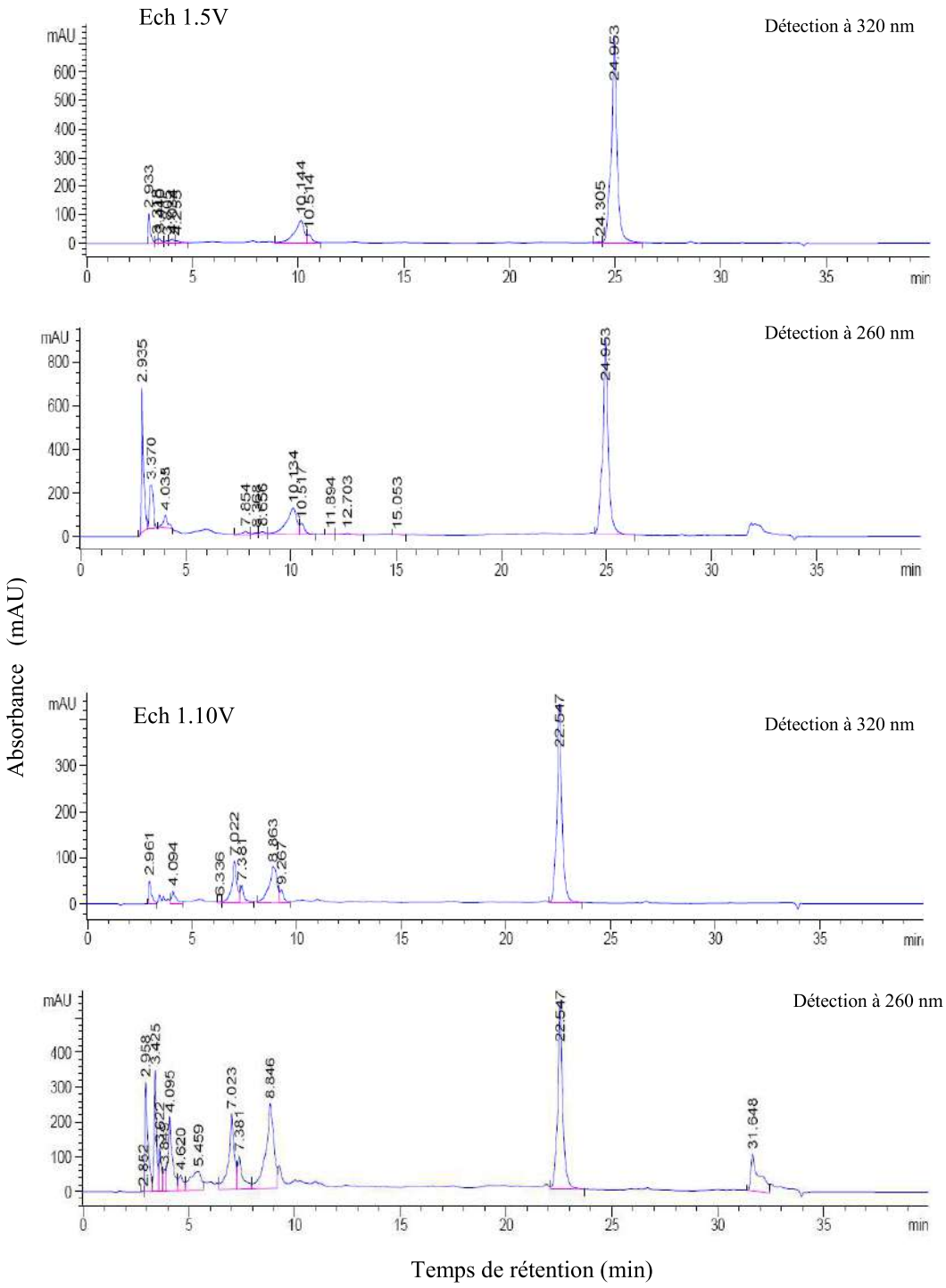


Figure 34 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons verts 1.5V et 1.10V. Détection à 320 et 260 nm.

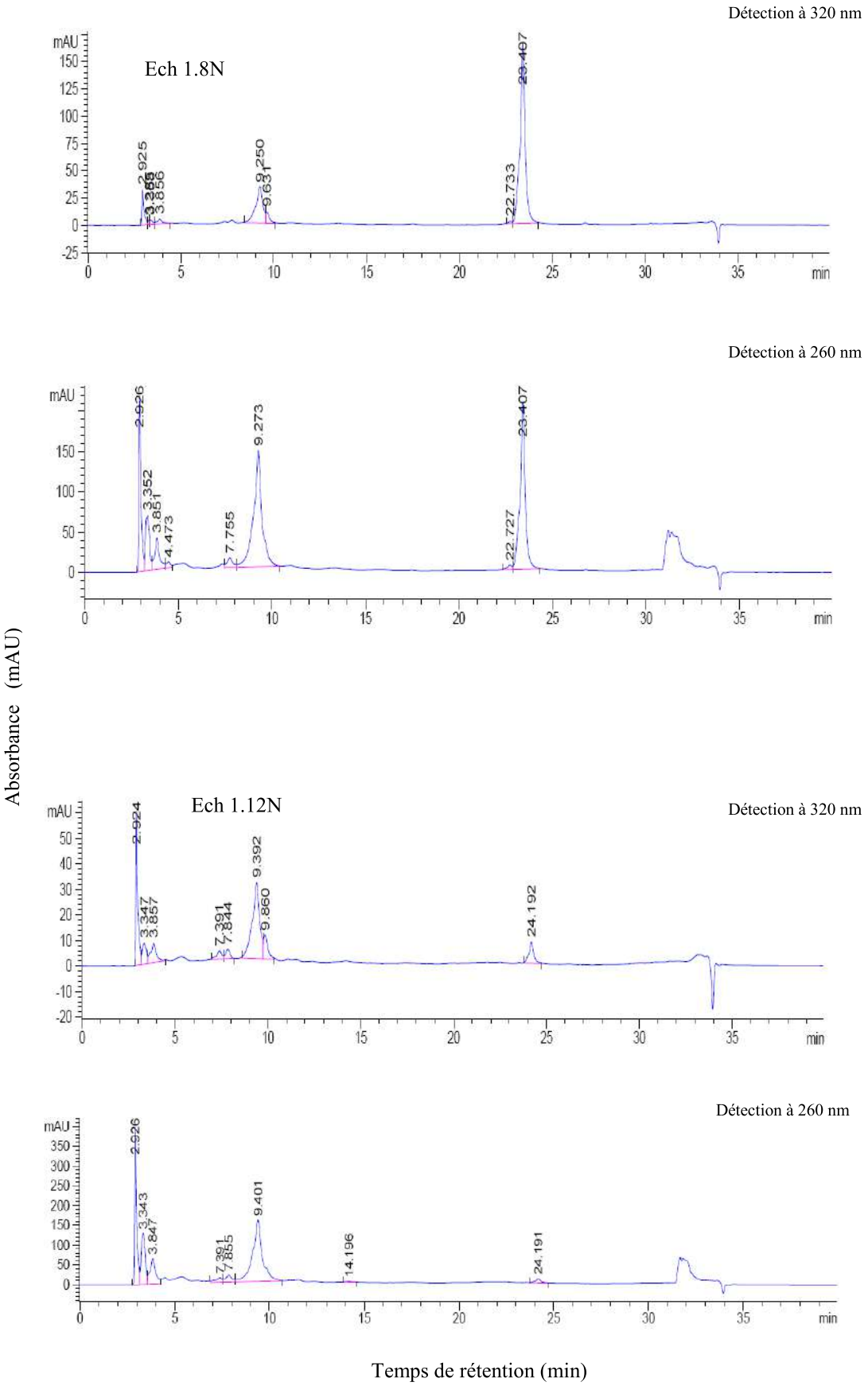


Figure 35 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons noirs 1.8N et 1.12N. Détection à 320 et 260 nm.

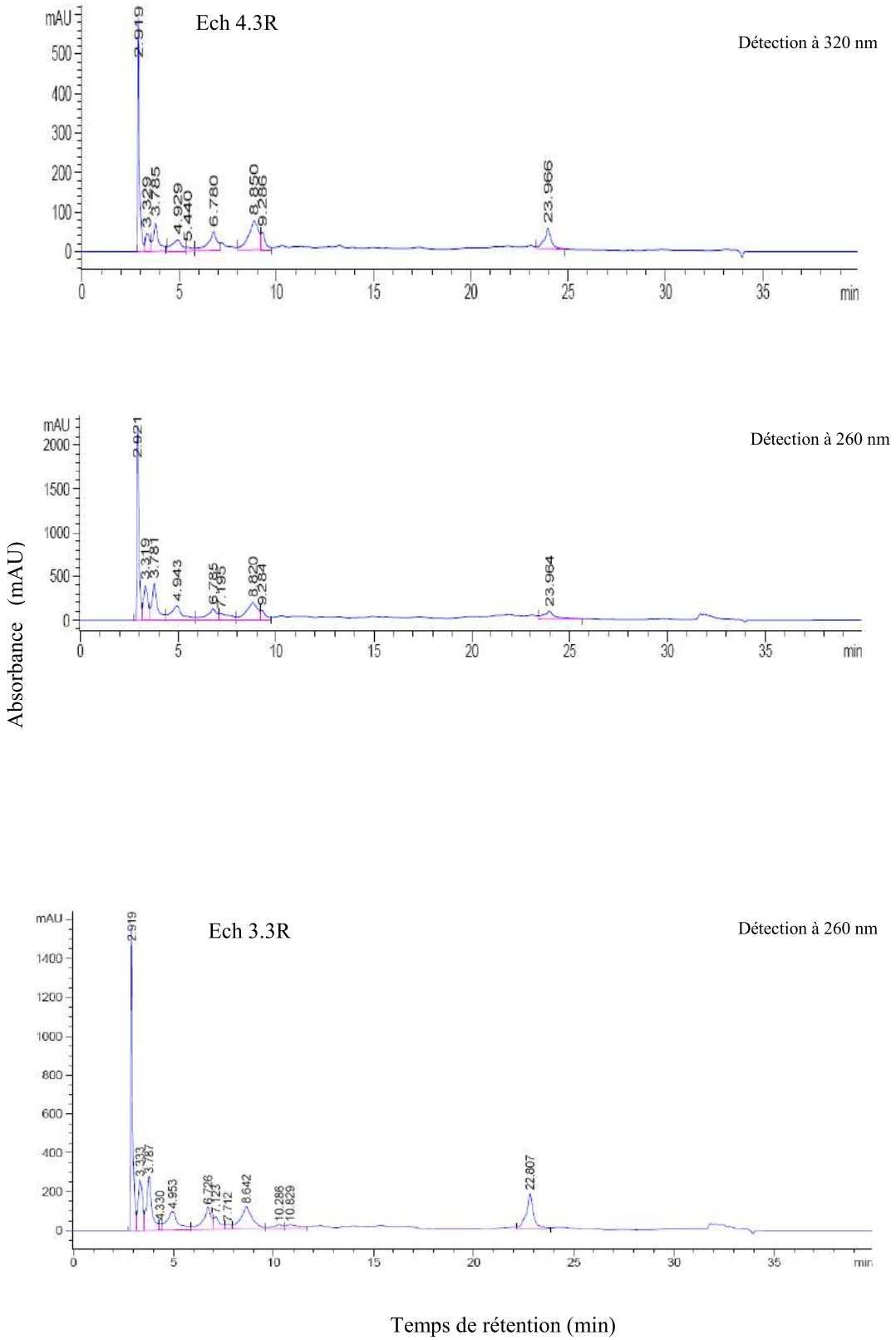


Figure 36 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons rouges 3.3R et 4.3R. Détection à 320 et 260 nm pour 4.3R et seulement à 260 nm pour 3.3R.

7. Analyse statistique des données relatives à la composition en acides gras et en tocophérols

Les résultats obtenus concernant la composition en acides gras et en tocophérols des huiles issues des fruits rouges (immatures) et des fruits verts et noirs (matures) ont servi à une analyse de données par le logiciel XLSTAT afin d'établir d'éventuels groupes distinctifs et/ou d'éventuelles corrélations entre les paramètres étudiés.

7.1. Analyse statistique des données relatives à la composition en acides gras

Les taux des acides gras majoritaires à savoir l'acide palmitique (C16:00), l'acide oléique (C18:1ω9) et l'acide linoléique (C18:2ω6) ont été utilisés pour l'analyse par la méthode ACP (analyse des composantes principales). Dans un premier temps, nous avons établi la matrice de corrélation de Pearson qui indique d'emblée une forte corrélation négative entre l'acide palmitique et l'acide linoléique (coefficient de corrélation **– 0,74**, tableau 37).

Tableau 37 : Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les trois acides gras majoritaires de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

Variables	C16:00	C18:1ω9	C18:2ω6
C16:00	**1**		
C18:1ω9	-0,4110	**1**	
C18:2ω6	**-0,7400**	-0,2412	**1**

Il en ressort que le taux an acide palmitique est d'autant plus élevé que celui de l'acide linoléique est diminué. Cette constatation est étayée par l'aspect du cercle d'ACP où ces deux acides gras sont presque diamétralement opposés (Figure 37).

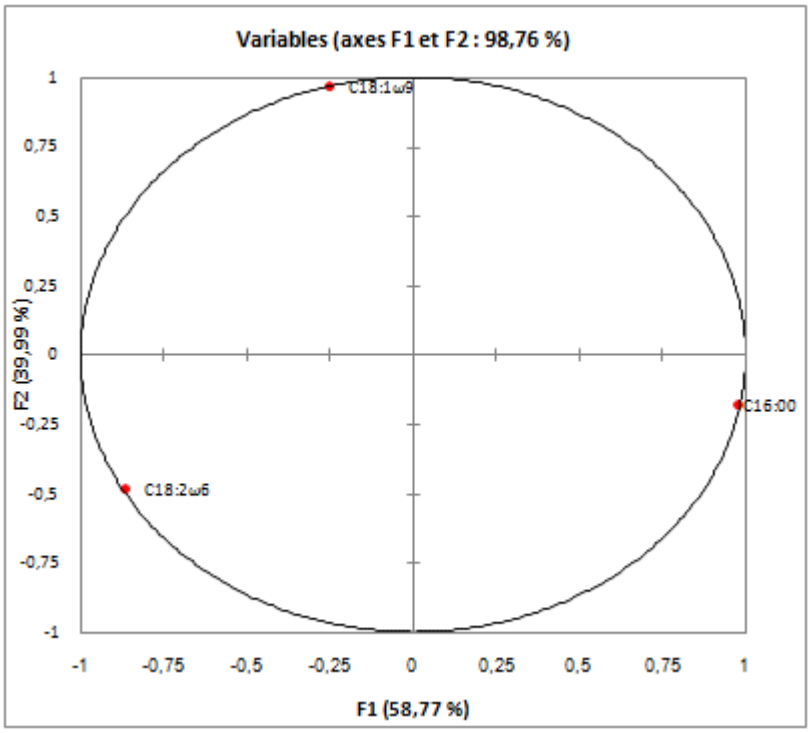


Figure 37 : Aspect du cercle d'ACP montrant la position des trois acides gras majoritaires de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

La distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires établie par ACP montre clairement que le groupe des fruits rouges (immatures) est distinct par rapport aux autres groupes matures (vert et noir). Ce groupe est caractérisé par un taux relativement important en acides gras insaturés notamment l'acide linoléique. L'huile des fruits verts est plus proche du coté de l'acide palmitique (Figure 38).

La classification ascendante hiérarchique (CAH) conforte la distinction du groupe des fruits immatures de couleur rouges où la dissimilarité entre ce groupe et celui des fruits matures (verts et noirs) est assez importante. Par contre, elle n'est que très légère entre les fruits verts et les fruits noirs (Figure 39).

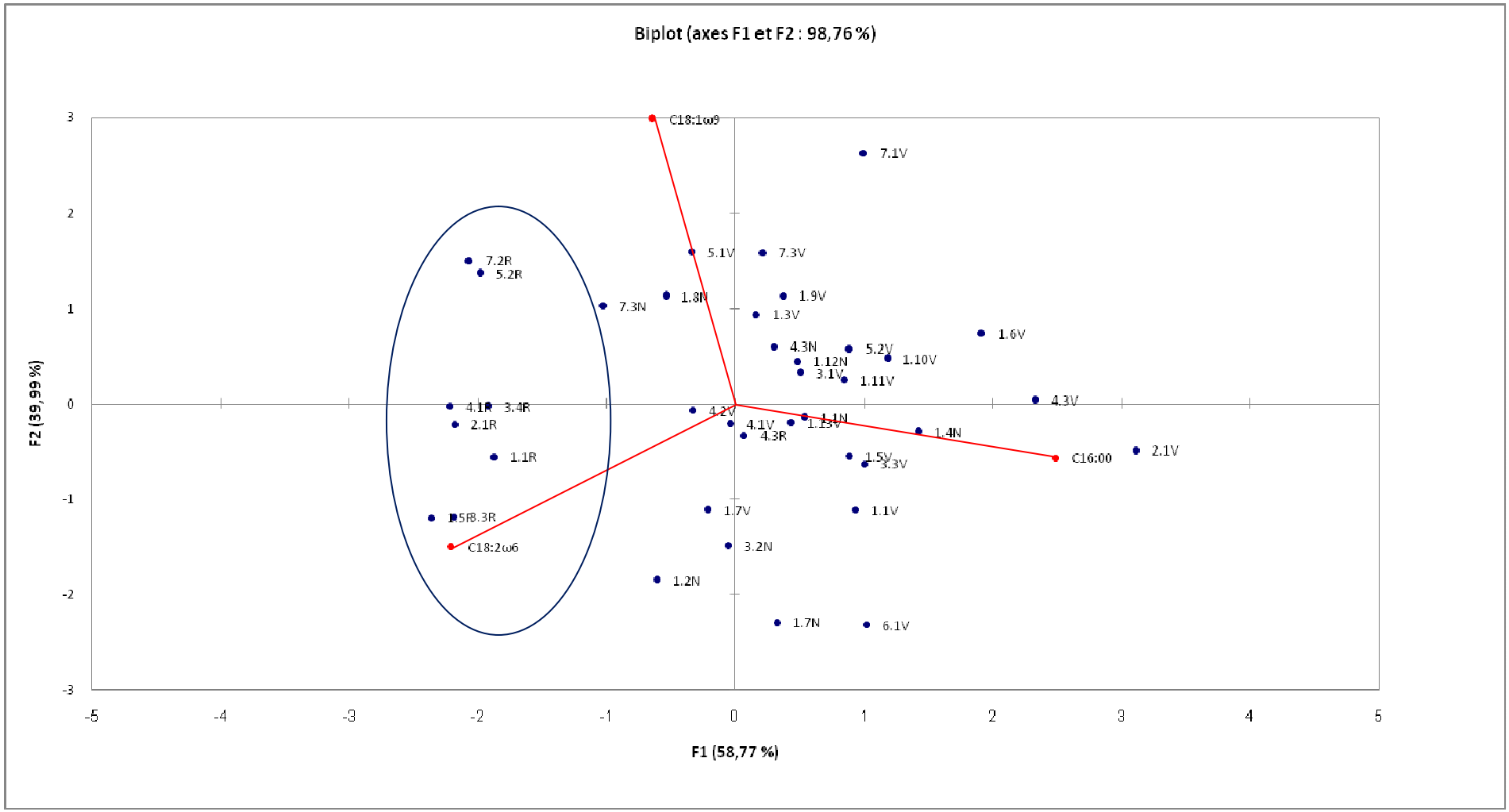


Figure 38 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires établie par ACP.

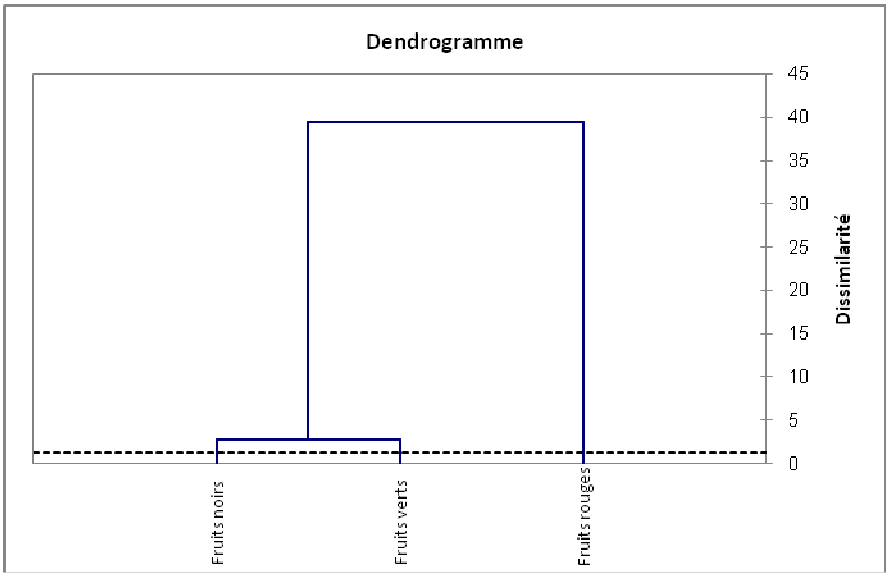


Figure 39 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) selon la composition en acides gras.

7.2. Analyse statistique des données relatives à la composition en tocophérols

Les teneurs ainsi que les proportions d'α-Toc, γ-Toc et δ-Toc ont été utilisées pour l'analyse par la méthode ACP (analyse des composantes principales). Les matrices de corrélation de Pearson ont été établies pour les deux cas (Tableaux 38 et 39). La forte corrélation positive (coefficient de corrélation **0,77**,) entre la teneur en α-Toc et celle de δ-Toc ne peut pas être informative du fait des taux disproportionnés de ces deux isomères (entre 43 et 53 % pour l'α-Toc et entre 3 et 5 % pour le δ-Toc, tableaux 21, 22 et 23). Par contre, nous notons avec intérêt une très forte corrélation négative entre la proportion de l'α-Toc et celle de γ-Toc (coefficient de corrélation **– 0,99**, tableau 39).

Tableau 38 : Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les teneurs des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

Variables	α-Toc	γ-Toc	δ-Toc
α-Toc	**1**		
γ-Toc	0,4140	**1**	
δ-Toc	**0,7762**	0,3303	**1**

Tableau 39 : Matrice de corrélation de Pearson (n) pour les proportions des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

Variables	α-Toc	γ-Toc	δ-Toc
α-Toc	**1**		
γ-Toc	**-0,9943**	**1**	
δ-Toc	0,0202	-0,1267	**1**

Ainsi, plus la proportion de l'α-Toc est élevé plus celle de γ-Toc est diminuée. Cette constatation est étayée par l'aspect du cercle d'ACP où ces deux isomères sont diamétralement opposés (Figure 40).

La distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois isomères de tocophérols (teneur et proportion) établie par ACP montre encore une fois que le groupe des fruits rouges (immatures) est distinct par rapport aux autres groupes matures (vert et noir). Ce groupe est caractérisé par une richesse en α-Toc, γ-Toc et δ-Toc (Figure 41) et, à moindre degré, par une proportion élevée en α-Toc par rapport au groupe des fruits matures (Figure 42)

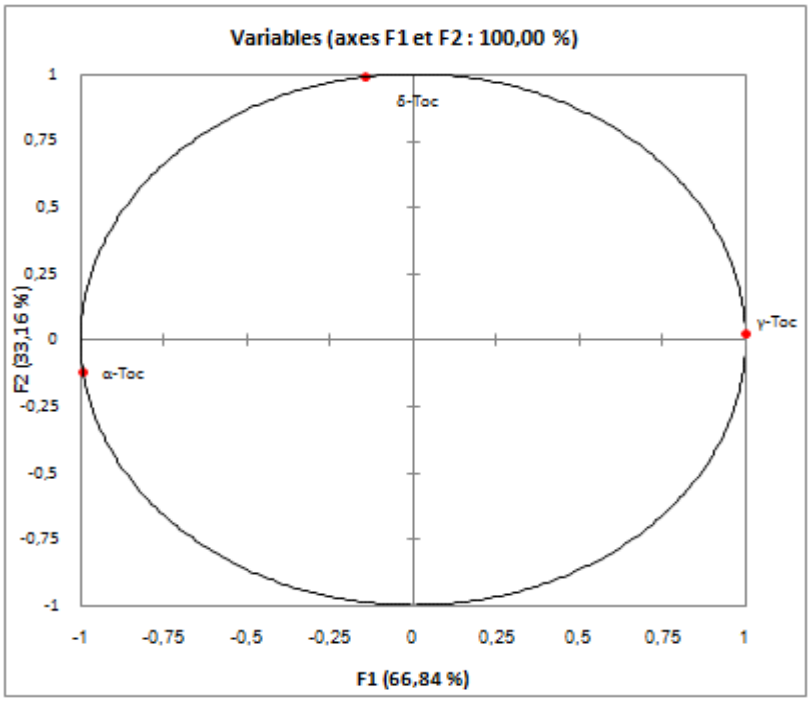


Figure 40 : Aspect du cercle d'ACP montrant la position des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* selon leurs proportions.

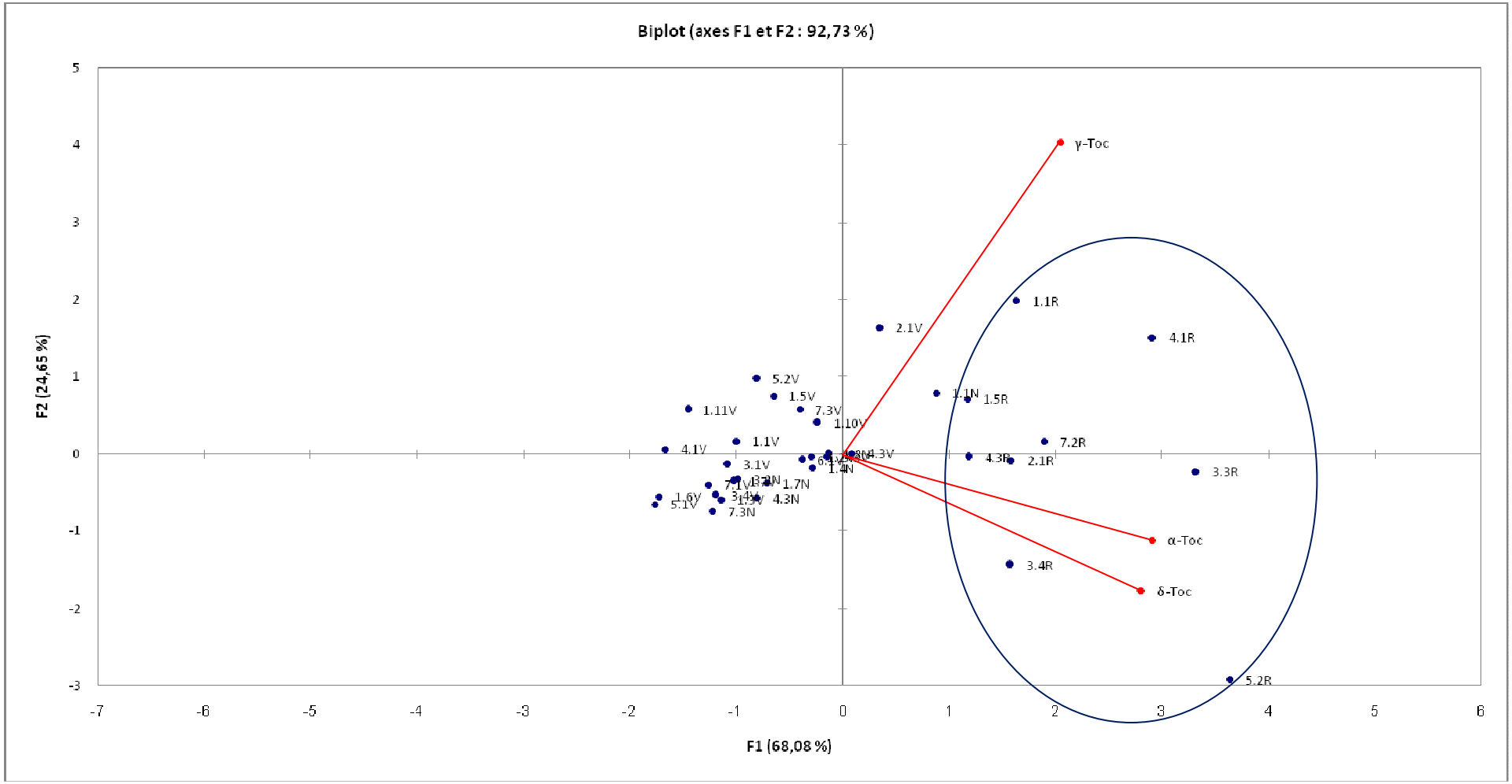


Figure 41 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois isomères de tocophérols (selon leurs teneurs) établie par ACP.

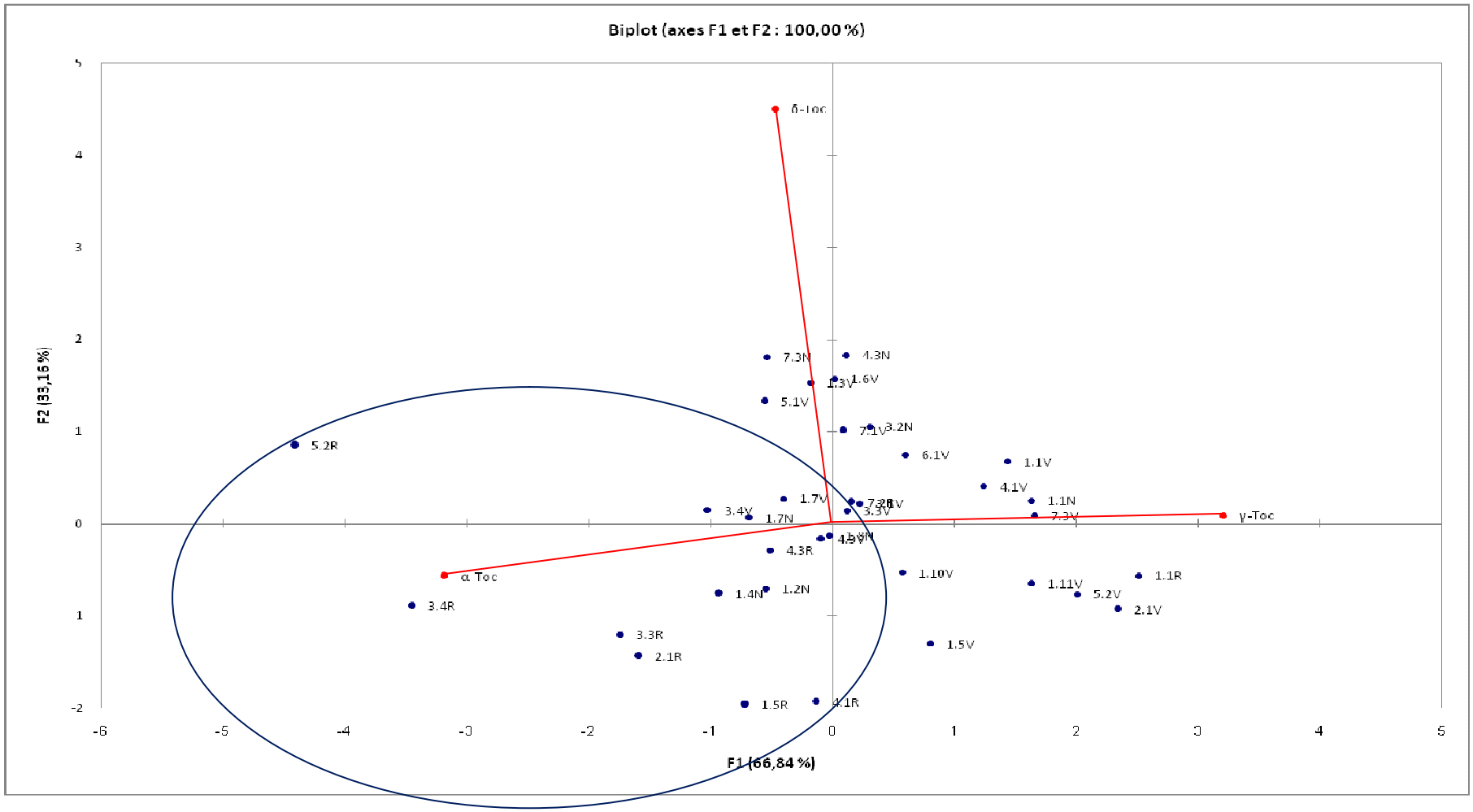


Figure 42 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois isomères de tocophérols (selon leurs proportions) établie par ACP.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) met clairement en évidence la distinction du groupe des fruits immatures de couleur rouges où la dissimilarité entre ce groupe et celui des fruits matures (verts et noirs) est très importante. Par contre, elle est insignifiante entre les fruits verts et les fruits noirs (Figure 43).

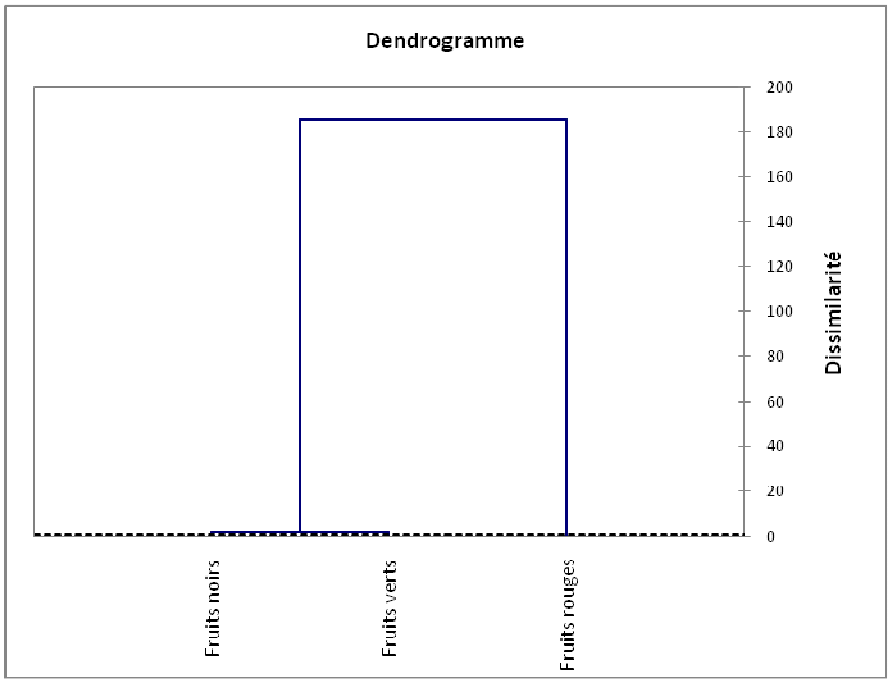


Figure 43 : Classification ascendante hiérarchique (CAH) de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) selon la composition en tocophérols.

7.3. Analyse statistique simultanée des données relatives à la composition en acide gras et en tocophérols

Dans le but d'établir d'éventuelles corrélations entre les variables du paramètre "Acide gras" et celles du paramètre "Tocophérol", nous nous somme proposés d'analyser simultanément les proportions des acides gras majoritaires, avec d'une part, celles de tocophérols et de l'autre part avec leurs teneurs.

La matrice de corrélation de Pearson pour le premier cas ne montre pas de relations notables entre les proportions des acides gras et celles de tocophérols (Tableau 40). Par contre, dans le deuxième cas, nous relevons avec intérêt une corrélation positive appréciable entre le taux de l'acide linoléique et la teneur en α-Toc (coefficient de corrélation **0,63**, tableau 41)

Tableau 40 : Matrice de corrélation de Pearson (n) entre les proportions des acides gras et celles des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

Variables	C16:00	C18:1ω9	C18:2ω6	α-Toc	γ-Toc	δ-Toc
C16:00	**1**					
C18:1ω9	-0,4164	**1**				
C18:2ω6	-0,7501	-0,2246	**1**			
α-Toc	-0,5262	0,1366	0,4629	**1**		
γ-Toc	0,5092	-0,1668	-0,4240	-0,9942	**1**	
δ-Toc	0,1214	0,2910	-0,3298	0,0152	-0,1225	**1**

Tableau 41 : Matrice de corrélation de Pearson (n) entre les proportions des acides gras et les teneurs des trois isomères de tocophérols de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica.*

Variables	C16:00	C18:1ω9	C18:2ω6	α-Toc	γ-Toc	δ-Toc
C16:00	**1**					
C18:1ω9	-0,4164	**1**				
C18:2ω6	-0,7501	-0,2246	**1**			
α-Toc	-0,6567	0,0598	**0,6302**	**1**		
γ-Toc	-0,2397	-0,1372	0,3178	0,4094	**1**	
δ-Toc	-0,5916	0,2051	0,4250	0,7758	0,3149	**1**

La distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires et des trois isomères de tocophérols (selon la teneur) établie par ACP indique que le groupe des fruits rouges (immatures) est distinct par rapport aux autres groupes matures (vert et noir). Ce groupe est caractérisé à la fois par une richesse en α-Toc associée à un taux élevé en acide linoléique. (Figure 44).

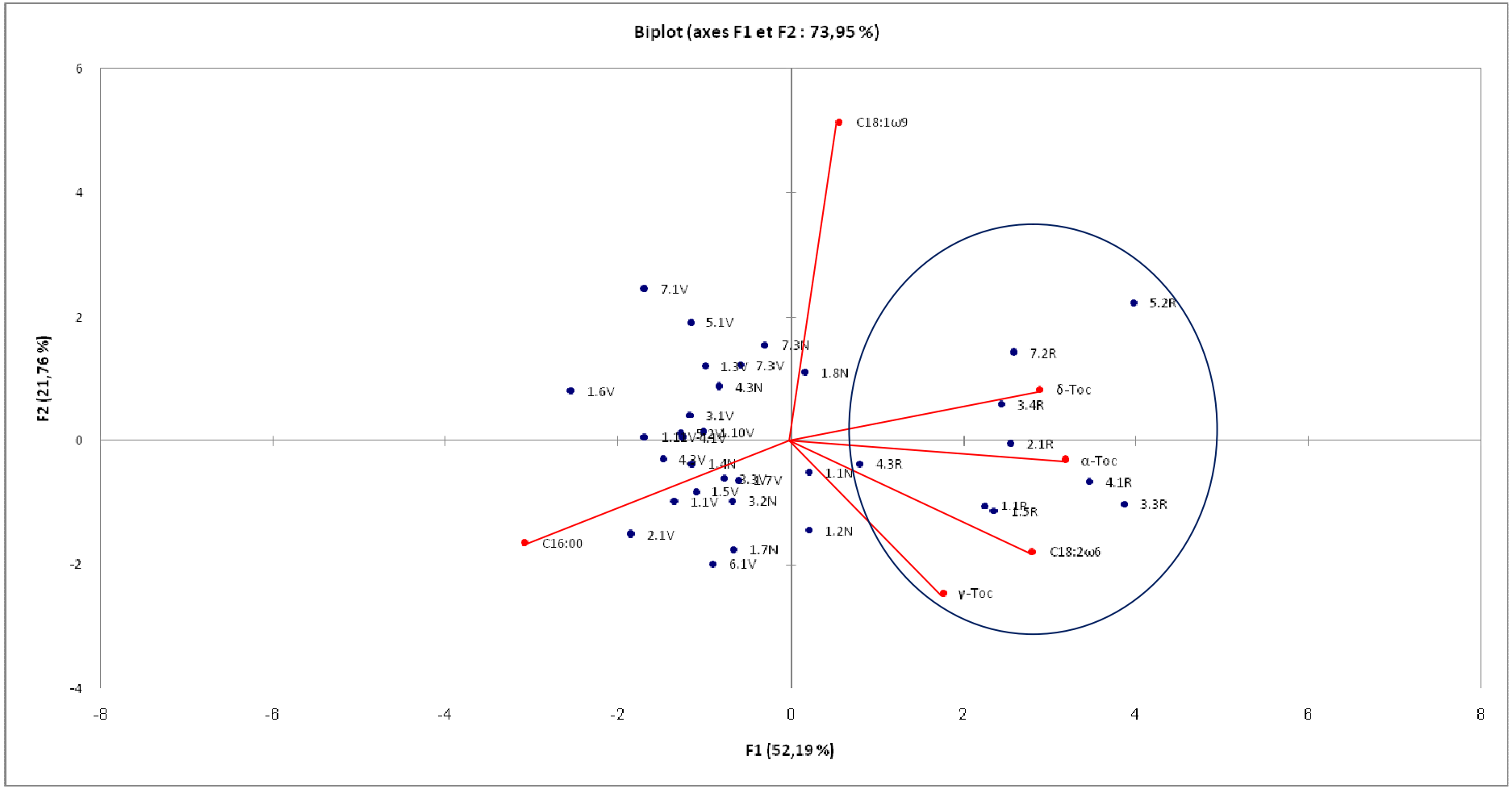


Figure 44 : Distribution de tous les échantillons étudiés (verts, noirs et rouges) par rapport à la position des trois acides gras majoritaires et les trois isomères de tocophérols (selon la teneur) établie par ACP.

Partant de ces données, nous avons tracé la régression linéaire reliant la teneur en α-Toc aux taux de l'acide linoléique (Figure 45). L'aspect du nuage de point plaide en faveur d'une relation méritant de plus amples investigations.

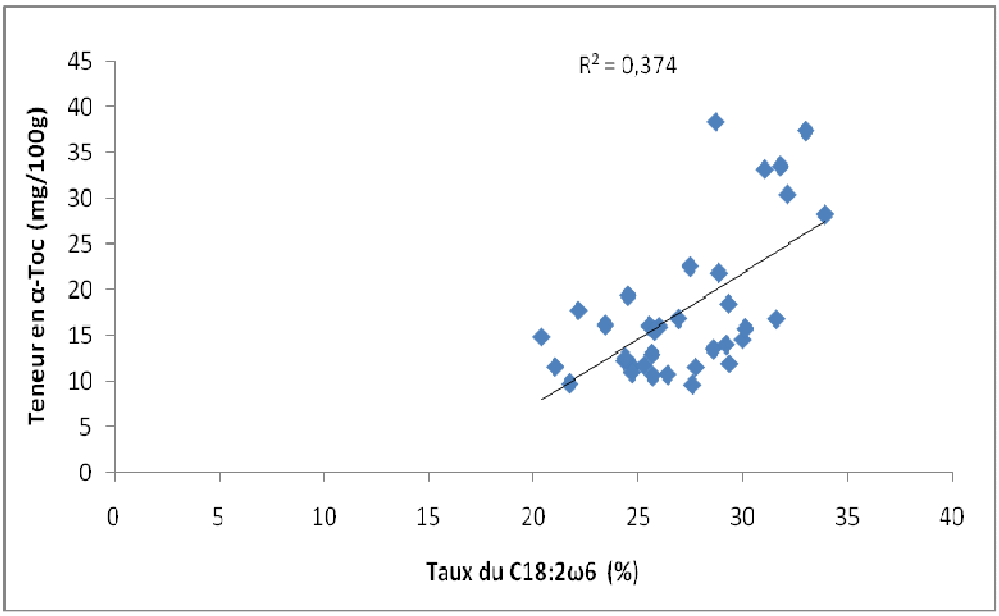


Figure 45 : Régression linéaire entre la teneur en α-Toc et le taux de l'acide linoléique.

Chapitre 2 : Cueillettes 2011

Dans ce chapitre nous rapportons les résultats des expériences effectuées sur douze échantillons de fruits de *Pistacia atlantica*. Ces fruits sont répartis, selon le degré de maturation, en trois catégories. Il s'agit de fruits immatures (de couleur rouge claire), de fruits de maturité moyenne ou intermédiaire (de couleur rouge foncée) et de fruits matures (de couleur noire ou verte). Les expériences effectuées sur ces échantillons l'ont été sur la base des résultats obtenus pour les échantillons de la première cueillette. Ainsi, dans ce chapitre, outre les paramètres étudiés en chapitre 1, nous nous sommes intéressés à d'autres. Il s'agit des indices chimiques (indice d'acide, de saponification et d'iode), de la teneur en stérols totaux et du pouvoir réducteur des huiles par le test Molybdate Phosphate. L'élargissement du degré de maturation à trois stades nous a permis de mieux suivre la variation des paramètres étudiés selon ce critère.

1. Teneur en huiles et indices chimiques

Avant d'analyser le rendement d'extraction des huiles, nous jugeons utile de comparer leur aspect. En effet, ce dernier est très différent et semble être influencé par le stade de maturité. Comme nous l'avons évoqué pour les échantillons de la première cueillette, les fruits verts et noirs (matures) ont fourni une huile jaune d'un aspect limpide, alors que celle issue de fruits rouges (immatures) a une couleur verte et une odeur très agréable. Les deux échantillons de maturité intermédiaire ont fourni une huile dont l'aspect est pratiquement intermédiaire entre les deux autres huiles (Figures 46 et 47). De telles variations pourraient être expliquées par des variations au niveau des pigments dans l'huile. Ces constatations doivent être étayées par des études approfondies.

5.A.RC1 5.A.RF1 5.A.V1

Figure 46 : Aspect de l'huile des échantillons 5.A.RC1, 5.A.RF1 et 5.A.V1.

5.A.RC2

5.A.RF2

5.A.V2

Figure 47 : Aspect de l'huile des échantillons 5.A.RC2, 5.A.RF2 et 5.A.V2.

A l'instar de ce qui a été rapporté en chapitre 1 concernant le rendement d'extraction, nous remarquons pour ces douze échantillons une différence très significative ($p<0,001$) entre les fruits matures et ceux immatures. En effet, les rendements les plus élevés sont obtenus avec les fruits de couleur verte ou noire (moyenne 37,77±6,16 %). Par contre, les fruits immatures (de couleur rouge) ont un rendement moins important (moyenne 13,83± 4,63 %) (Tableau 42).

Tableau 42 : Rendement d'extraction et caractéristiques chimiques des différents échantillons huileux.

Echantillon	**Rendement d'extraction (% m/m)**	**Indice d'acide (mg KOH/g)**	**Indice de saponification (mg KOH/g)**	**Indice d'iode (Wijs)**
5.A.V1	27,7	6,73	212,8	81,28
5.A.RF1	20,08	5,04	204,4	90,81
5.A.RC1	16,6	8,97	201,6	102,9
5.A.V2	37,7	4,20	208,6	74,93
5.A.RF2	34,98	5,33	194,6	92,08
5.A.RC2	16,77	11,22	201,6	94,62
2.B.V	37,75	15,15	201,6	70,49
2.B.RC	6,99	14,03	179,2	90,17
1.F.V	41,72	4,49	180,6	73,03
1.D.RC	14,95	10,66	193,2	87,63
1.C.N	46,06	7,57	212,8	76,84
1.E.N	35,7	21,32	193,2	99,95
Moyenne Immatures	13,83±4,63**	11,22±2,10	193,90±10,57	93,83±6,70*
Moyenne Maturité intermédiaire	27,53±10,54	5,19±0,21	199,50±6,93	91,45±0,90
Moyenne matures	37,77±6,16	9,91±6,86	201,60±12,74	79,42±10,70

***p<0,001 ; *p<0.05* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Il est à noter que les échantillons de couleur rouge foncée (intermédiaire entre le stade immature et le stade mature) ont une contenance en huile assez marquée (moyenne 27,53±10,54 %).

Nous notons avec intérêt que les échantillons 5.A.V2, 5.A.RF2 et 5.A.RC2 avaient un rendement en huiles plus important par rapport à leurs paires cueillis un mois plus tôt (Figure 48). Ceci indique clairement l'effet de la date de cueillette sur la teneur en huile. L'impact de ce facteur serait aussi important que la couleur du fruit.

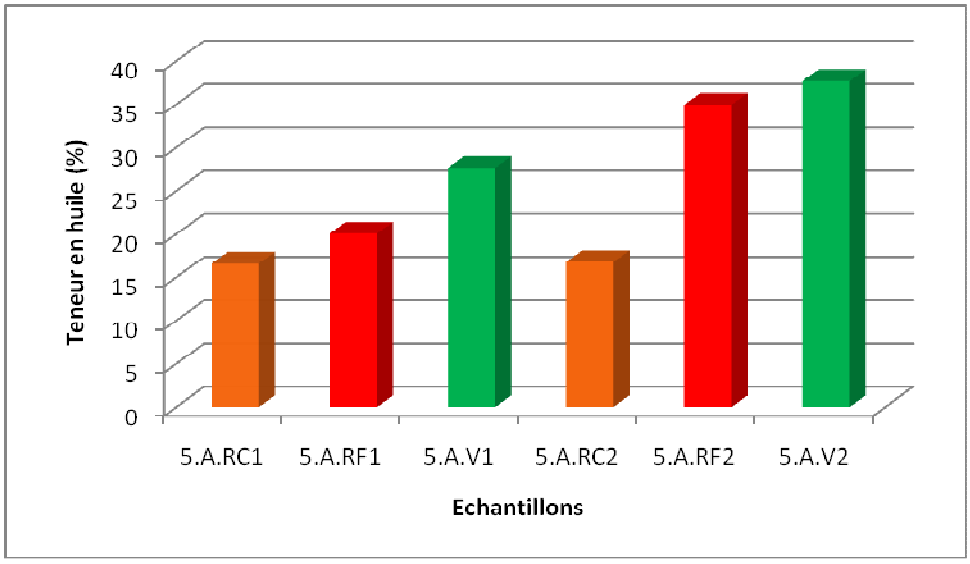


Figure 48 : Variation de la teneur en huile des fruits de *Pistacia atlantica* (arbre A) selon la maturation.

Nous avons déterminé l'indice d'acide, l'indice de saponification et l'indice d'iode pour cette série d'huiles afin de déceler d'éventuelles variations selon le degré de maturation. Ces paramètres nous permettent d'apprécier, d'une manière très globale, quelques caractéristiques des huiles comme la teneur en acide gras libres, la longueur des chaines carbonées des acides gras et le degré d'insaturation. L'ensemble des résultats obtenus, moyenne de deux essais pour chaque indice, est présenté dans le tableau 42.

Les valeurs d'indices d'acide varient de 4,20 à 21,32. Les valeurs élevées trouvées dans la plupart des cas pourraient être expliquées par une mauvaise conservation des fruits (et/ou les huiles) ou par une biosynthèse incomplète **(Yousfi *et al.*, 2002)**.

Nos résultats montrent une variation de l'indice de saponification de 179,2 à 212,8 mg KOH/g. D'une manière générale, nous constatons qu'il n'y a pas de différence

significative selon le degré de maturation, la date de cueillette ou l'emplacement géographique. Nos résultats sont comparables à ceux de l'équipe du Pr Yousfi qui a rapporté un indice de saponification de 199,6 pour un échantillon vert de la région de Tilghimt **(Yousfi *et al.*, 2003)**. D'après ces résultats, les huiles testées contiennent essentiellement des acides gras avec 16 à 18 atomes de carbone **(Yousfi *et al.*, 2002)**.

Les valeurs obtenues pour nos huiles sont, globalement, concordantes avec celles rapportées pour d'autres huiles usuelles telles que l'huile du maïs (IS : 187-195 mg KOH/g), l'huile d'arachide (IS : 187-196 mg KOH/g), l'huile du palme (IS : 190-209 mg KOH/g) **(Knothe, 2002)**, et l'huile d'olive (IS : 182,36-201,05 mg KOH/g) **(Benabid, 2008)**.

L'indice d'iode nous permet d'estimer globalement le degré d'insaturation de la matière grasse. Nos indices varient de 73,03 à 102,9. Nous décelons avec intérêt une élévation assez marquée ($p<0,05$) pour les huiles des fruits immatures (valeur moyenne de 93,83±6,7) par rapport aux huiles des fruits mature (valeur moyenne de 79,42±10,70). Ce résultat plaide en faveur d'un degré d'insaturation élevé pour les huiles des fruits immatures. Un résultat comparable est rapporté par la littérature pour les huiles des fruits de *Pistacia lentiscus* **(Charef *et al.*, 2008)**. Nos résultats sont également semblables à ceux publiés par le Pr Yousfi et ces collaborateurs (II : 88,5 pour des graines matures) **(Yousfi *et al.*, 2003)**.

Il est remarquable que les deux échantillons considérés à un stade intermédiaire de maturation (rouge foncé) aient un indice d'iode assez marqué (91,45±0,9). Il semblerait d'une manière générale que l'indice d'iode, et donc la fraction d'acides gras insaturés, diminue au fur et à mesure de la maturation.

L'échantillon 1.E.N (Noir) se distingue par un indice d'iode assez élevé comparativement aux autres échantillons matures et partant une teneur assez marquée en acides gras insaturés. Il pourrait s'agir d'un cas particulier méritant des études plus poussées.

Partant de ces résultats, nos huiles pourraient être classées parmi les huiles non siccatives dont l'indice d'iode est compris entre 75 et 100.

2. Analyse des acides gras par CPG

Le tableau 43 montre les résultats de l'analyse chromatographique de nos échantillons. Des chromatogrammes sont mentionnés en Annexe.

Neuf acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales sont détectés. Nous avons, à des proportions variées, les acides palmitique, oléique, linoléique, myristique, palmitoléique, stéarique, linolénique, arachidique, gondoïque.

Les proportions des acides gras saturés et insaturés dans les huiles issues des fruits matures et immatures sont presque semblables à ce qui a été discuté en chapitre 1. Ainsi, les acides myristique, palmitique, stéarique et arachidique ont des proportions variant de 24,16 % à 27,25 % pour les huiles des fruits matures et de 16,25 % à 27,35 % pour les huiles des fruits immatures. L'acide palmitique étant le composé majoritaire parmi les acides gras saturés. Il représente entre 13,89 % et 21,89 % pour les fruits immatures, et entre 22,10% et 25,67 % pour les fruits matures. L'acide myristique et arachidique sont aussi détectés dans la majorité des huiles mais avec des proportions très faibles ne dépassant pas respectivement 0,11 % et 0,003 %. Concernant les acides gras insaturés, les acides palmitoléique, oléique, linoléique et linolénique sont détectés dans toutes les huiles. Ils représentent un pourcentage total de 72,72 % à 75,81 % dans les huiles des fruits matures, et de 75,93 % à 83,68 % dans les huiles des fruits immatures. Ils sont représentés essentiellement par l'acide oléique (C18:1ω9), et l'acide linoléique (C18:2ω6).

Tableau 43 : Pourcentages relatifs en acides gras des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* obtenus par CPG (%).

Echantillons	**5.A.V1**	**5.A.RF1**	**5.ARC1**	**5.A.V2**	**5.A.RF2**	**5.A.RC2**	**2.B.V**	**2.B.RC**	**1.F.V**	**1.D.RC**	**1.C.N**	**1.E.N**
C14:0	0,09	0,08	0,11	0,07	0,07	0,10	Tr	0,10	0,10	0,11	0,10	0,08
C16:0	25,09	17,54	13,89	25,03	21,89	14,78	25,67	17,34	24,33	21,11	22,62	22,10
C16:1ω7	0,52	0,74	0,35	0,41	0,37	0,41	0,80	0,35	0,67	0,87	1,79	3,13
C18:0	1,91	2,17	2,25	1,85	2,08	2,13	1,58	2,42	2,64	1,98	1,46	1,98
C18:1ω9	49,58	53,11	51,66	47,44	48,60	51,16	41,73	48,04	40,44	48,35	50,12	40,21
C18: 2ω6	22,00	25,64	30,85	24,43	26,25	30,79	29,43	30,82	30,81	26,63	23,07	32,86
C 18 :3ω3	0,78	0,67	0,82	0,72	0,71	0,60	0,76	0,90	0,99	0,92	0,82	1,07
C20:0	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
C20:1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
AGS	27,09	19,72	16,25	26,95	24,04	17,01	27,25	27,35	27,07	23,2	24,18	24,16
AGMI	50,10	53,85	52,01	47,85	48,97	51,57	42,53	48,39	41,20	49,22	51,91	41,87
AGPI	22,78	26,31	31,67	25,15	26,96	31,39	30,19	31,72	31,80	27,55	23,89	33,93
AGI	72,88	80,16	83,68	73	75,93	82,96	72,72	80,11	73,00	76,77	75,81	75,8
AGI/AGS	2,69	4,64	5,14	2,78	4.65	4,87	2,66	2,92	2,69	3,30	3,13	3,13
Cox	2,93	3,32	3,87	3,15	3,34	3,81	3,61	3,85	3,79	3,43	3,05	4,02
Moyenne de AGI/AGS	Echantillons immatures 4,06±1,11*				Echantillons avec maturité intermédiaire 4,65±0,01				Echantillons matures 2,85±0,22			
Moyenne de Cox	3,74±0,21				3,33±0,02				3,43±0,44			

AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, AGI : acides gras insaturés, Cox : *calculated oxidizabillity value*, Tr : traces. **p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Il est crucial d'indiquer que le rapport acides gras insaturés/acides gras saturés est significativement élevé ($p<0,05$) pour les huiles des fruits immatures (variant de 2,92 à 5,14) par rapport aux huiles issues des fruits matures, lequel rapport varie de 2,69 à 3,13. Les valeurs de Cox évoluent, elles aussi, dans le même sens. Ce résultat est en parfait accord avec les valeurs d'indice d'iode déterminées précédemment militant en faveur d'un haut pourcentage d'acides gras insaturés dans les huiles des fruits immatures par rapport aux fruits matures. Il en est de même pour l'échantillon mature 1.E.N (Tableaux 42 et 43).

Notre étude sur la composition en acides gras de l'huile de Pistachier de l'Atlas montre des valeurs comparables en acide gras que ceux de l'huile de *Pistacia lentiscus* **(Charef *et al.*, 2008 ; Trabelsi *et al.*, 2012)**.

3. Détermination de la fraction insaponifiable dans deux échantillons représentatifs

Ce protocole n'a été appliqué que pour deux échantillons représentatifs (5.A.RC2 considéré immature, et 5.A.V2, considéré mature) afin d'estimer la fraction insaponifiable (stérols, tocophérols, terpènes, pigments,..) par rapport à la masse de l'huile et ce, selon le degré de maturité.

Le tableau 44, montre que l'huile d'un fruit immature (l'échantillon 5.A.RC2 de couleur rouge claire) est approximativement six fois plus riche en fraction insaponifiable par rapport à l'huile d'un fruit mature (l'échantillon 5.A.V2 de couleur verte).

Tableau 44 : Proportion de la fraction insaponifiable dans deux échantillons de degré de maturité différent.

Code	**5.A.V2**	**5.A.RC2**
Arbre	A	A
Rendement de la fraction insaponifiable (% m/m)	1,6	9,15

Ce résultats est étayé par l'aspect de la pipette Pasteur, utilisée comme colonne contenant le gel de silice, pour la purification des EMAG par flash chromatographie. Nous avons, en effet, remarqué, après l'opération de purification, que la couleur du gel de silice à l'intérieur de la colonne était très différente entre les échantillons matures et ceux immatures. Les échantillons les plus immatures (rouge clair) conféraient une couleur jaune foncée à la colonne. Cette couleur est d'autant moins intense que l'huile est issue de fruits matures. Cette couleur jaune est due vraisemblablement à la fraction insaponifiable. Ceci indiquerait que cette fraction insaponifiable est plus représentative au niveau des huiles des fruits immatures et elle diminuerait au fur et à mesure de la maturation des graines. Nous avons pris des photos (Figure 49) pour deux colonnes ayant servi à purifier les EMAG de deux échantillons de degré de maturité différent (5.A.RC1 et 5.A.V1).

5.A.RC1 5.A.V1

Figure 49 : Aspect de la colonne après purification des EMAG sur gel de silice (exemples représentatifs en fonction de la couleur des fruits).

A notre connaissance, il n'y a pas de travaux publiés sur la variation de la fraction insaponifiable dans l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*. Comparativement à d'autres huiles végétales (à titre d'exemples l'huile de sésame, l'huile d'argan, l'huile de *Calophyllum calaba* L. et l'huile d'olive) **(Mohamed et Awatif, 1998 ; Crane *et al.*, 2005, Rahmani, 2005 ; Cardeno *et al.*, 2014)**, la proportion de la fraction insaponifiable de l'huile des fruits matures en est proche.

Partant de ces données, l'étude approfondie de la variation, en fonction de la maturation, de la composition de la fraction insaponifiable de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* est fortement recommandée.

4. Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles

4.1. Teneurs en stérols totaux

La teneur en stérols totaux dans les échantillons d'huile a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du cholestérol (Annexe). Elle est exprimée en milligrammes équivalents de cholestérol par grammes d'huile (mg EC/g d'H).

Les résultats obtenus, moyenne de deux essais, montrent que les huiles étudiées contiennent des quantités non négligeables et variables en stérols (Tableau 45).

Tableau 45: Teneurs en stérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons		**Stérols totaux (mg EC/g d'H)**	**Moyenne (mg EC/g d'H)**
Immature	**5.A.RC1**	22,38	31,30±10,30*
	5.A.RC2	34,75	
	2.B.RC	45,54	
	1.D.RC	22,50	
Maturité intermédiaire	**5.A.RF1**	12,88	14,46±2,23
	5.A.RF2	16,04	
Mature	**5.A.V1**	11,47	11,07±2,23
	5.A.V2	12,13	
	2.B.V	11,31	
	1.F.V	10,83	
	1.C.N	6,81	
	1.E.N	13,86	

EC : Equivalents cholestérol. *$p<0,05$ (comparés par rapport aux échantillons matures).

La teneur en stérols est très variable et a un étendu de 38,73 mg/g pour l'ensemble des échantillons, de 7,05 mg/g pour les échantillons matures et de 23,16 mg/g pour les échantillons immatures. D'après ces résultats, nous pouvons déduire que les fruits immatures sont plus riches en stérols totaux comparativement à ceux matures. Cette constatation est confortée par le test de Student qui indique une différence très significative entre les échantillons matures et immatures ($p< 0,01$). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Maamri (2008), avec de légères différences.

Nous remarquons avec intérêt que la teneur en stérols totaux est d'autant moins élevée que les fruits sont matures. Les échantillons de couleur rouge foncée, considérés comme intermédiaires entre le stade immature et le stade mature, ont pratiquement des valeurs intermédiaires.

4.2. Teneurs en tocophérols totaux

La teneur en tocophérols totaux dans les échantillons d'huiles a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (Annexe) et exprimée en milligrammes équivalents de vitamine E par 100 grammes d'huile (mg EE/100g d'H).

Les résultats obtenus (Tableau 46) montrent que la teneur, moyenne de deux essais, en tocophérols totaux varie d'un extrait à un autre et notamment entre les fruits matures et immatures de *Pistacia atlantica*. En effet, nous avons des valeurs comprises entre 51,35 et 123,01 mg/100 g pour les fruits matures, et entre 114,37 et 170,08 mg/100 g pour les fruits immatures. Le test de Student indique une différence significative entre les deux groupes ($p< 0,001$).

Tableau 46 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica.*

Echantillons		**Tocophérols totaux (mg EE/100 g H)**	**Moyenne (mg EE/100 g H)**
Immature	**5.A.RC1**	134,85	140,61±23,07**
	5.A.RC2	143,12	
	2.B.RC	170,08	
	1.D.RC	114,37	
Maturité intermédiaire	**5.A.RF1**	127,72	115,15±17,78
	5.A.RF2	102,58	
Mature	**5.A.V1**	123,01	86,14±24,44
	5.A.V2	97,83	
	2.B.V	51,35	
	1.F.V	71,13	
	1.C.N	81,56	
	1.E.N	91,94	

EE : Equivalents vitamine E. ***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Concernant les échantillons intermédiaires (rouge foncé), globalement, nous constatons, également, ici, des valeurs comprises entres celles des échantillons matures et celles des échantillons immatures.

4.3. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP

L'analyse des tocophérols individuels par CLHP (colonne polaire) a été réalisée pour 6 échantillons matures, 3 échantillons immatures et 2 échantillons de maturité intermédiaire. Elle a été menée dans les mêmes conditions que celles pour le chapitre 1. Les différents isomères ont également été identifiés d'une manière identique. Les profils de trois échantillons représentatifs issus de l'arbre (A) et ceux de l'arbre (B) sont représentés, respectivement, dans les figures 50 et 51. D'autres profils sont mentionnés en annexe.

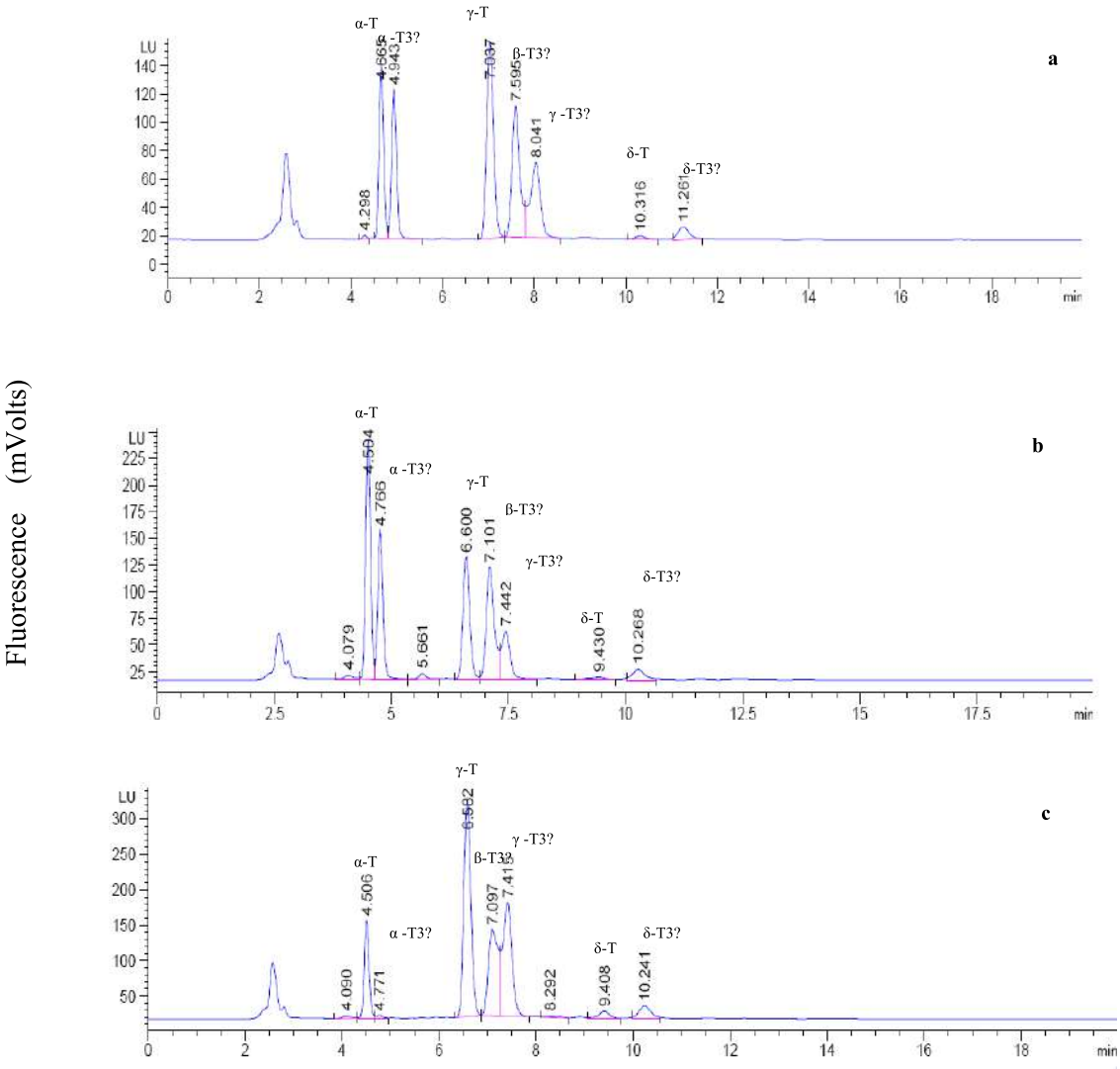


Figure 50 : Profils chromatographiques des échantillons 5.A.V2 (a), 5.A.RF2 (b) et 5.A.RC2 (c). T3? : tocotrienol probable.

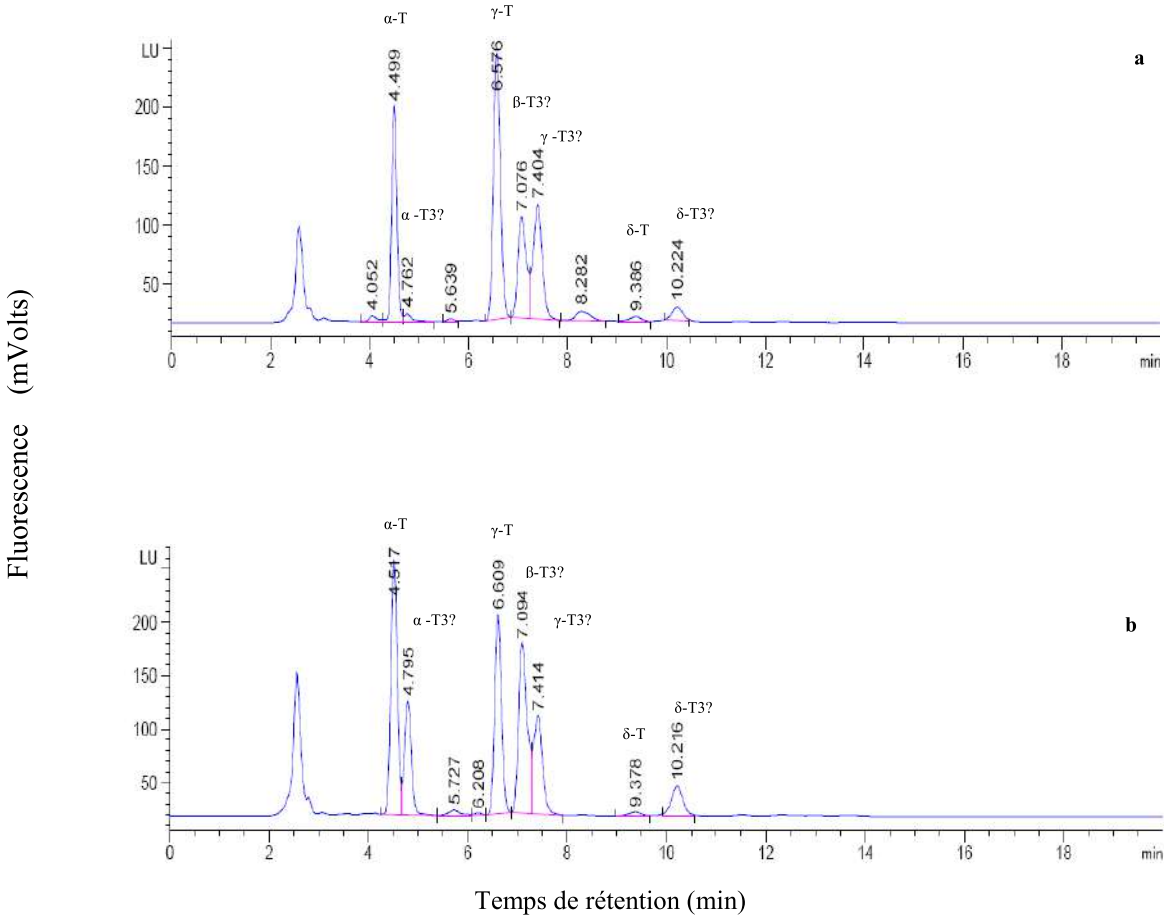


Figure 51 : Profils chromatographiques des échantillons 2.B.V (a) et 2.B.RC (b). T3? : tocotrienol probable.

Les résultats de la quantification, menée d'une manière identique à celle abordée en chapitre 1, des différents isomères de tocophérols sont mentionnés dans le tableau 47. Ils sont exprimés en milligrammes équivalents d'α-tocophérol par 100 grammes d'huile. Nous notons une différence significative, concernant les tocophérols totaux, entre le groupe des échantillons immature (valeur moyenne de 50,68±7,95 mg/100 g) et celui des échantillons mature (valeur moyenne de 34,12±10,89 mg/100 g, $p<0,05$). Le groupe des échantillons de maturité intermédiaire a pratiquement une valeur intermédiaire (44,32±8,08 mg/100 g).

Tableau 47 : Teneurs en tocophérols totaux et individuels dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* (mg EE/100 g H).

Echantillon	**Tocophérols totaux**	**Composition relative**		
		α-Toc	**γ-Toc**	**δ-Toc**
5.A.V1	51,53	22,49 (43,64%)	27,28 (52,94%)	1,76 (3,42%)
5.A.RF1	50.03	15,98 (31,94%)	31,82 (63,60%)	2,23 (4,46%)
5.A.RC1	nd	nd	nd	nd
5.A.V2	30,65	11,09 (36,17%)	17,93 (58,51%)	1,63 (5,32%)
5.A.RF2	38,61	21,38 (55,38%)	15,42 (39,95%)	1,81 (4,68%)
5.A.RC2	49,37	11,84 (23,99%)	34,80 (70,49%)	2,73 (5,52%)
2.B.V	22,61	7,52 (33,25%)	13,38 (59,18%)	1,71 (7,56%)
2.B.RC	59,20	32,62 (55,10%)	23,02 (38,88%)	3,56 (6,02%)
1.F.V	36,25	19,56 (53,95%)	15,54 (42,88%)	1,15 (3,17%)
1.D.RC	43,46	29,05 (66,83%)	12,71 (29,25%)	1,70 (3,92%)
1.C.N	23,78	11,85 (49,83%)	10,15 (42,69%)	1,78 (7,49%)
1.E.N	39,92	14,59 (36,54%)	23,55 (59,00%)	1,78 (4,46%)
Moyenne immature	50,68±7.95*	24,50±11,11 (48,64±22,13%)	23,51±11,05 (46,21±21,57%)	2,66±0,93* (5,15±1,09%)
Moyenne maturité intermédiaire	44,32±8,08	18,68±3,82 (43,66±16,57%)	23,62±11,60 (51,77±16,72%)	2,02±0,30 (4,57±0,15%)
Moyenne mature	34,12±10,89*	14,52±5,60 (42,23±8,32%)	17,97±6,42 (52,53±7,89%)	1,64±0,24 (5,24±1,93%)

EE : Equivalents vitamine E, nd : non déterminé, **p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Les isomères les plus dominants dans les huiles testées sont l'α-Toc et le γ-Toc avec des valeurs comprises, respectivement, entre 7,52 et 32,62 mg/100 g et entre 10,15 et 34,80 mg/100 g. Leurs teneurs sont légèrement élevées dans l'huile des fruits immatures. Comme ce fut le cas pour les échantillons de la cueillette 2009, δ-Toc est détecté dans toutes les huiles testées mais à des proportions faibles. Toutefois, son niveau est significativement élevé dans l'huile des fruits immatures ($p<0,05$).

Il est à noter que la proportion de γ-Toc est légèrement élevée dans les huiles des échantillons matures et ceux de maturité intermédiaire (respectivement, 52,53±7,89 %

et 51,77±16,72 %). Il est également à noter que la proportion de l'α-Toc est toujours considérable dans l'huile des fruits rouges mais pas au même niveau que celui des échantillons présentés au chapitre 1 (53,26±11,45 % contre 48,64±22,13 %).

Comme nous l'avons évoqué en chapitre 1, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de travaux rapportant l'analyse des différents isomères par une colonne polaire (de Silice) encore moins leur variation au cours de la maturation. De ce fait, nous pouvons considérer notre travail concernant les tocophérols très original et extrêmement intéressant. D'une manière générale, les résultats obtenus pour l'huile de *Pistacia atlantica* semblent être très comparables à ceux relatifs à l'huile de *Pistacia terebenthus* **(Matthäus et Özkan, 2006)**.

La richesse de l'huile de *Pistacia atlantica* en tocophérols et notamment l'α-Toc lui fournit des propriétés très bénéfiques. En effet, outre l'effet protecteur contre le stress oxydatif, l'inflammation, la peroxydation lipidique et le cancer, l'α-Toc contribue efficacement dans la protection et la conservation naturelle de l'huile contre la dégradation oxydative **(Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Matthäus et Özcan, 2006 ; Hussain *et al.*, 2013 ; Cardeno *et al.*, 2014)**. Il est également important de ne pas négliger les activités anticancéreuses, antidiabétiques et anti pathologies cardiovasculaires des tocotrienols qui sont aujourd'hui clairement établies (**Packer *et al.*, 2001 ; Wong et Radhakrishnan, 2012**). Ainsi, l'étude des activités biologiques de ces composés est d'une grande importance.

La synthèse des différents résultats précédents montre nettement que la teneur en lipides et celle des fractions insaponifiables (stérols totaux et tocophérols totaux et individuels) constitueraient un caractère spécifique selon le degré de maturation. Ceci ne doit pas être dissocié de la proportion de la fraction insaponifiable, particulièrement élevée dans le cas d'échantillons immatures.

5. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*

5.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH

Le pouvoir antiradicalaire contre le radical libre DPPH des échantillons de la saison 2011 a été évalué d'une façon identique à celle présentée en chapitre 1 pour les fruits de la saison 2009. La vitamine E a été utilisée comme standard. Les figures 52, 53 et 54 représentent les variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la

concentration de chaque extrait lipidique. Les valeurs d'EC_{50} qui en sont déduites sont regroupées dans le tableau 48.

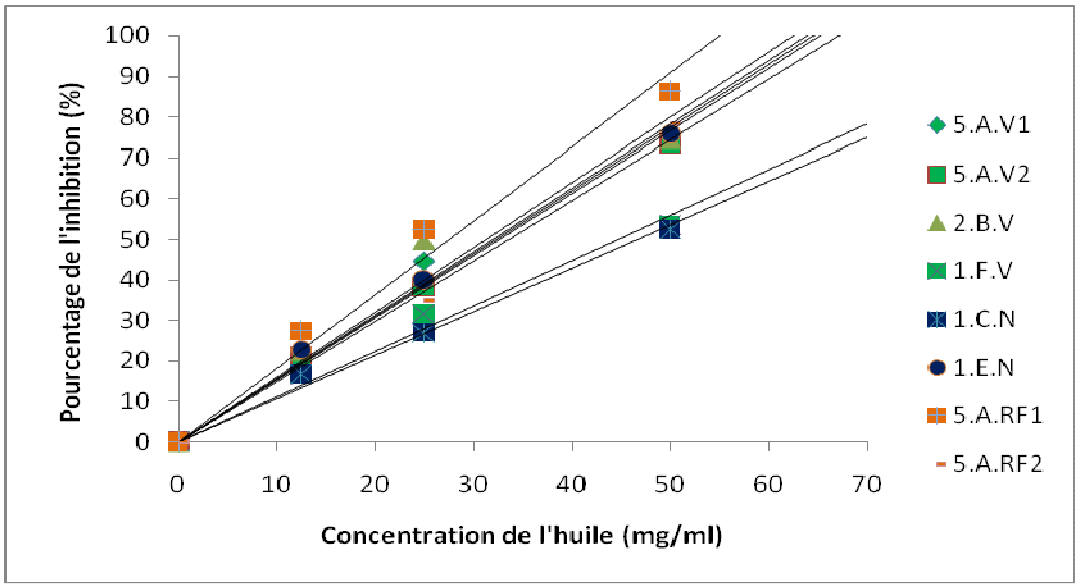


Figure 52 : Activité antioxydante des huiles des fruits matures et ceux de maturité intermédiaire.

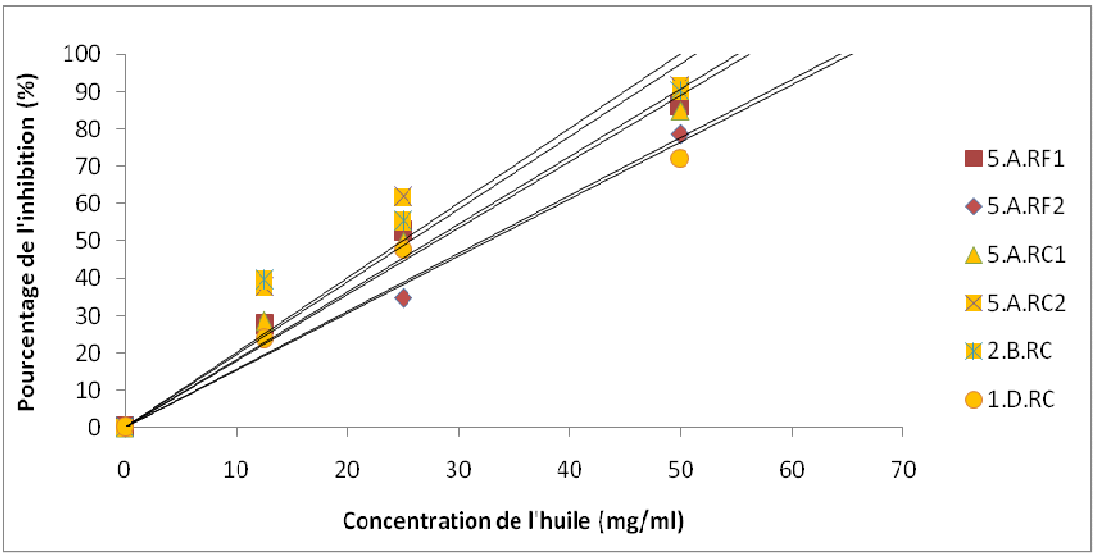


Figure 53 : Activité antioxydante des huiles des fruits immatures et ceux de maturité intermédiaire.

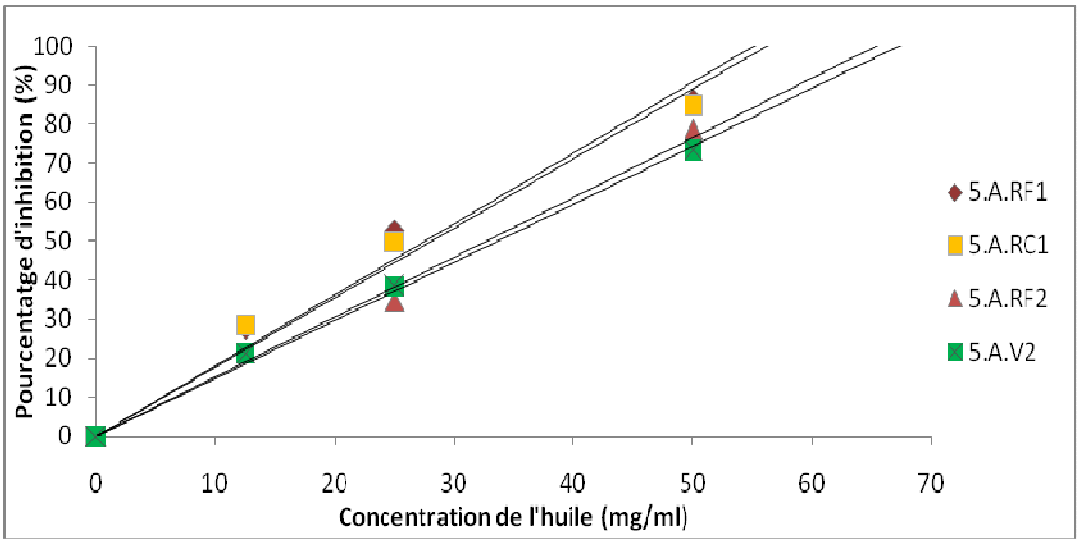


Figure 54 : Variation de l'activité antioxydante des huiles des fruits cueillis à partir du même arbre selon leur degré de maturation.

Tableau 48 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons		**EC_{50} (mg/ml)**	**Moyenne (mg/ml)**
Immature	**5.A.RC1**	28	26,18±7,30*
	5.A.RC2	24,9	
	2.B.RC	17,1	
	1.D.RC	34,7	
Maturité intermédiaire	**5.A.RF1**	33,2	32,30±1,27
	5.A.RF2	31,4	
Mature	**5.A.V1**	31,9	40,13±8,61
	5.A.V2	33,5	
	2.B.V	51,3	
	1.F.V	44,6	
	1.C.N	47,3	
	1.E.N	32,2	
Vitamine E commerciale			0,028

***p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons matures).

Nous remarquons, globalement, à travers les figures 52, 53 et 54 ainsi que le tableau 48, que les huiles des fruits immatures possèdent une activité antioxydante significativement plus élevée par rapport à celles extraites des fruits matures ($p<0,05$).

La valeur moyenne de l'EC_{50} pour le premier groupe est de 26,18±7,30 mg/ml contre 40,13±8,61 mg/ml pour le deuxième groupe. Nous constatons également que les échantillons avec un degré de maturité intermédiaire ont, en général, une activité antioxydante intermédiaire où la valeur moyenne est de 32,30±1,27 mg/ml.

Tous les échantillons testés se montrent moins actifs par rapport à l'antioxydant de référence, la vitamine E, dont l'EC_{50} est de 28 µg/ml (Tableau 48).

De ce qui précède, le degré de maturation influe directement sur le pouvoir antiradicalaire des huiles de fruits de *Pistacia atlantica*. A notre connaissance, c'est la première fois où cet aspect est abordé. Les travaux antérieurs se sont intéressés aux extraits de feuilles **(Benhamou *et al.*, 2008 ; Gourine *et al.*, 2010 ; Peksel *et al.*, 2013)**. Nous l'avions déjà évoqué en chapitre 1.

5.2. Evaluation du pouvoir réducteur par le test au Molybdate Phosphate.

Le test de Molybdate Phosphate est entrepris pour révéler le pouvoir réducteur des extraits lipidiques de trois fruits représentatifs (de degré de maturité différent) de *Pistacia atlantica*. L'activité de chaque extrait est déterminée par deux dilutions différentes et les résultats sont calculés à partir de la courbe réalisée avec la vitamine E. Ils sont exprimés en capacité équivalente de la vitamine E (mg/g d'huile). Les résultats sont mentionnés dans le tableau 49. Il en ressort que l'huile du fruit immature, montre un pourvoir réducteur assez intéressant.

Tableau 49 : Pouvoir réducteur (par le test au Molybdate Phosphate) pour trois échantillons représentatifs.

Echantillon	Capacité équivalente (mg vit E/g d'H)
5.A.V1	9,43 ± 1,31
5.A.RF1	12,39 ± 1,44
5.A.RC1	12,55 ± 1,96

6. Dosage et CLHP des extraits phénoliques à partir des tourteaux

Nous avons entrepris le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes pour les douze échantillons concernés par ce chapitre. L'opération s'est effectuée dans les mêmes conditions que celles abordées en chapitre 1. Les résultats sont récapitulés dans les tableaux 50 et 51 ainsi que la figure 55.

Tableau 50 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

Degré de maturité	**Echantillon**	**Phénols totaux (mg EAG/g MS)**	**Flavonoïdes (mg ER/g MS)**	**Proportion des flavonoïdes dans les phénols totaux (%)**
Immature	5.A.RC1	78,34	12,76	16,29
	5.A.RC2	69,43	11,06	15,93
	2.B.RC	72,58	14,72	20,28
	1.D.RC	65,19	11,95	18,33
Maturité intermédiaire	5.A.RF1	68,46	16,78	24,51
	5.A.RF2	60,63	12,42	20,48
Mature	5.A.V1	36,76	19,55	53,18
	5.A.V2	31,04	18,74	60,37
	2.B.V	28,65	13,75	47,99
	1.F.V	20,74	13,84	66,73
	1.C.N	16,49	4,88	29,59
	1.E.N	21,91	7,27	33,18

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche.

Tableau 51: Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillon	Moyenne immature	Moyenne maturité intermédiaire	Moyenne mature
Phénols totaux (mg EAG/g MS)	71,39±5,54**	64,55±5,54**	25,93±7,52
Flavonoïdes (mg ER/g MS)	12,62±1,56	14,60±3,08	13,01±5,93
Proportion des flavonoïdes dans les phénols totaux (%)	17,71±2,02	22,50±2,85	48,51±14,75

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche. ***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

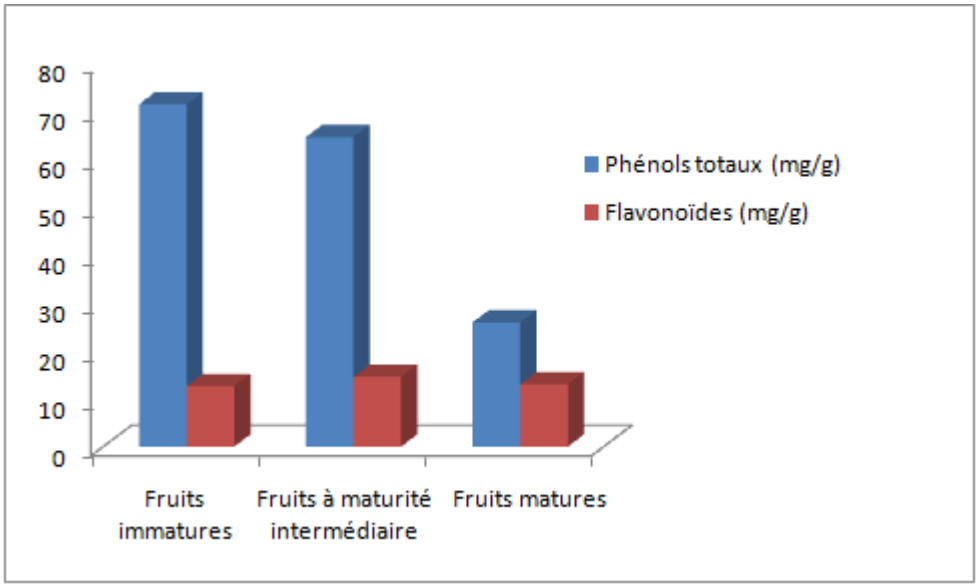


Figure 55 : Teneurs moyennes en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

Ces résultats confirment les différences constatées pour les échantillons de la première série d'étude présentée en chapitre 1. Il convient de mettre l'accent sur les niveaux particulièrement élevés des phénols totaux dans les extraits des fruits de maturité intermédiaire (p<0,001, par rapport aux fruits matures).

La variation de la proportion des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux est également considérable soulignant l'extrême hétérogénéité de la composition en polyphénols et sa variation spectaculaire au fur et à mesure de la progression de la maturation.

Nous ne disposons pas de données publiées sur la variation de la composition en composés phénoliques pour faire des comparaisons où pouvoir avancer d'éventuelles hypothèses expliquant ces variations. Des études approfondies sont donc nécessaires pour mieux cerner cette problématique.

Nous avons présenté en chapitre 1 quelques profils chromatographiques d'une analyse par CLHP des extraits phénoliques. En dépit de l'absence d'une identification formelle des différents composés, nous avons tenté de faire des comparaisons et d'établir une relation avec les dosages colorimétriques. Dans ce chapitre, nous exposons des chromatogrammes obtenus pour des échantillons représentatifs (Figures 56 et 57). Il s'agit d'échantillons issus du même arbre (A) à des degrés de maturation différents.

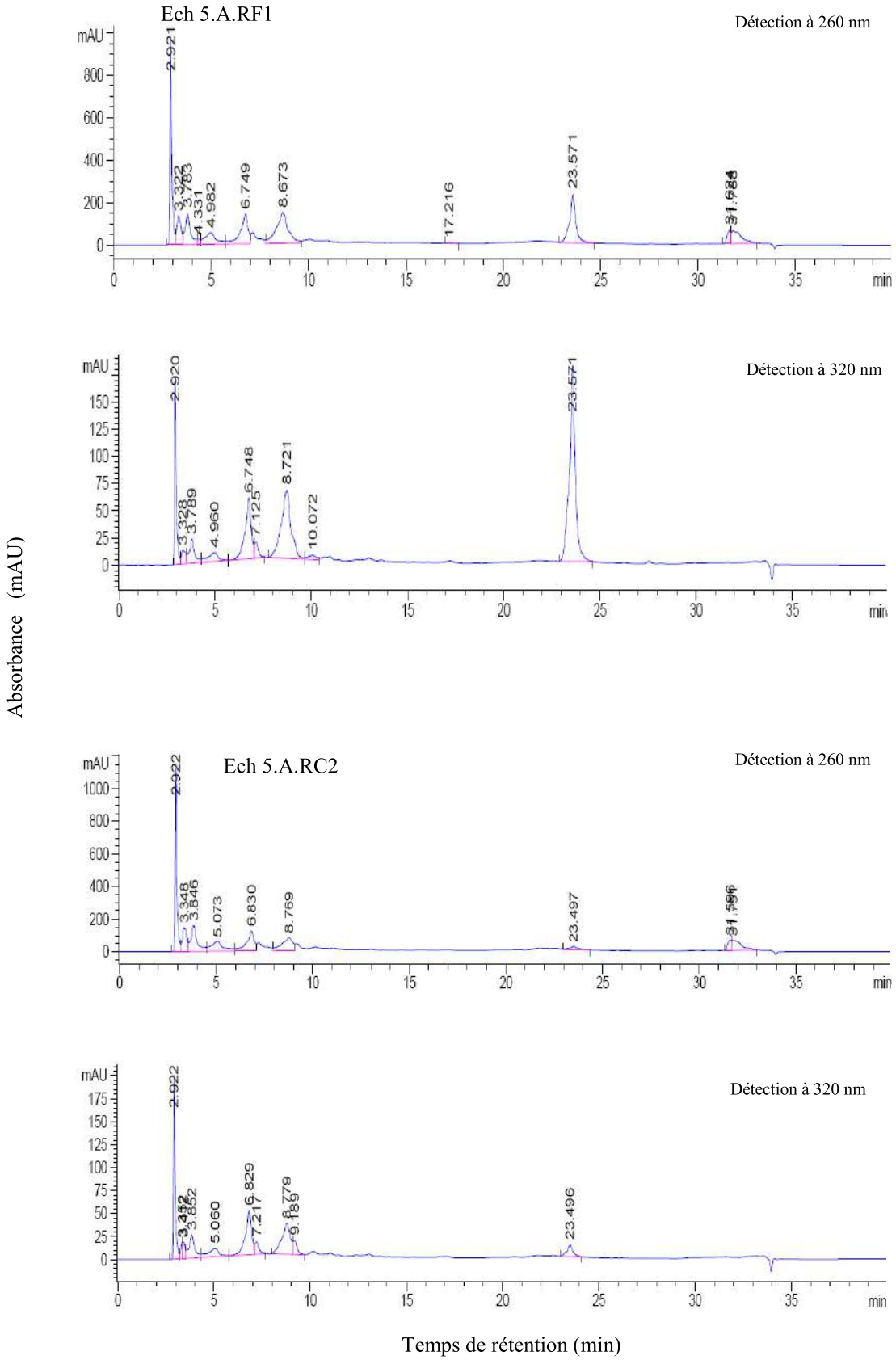


Figure 56 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons 5.A.RF1 et 5.A.RC2. Détection à 260 et 320 nm.

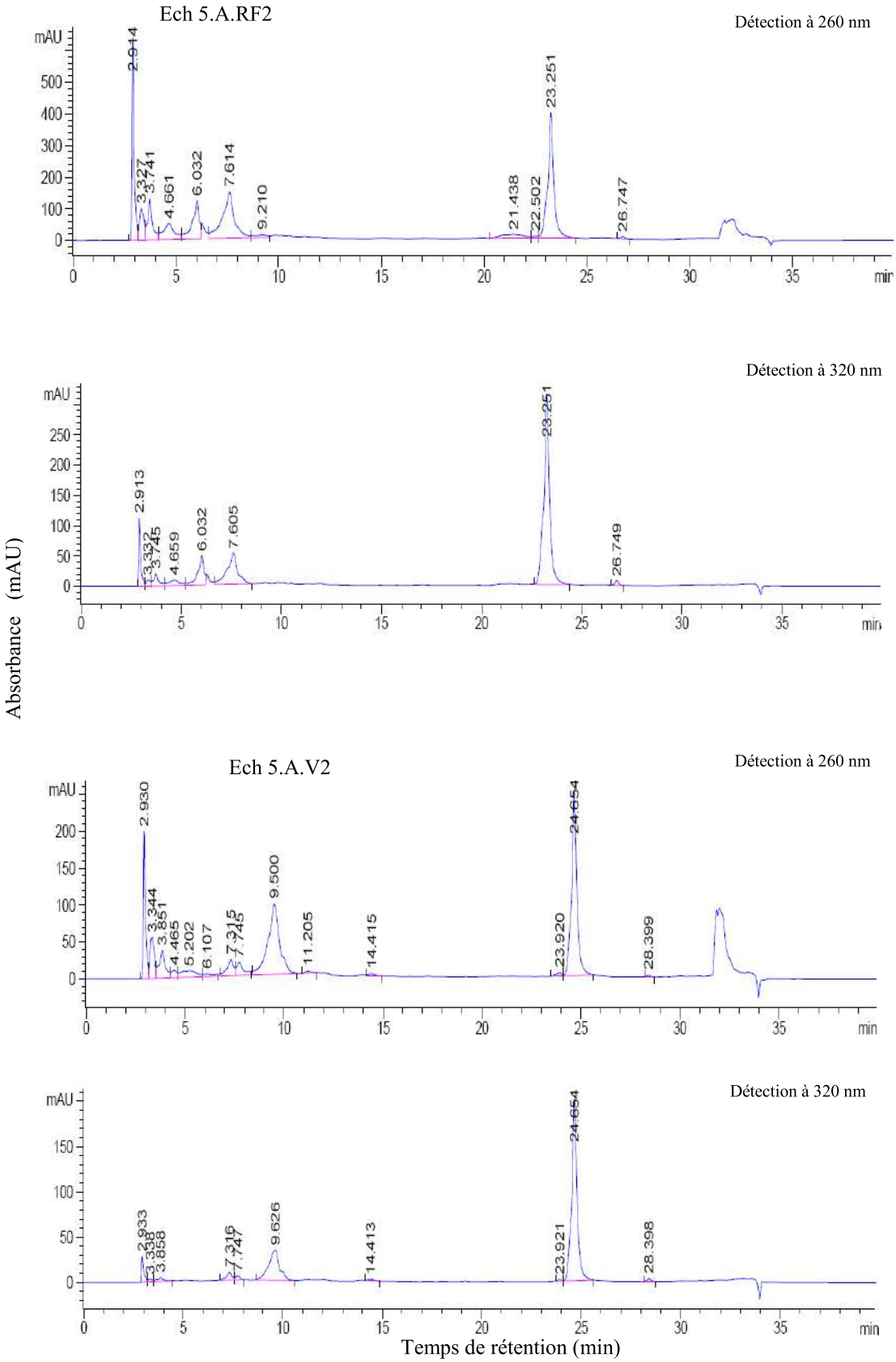


Figure 57 : Profils chromatographiques d'analyse par CLHP des composés phénoliques pour les échantillons 5.A.RF2 et 5.A.V2. Détection à 260 et 320 nm.

Nous avons aligné les différents chromatogrammes selon, à la fois, l'ordre chronologique de la cueillette et la couleur du fruit, et ce afin de suivre la variation de leur aspect. Nous notons avec intérêt la disparition progressive du premier pic (temps de rétention 2,92 min) associée à une progression concomitante du pic se situant à un temps de rétention compris entre 23 et 24 min. Nous nous sommes déjà interrogés en chapitre 1 si ce pic correspondait à un ou plusieurs flavonoïdes. En somme, nous pouvons, sur la base de toutes ces données, avancer qu'il y a effectivement une variation, qualitative et quantitative, de la composition des composés phénoliques en fonction de la maturation.

7. Etude statistique

Etant donné le nombre restreint des échantillons concernés par ce chapitre (au nombre de douze), nous concentrons la discussion, de point de vue statistique, autour des régressions linéaires afin d'établir d'éventuelles relations entre les principaux paramètres présentés dans ce chapitre. Nous avons également établi une classification hiérarchique ascendante (CAH) en vue de comparer l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*, à différents degrés de maturité, par rapport à d'autres huiles végétales et ce selon la composition en acides gras et en tocophérols.

7.1 Régressions linéaires entre l'activité antioxydante et la teneur en tocophérols et stérols

Les régressions linéaires reliant l'EC_{50} à la teneur en tocophérols totaux déterminées par dosage colorimétrique, à la teneur des tocophérols totaux déterminées par CLHP, à la teneur de l'α-Toc et à la teneur de γ-Toc (déterminées par CLHP) sont présentées dans la figure 58. Nous remarquons une très forte association entre l'activité antioxydante et la teneur en tocophérols totaux (coefficient de la corrélation négative -0,93 dans le cas des tocophérols déterminés par colorimétrie et -0,86 dans le cas des tocophérols déterminés par CLHP). Ainsi, l'EC_{50} est d'autant moins élevé que la teneur en tocophérols augmente. C'est tout à fait normal dans la mesure où le pouvoir antioxydant des tocophérols n'est plus à démontrer. Cependant, nous remarquons une association moins prononcée entre l'activité antioxydante et les isomères α-Toc et γ-Toc (coefficients de corrélation respectifs -0,56 et -0,62).

Etant donné les propriétés antioxydantes des phytostérols **(Yoshida et Niki, 2003)**, nous présentons également la régression linéaire reliant l'EC_{50} à leur teneur (Figure 59). Il apparait clairement qu'il y a une forte association entre ces deux paramètres (coefficient de la corrélation négative -0,79) indiquant une probable implication dans l'activité anioxydante.

Bien que le test de Molybdate Phosphate n'ait été effectué que pour trois échantillons représentatifs, nous avons jugé utile d'établir une régression afin de déceler une éventuelle relation entre la teneur en tocophérols totaux et le pouvoir réducteur des extraits. La figure 60 indique une association restreinte entre ces deux paramètres (coefficient de la corrélation positive 0,82).

De ce qui précède, nous pouvons dire que les tocophérols et à moindre degré les stérols sont impliqués directement dans l'activité antioxydante des extraits lipidiques des fruits de *Pistacia atlantica*.

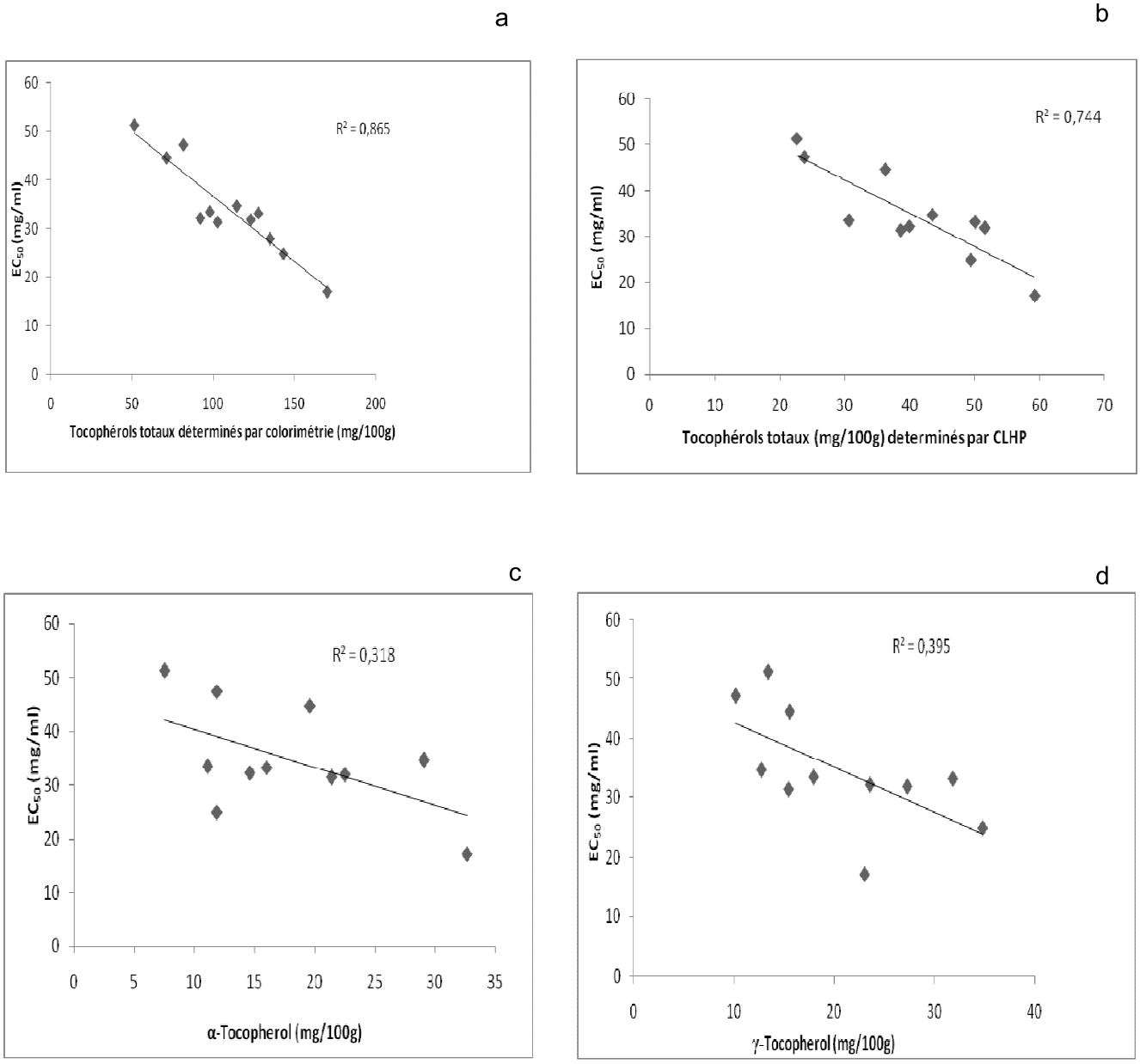


Figure 58 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminée par dosage colorimétrique (a), la teneur des tocophérols totaux déterminés par CLHP (b), la teneur de l'α-Toc (c) et la teneur de γ-Toc (d) de l'autre part.

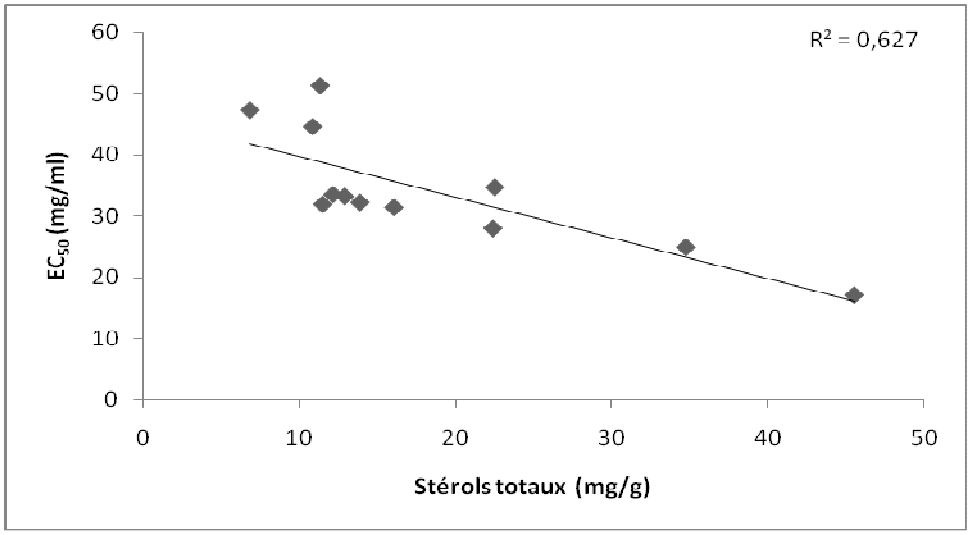


Figure 59 : Régression linéaire entre l'EC_{50} et la teneur en stérols totaux.

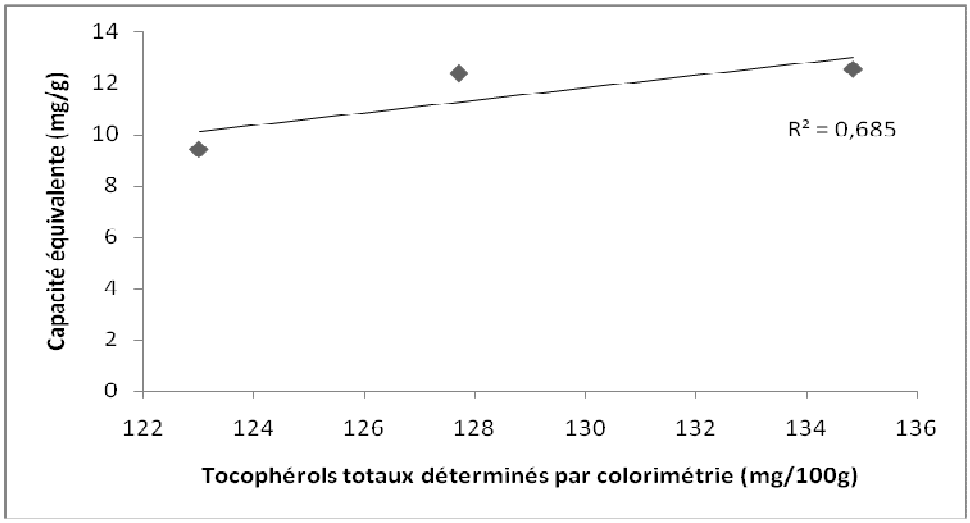


Figure 60 : Régression linéaire entre la capacité équivalente du pouvoir antioxydant et la teneur en tocophérols totaux.

7.2 Comparaison de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales

Les données relatives à la composition en acides gras et en tocophérols de l'huile de *Pistacia atlantica* et celles concernant d'autres huiles analysées dans les mêmes conditions et rapportées par la littérature **(Feeter, 1974 ; Changbumrung *et al.*, 1980 ; Karlenskind, 1992 ; Rezanka, 1999 ; Giacometti, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2008)**,

nous ont permis de dresser les dendrogrammes de dissimilarité (classification hiérarchique ascendante) (Figures 61 et 62).

La composition en acides gras de notre huile présente une similitude avec des huiles végétales de haute valeur diététique comme l'huile d'olive et l'huile d'arachide En ce qui concerne les tocophérols, le dendrogramme indique deux groupes principaux, le premier englobe des huiles où α-Toc était, en grande partie le plus prédominant comme l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile du palmier à huile; le deuxième inclut des huiles contenant des teneurs substantielles en α-Toc et en γ-Toc telles que l'huile de colza et l'huile de maïs. L'huile des fruits de *Pistacia atlantica* semble appartenir à ce dernier groupe. Il est important de noter que le dendrogramme montre que notre huile pourrait être divisée en deux sous-groupes distincts selon le degré de maturation. Le premier est représenté par l'huile des fruits immatures qui est caractérisée par les proportions élevées d'α-Toc et de γ-Toc. Le deuxième comprend les huiles des fruits matures et ceux de maturité intermédiaire où le γ-Toc domine par rapport à l'α-Toc. Cette une observation très intéressante qui doit être confirmée par des investigations supplémentaires.

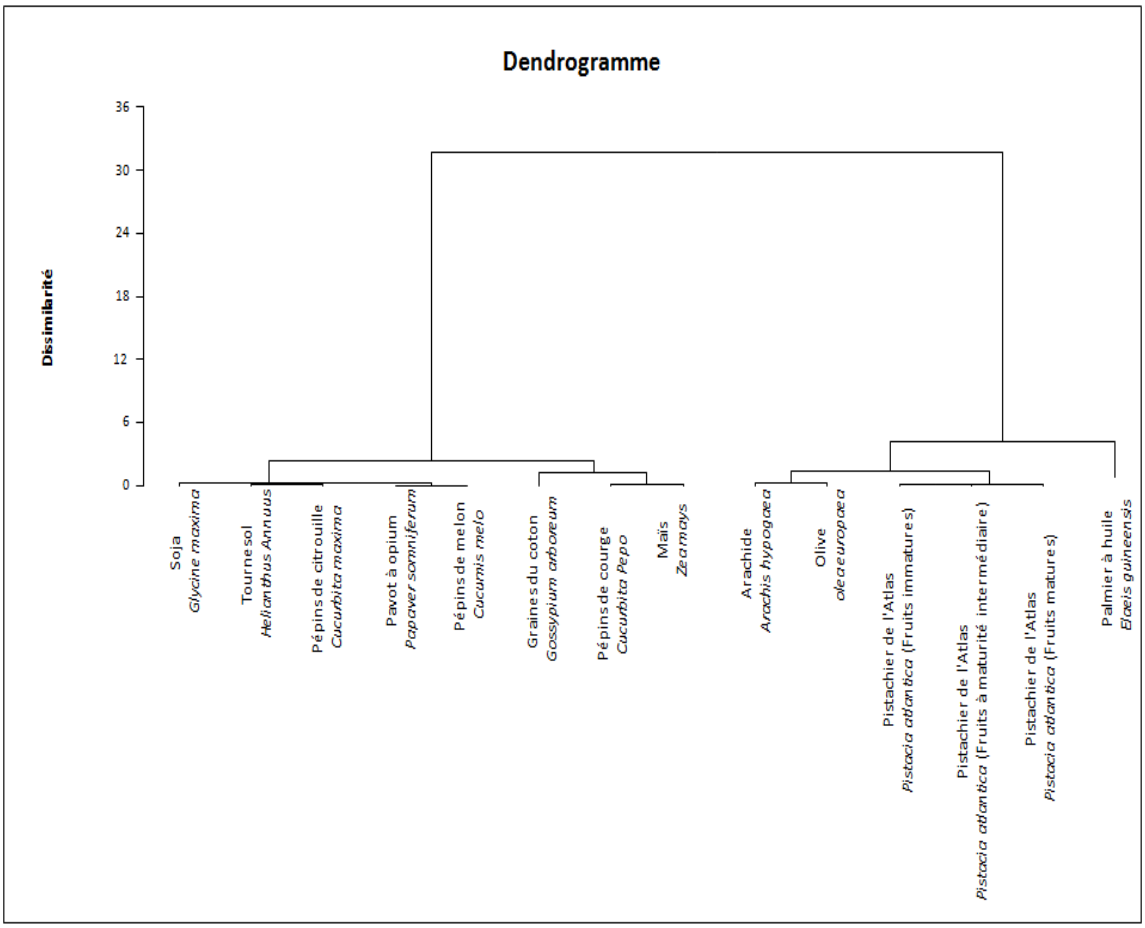


Figure 61 : Classification hiérarchique ascendante de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales selon la composition en acides gras.

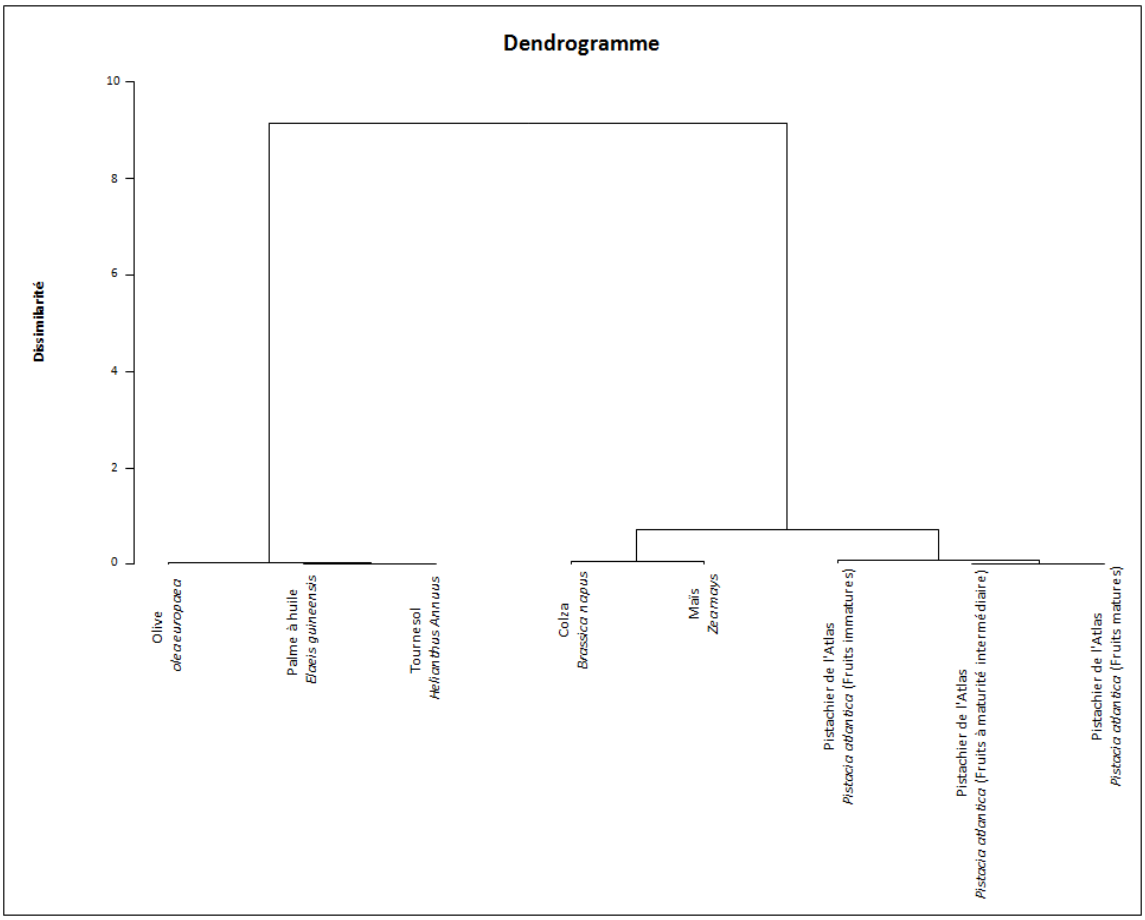


Figure 62 : Classification hiérarchique ascendante de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* et d'autres huiles végétales selon la composition en tocophérols.

Chapitre 3 : Cueillettes 2013

Dans ce chapitre, nous rapportons les résultats des expériences effectuées sur vingt et un (21) échantillons cueillis à partir de trois arbres différents. Il s'agit de fruits de couleur verte (ou noire), rouge foncée et rouge claire considérés respectivement comme matures, de maturité intermédiaire et immatures ainsi que des fruits non triés constituant des mélanges (de plusieurs couleurs) répartis selon l'ordre chronologique des cueillettes en "mélange" 1, 2 et 3. Nous avons déjà justifié l'introduction de ces échantillons dans notre étude dans le chapitre matériel et méthodes. L'aspect de ces "mélanges" varie selon la date de la cueillette (Tableau 8). Ainsi, le "mélange" 1 (cueillis au mi aout) est dominé par les fruits immatures de couleur rouge claire ou jaune. Le "mélange" 2 (cueillis à la fin aout ou au début septembre) est dominé par des fruits de maturité intermédiaire (rouge foncé) ou des fruits matures (verts ou noirs) et immatures à des proportions très proches. Quant au "mélange" 3 (cueillis au mi septembre), il est dominé par des fruits matures (verts ou noirs).

Dans le présent chapitre, nous nous intéressons, en plus des paramètres déjà exposés précédemment, à de nouveaux paramètres, notamment les composés phénoliques dans l'huile et leur implication dans l'activité antioxydante.

1. Teneur en huiles

Comme il a été évoqué en chapitres 1 et 2, nous constatons une différence très significative ($p<0,001$) entre les rendements d'extraction des huiles des fruits matures et ceux immatures (Tableau 52). Nous y distinguons aussi une étendue (différence entre la plus grande et la plus petite valeur) assez importante au sein d'un seul groupe, ce qui rend compte d'un certain degré d'hétérogénéité.

Nous notons également une différence observable entre le "mélange" 1 et le "mélange" 3 (22,79±5,69 % contre 30,07±2,04 %) plaidant en faveur d'une augmentation de la teneur en huile au fur et à mesure de la progression de la maturation.

Tableau 52 : Rendements d'extraction de l'huile à partir des différents échantillons étudiés.

Echantillons		**Rendement d'extraction de l'huile (% m/m)**	**Moyennes (% m/m)**
Immature	4.G.RC.1 4.G.RC.2 2.B.RC.1 2.B.RC.2 2.B.RC.3	13,65 16,67 9,54 14,69 13,89	13,69±2,61**
Maturité intermédiaire	2.B.RF.1 2.B.RF.2 2.B.RF.3	22,54 28,73 35,19	28,82±6,33
Mature	4.G.N.1 4.G.N.2 2.B.V.1 2.B.V.2 2.B.V.3	47,34 46,75 31,56 33,6 36,94	39,24±7,38
Echantillons "mélanges"			
Arbre G	4.G.MEL.1 4.G.MEL.2	29,14 36,76	Moyenne Mél 1 22,79±5,69
Arbre H	6.H.MEL.1 6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	18,15 25,12 28,63	Moyenne Mél 2 27,99±7,74
Arbre B	2.B.MEL.1 2.B.MEL.2 2.B.MEL.3	21,07 22,09 31,51	Moyenne Mél 3 30,07±2,04

***p<0,001* (comparés par rapport aux échantillons matures).

2. Teneurs en tocophérols totaux

Les résultats du dosage colorimétrique des tocophérols totaux sont mentionnés dans le tableau 53. D'une manière globale, nous remarquons que la teneur en tocophérols totaux dans les extraits des fruits immatures est plus importante par rapport à celle des extraits des fruits matures. Pour les fruits immatures, les teneurs en tocophérols totaux sont entre 84,78 et 133,82 mg/100 g, et pour les fruits matures, elles sont entre 70,64 et 117,48 mg/100 g. Les teneurs pour les fruits intermédiaires sont comprises entre celles des échantillons immatures et celles des échantillons matures (Tableau 53).

Tableau 53 : Teneurs en tocophérols totaux dans les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons		**Tocophérols totaux (mg EE/100g H)**	**Moyennes (mg EE/100g H)**
Immature	4.G.RC.1 4.G.RC.2 2.B.RC.1 2.B.RC.2 2.B.RC.3	101,76 84,78 133,82 119,39 93,85	106,72±19,78
Maturité intermédiaire	2.B.RF.1 2.B.RF.2 2.B.RF.3	104,03 105,35 99,34	102,90±3,15
Mature	4.G.N.1 4.G.N.2 2.B.V.1 2.B.V.2 2.B.V.3	70,64 79,72 117,48 94,24 89,75	90,39±17,69
Echantillons "mélanges"			
Arbre G	4.G.MEL.1 4.G.MEL.2	96,40 76,46	<u>Moyenne Mél 1</u> 156,67±64,97
Arbre H	6.H.MEL.1 6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	225,50 105,93 83,98	<u>Moyenne Mél 2</u> 98,90±19,88
Arbre B	2.B.MEL.1 2.B.MEL.2 2.B.MEL.3	148,13 114,33 101,22	<u>Moyenne Mél 3</u> 92,60±12,19

EE : Equivalents vitamine E.

Bien qu'il y ait une différence entre les fruits matures et immatures, le test de Student indique qu'elle n'est pas significative. Ceci pourrait être expliqué par l'hétérogénéité des échantillons testés (arbres différents et d'emplacements géographiques différents). Cette situation a augmenté l'étendue de la série, notamment pour les fruits immatures (étendue de 49,04 mg/100 g). Il est important de noter que les huiles des fruits de l'arbre (B) sont plus riches en tocophérols par rapport à l'arbre (G) et ce pour les fruits matures et immatures. (B) se distingue de (G) par l'emplacement géographique et surtout par la couleur des fruits matures (respectivement verte ou noire). Ainsi, les fruits verts semblent contenir plus de tocophérols par rapport aux fruits noirs et ce pour les différents stades de maturation. Ce constat mérite de plus amples recherches.

La diminution de la teneur en tocophérols selon l'ordre chronologique des cueillettes est très évidente pour les échantillons "mélanges" de l'arbre (H) et, à moindre degré, l'arbre (B) (Tableau 53). Ainsi, les fruits seraient d'autant plus riches en tocophérols que leur cueillette est précoce.

Dans l'ensemble, les résultats du dosage colorimétrique des tocophérols totaux de ce chapitre confortent et complètent ceux des chapitres 1 et 2.

3. Analyse et dosage des tocophérols par CLHP

L'analyse des tocophérols individuels par CLHP (colonne polaire) a été réalisée pour les 8 échantillons "mélanges". Elle a été menée dans les mêmes conditions que celles pour les chapitres 1 et 2. Les différents isomères ont également été identifiés d'une manière identique. Cependant, nous avons préparé, pour cette série, une nouvelle mixture de standards commerciaux (profil en Annexe).

Les profils représentatifs des arbres (G), (H) et (B) sont représentés, respectivement, dans les figures 63, 64 et 65.

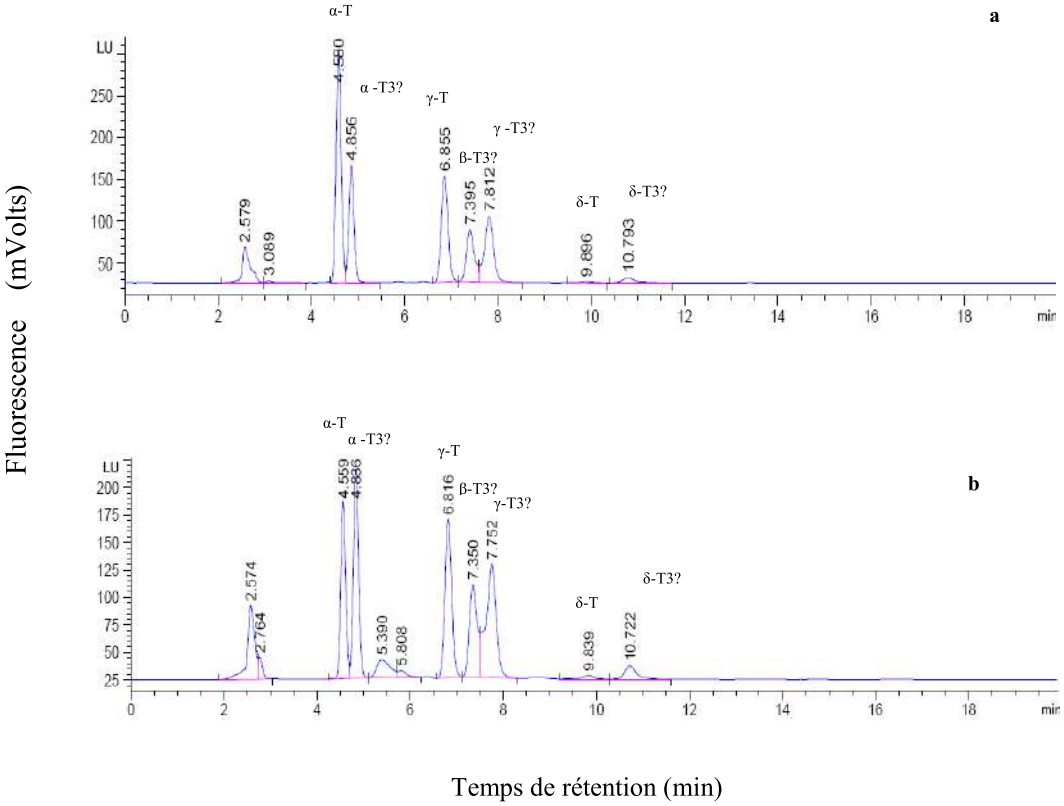


Figure 63 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (G): 4.G.MEL.1 (a) et 4.G.MEL.2 (b). T3? : tocotrienol probable.

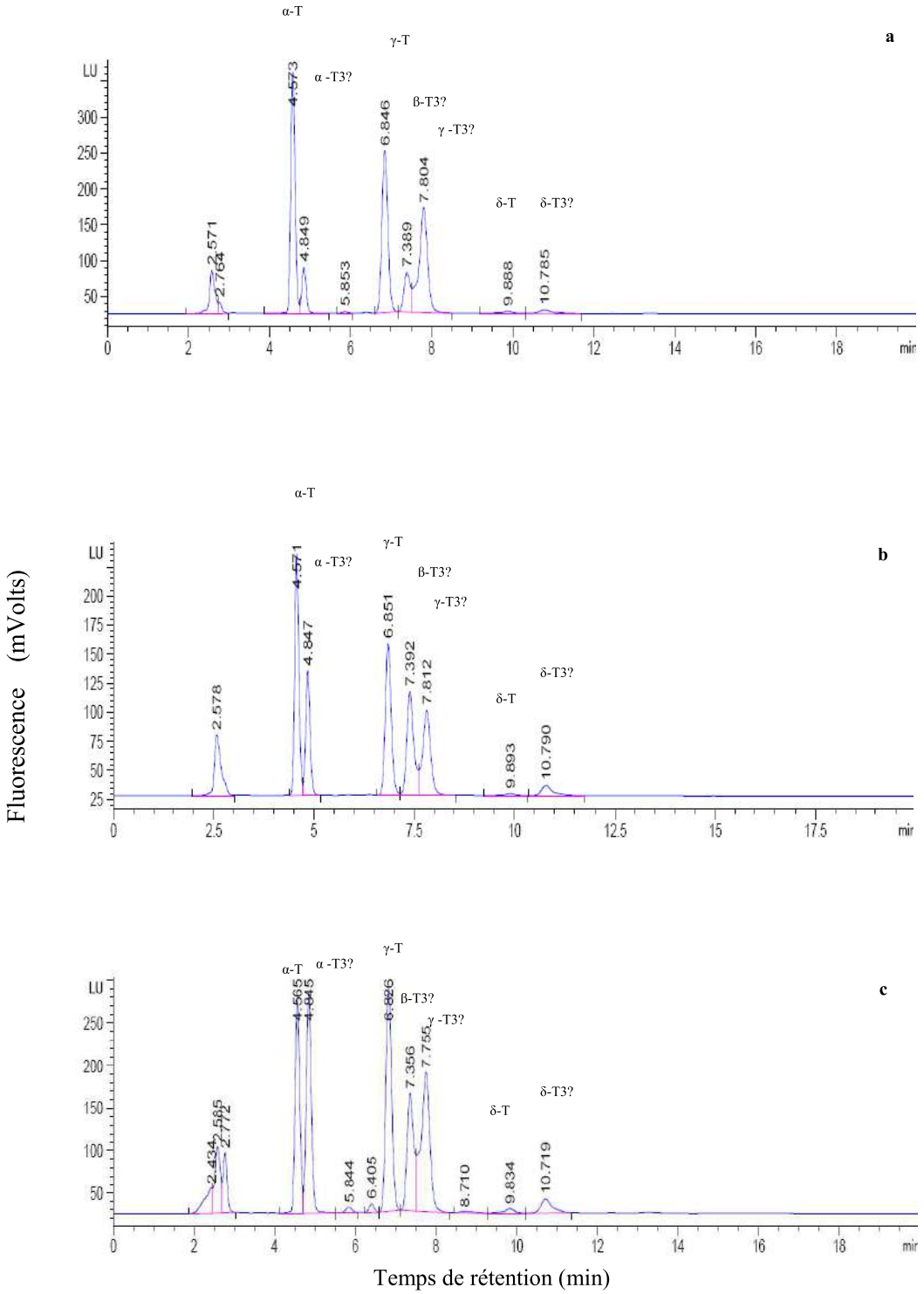


Figure 64 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (H): 6.H.MEL.1 (a), 6.H.MEL.2 (b) et 6.H.MEL.3 (c). T3? : tocotrienol probable.

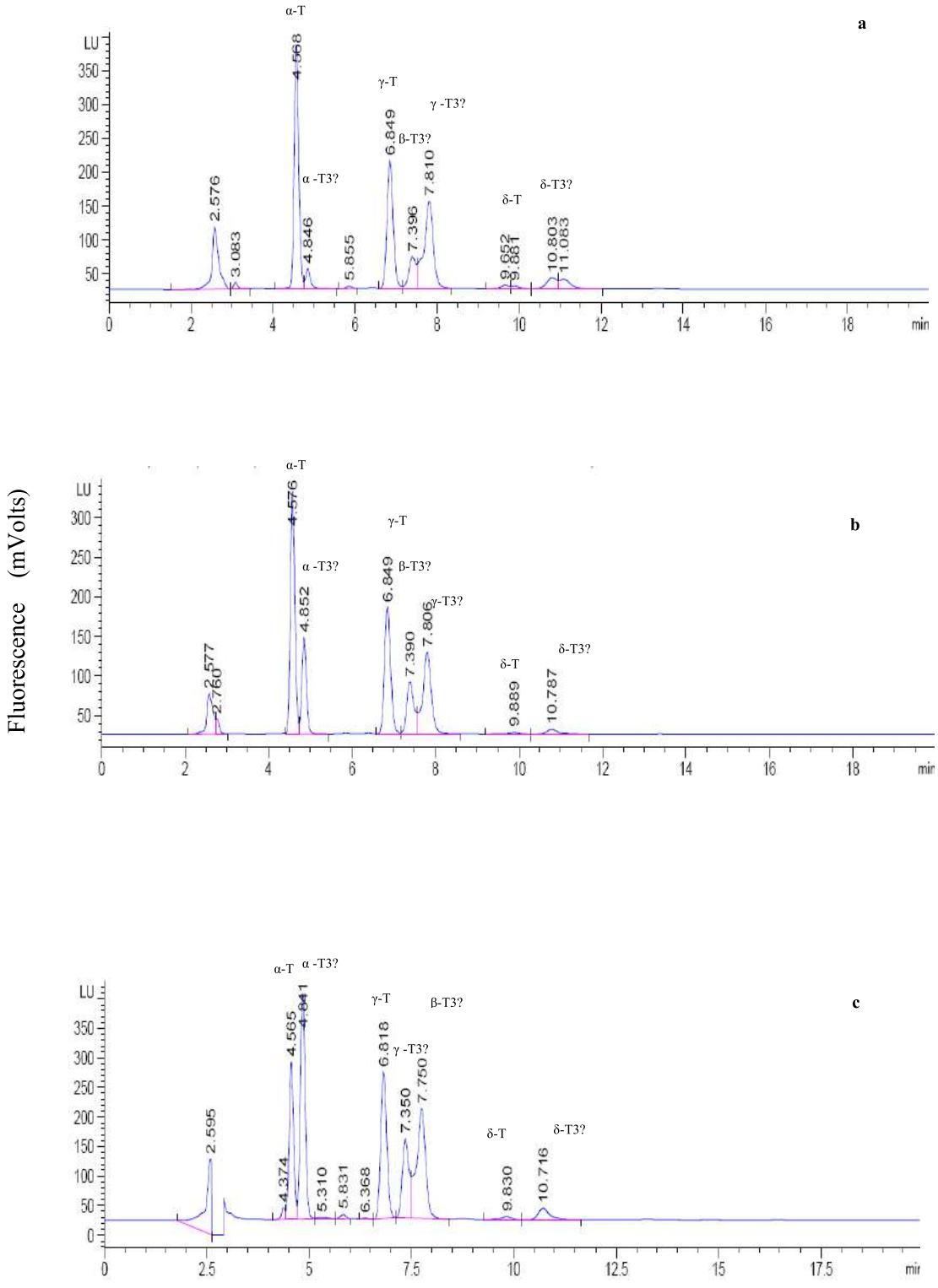


Figure 65 : Profils chromatographiques des échantillons de l'arbre (B): 2.B.MEL.1 (a), 2.B.MEL.2 (b) et 2.B.MEL.3 (c). T3? : tocotrienol probable.

Les résultats de la quantification, menée d'une manière identique à celle abordée en chapitres 1 et 2, des différents isomères de tocophérols sont mentionnés dans le tableau 54. Ils sont exprimés en milligrammes équivalents d'α-tocophérol par 100 grammes d'huile. Nous notons une différence significative, concernant la teneur et la proportion de l'α-tocophérol, entre le groupe des "mélanges" 1 (valeur moyenne de 33,47±5,60 mg/100 g avec une proportion de 55,34±4,47 %) et celui des "mélanges" 3 (valeur moyenne de 16,95±3,93 mg/100 g avec une proportion de 42,50±0,45 %, $p<0,05$).

Nous notons également la proportion assez importante ($p<0,05$) de γ-tocophérol des échantillons constituant le "mélange" 3 dont le degré de maturité est le plus élevé par rapport à ceux du "mélange" 1 considérés comme les plus immatures. De telles observations confortent encore une fois ce qui a été avancé dans les chapitres précédents militant en faveur d'une prédominance de l'α-tocophérol dans l'huile des fruits immature et de γ-tocophérol dans l'huile des fruits matures.

Il est important de relever que l'expérience sur des échantillons "mélanges" dont le degré de maturité est déterminé à la fois selon la couleur du fruit et la date de sa cueillette est plus informatif sur la variation de la teneur et la proportion de chaque isomère ainsi que la teneur des tocophérols totaux en fonction de la progression de la maturation que dans le cas où seule la couleur du fruit est utilisée comme indicateur.

δ-Toc est détecté dans toutes les huiles testées mais toujours à des proportions faibles appuyant les précédentes observations.

Les résultats obtenus avec ces échantillons"mélanges" donnent encore une fois de la valeur à leur aspect original. Nous rappelons que c'est la première fois où la variation de la teneur et de la proportion de chaque isomère selon le stade de maturation des fruits de *Pistacia atlantica* est rapportée. De plus, c'est la première fois qu'une analyse par une colonne de silice est réalisée pour ces échantillons.

Tableau 54 : Teneurs en tocophérols totaux et individuels et pourcentages des isomères dans les huiles des fruits "mélanges" de *Pistacia atlantica* (respectivement en mg EE/100g H et en %).

Ech	**4.G.MEL.1**	**4.G.MEL.2**	**6.H.MEL.1**	**6.H.MEL.2**	**6.H.MEL.3**	**2.B.MEL.1**	**2.B.MEL.2**	**2.B.MEL.3**
α-Toc	27	13,38	36,9	20,03	12,47	36,50	27,43	19,73
γ-Toc	17,29	16,26	33,78	17,85	14,41	25,98	20,15	24,31
δ-Toc	1,62	1,66	2,38	1,7	8,98	2,23	1,66	1,81
Total	**45,91**	**31,3**	**73,06**	**39,58**	**35,86**	**64,71**	**49,24**	**45,85**
Pourcentages des différents isomères constitutifs (%)								
α-Toc	59,31	43,45	50,51	51,01	34,57	56,21	55,81	42,81
γ-Toc	37,96	52,73	45,08	45,66	40,18	40,14	41,22	53,02
δ-Toc	2,73	3,82	4,41	3,33	25,25	3,65	2,97	4,17
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**

	Moyenne des teneurs pour "mélanges" 1	**Moyenne des teneurs pour "mélanges" 2**	**Moyenne des teneurs pour "mélanges" 3**
α-Toc	33,47±5,60*	20,28±7,03	16,95±3,93
γ-Toc	25,68±8,25	18,09±1,96	21,24±4,35
δ-Toc	2,08±0,40	1,67±0,02	1,54±0,38
Total	61,23±13,91	40,04±8,98	39,73±8,66
Pourcentages moyens des différents isomères constitutifs (%)			
	"mélanges" 1	**"mélanges" 2**	**"mélanges" 3**
α-Toc	55,34±4,47*	50,09±6,23	42,50±0,45
γ-Toc	41,06±3,65	46,54±5,80	53,54±0,73¤
δ-Toc	3,60±0,84	3,38±0,42	3,97±0,28
Total	**100,00**	**100,00**	**100,00**

EE : Equivalents vitamine E, **p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons "mélange" 3). ¤ *p<0,05* (comparés par rapport aux échantillons "mélange" 1).

4. Pouvoir antioxydant des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*

4.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH

Ce test a été effectué pour l'ensemble des échantillons. Nous présentons dans les figures 66, 67 et 68 la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile pour les échantillons "mélanges".

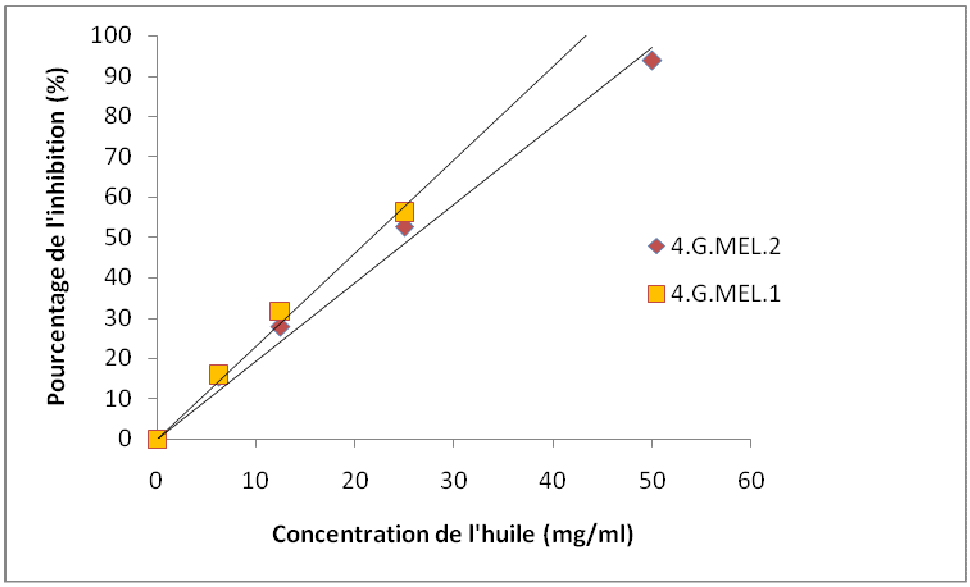


Figure 66 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélanges" de l'arbre (G).

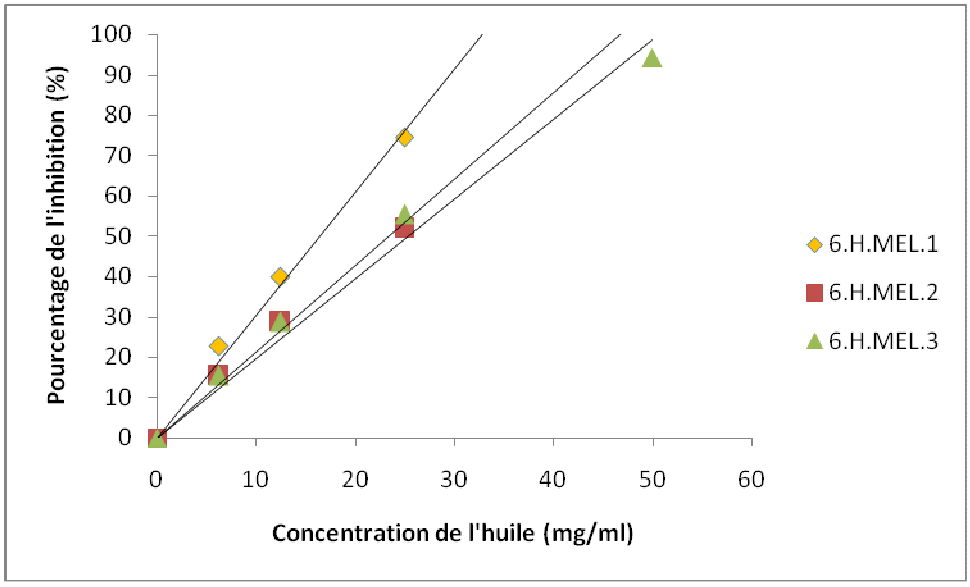


Figure 67 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélanges" de l'arbre (H).

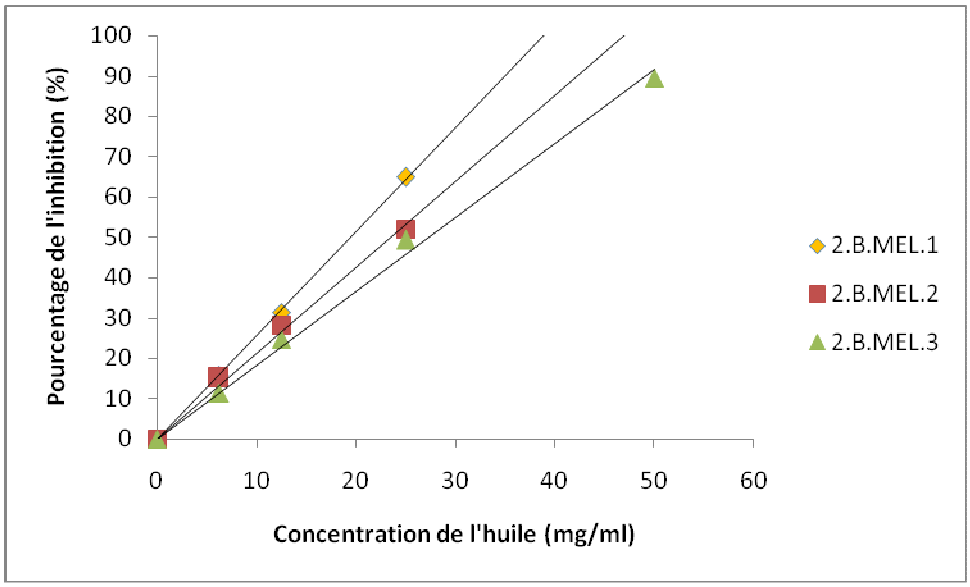


Figure 68 : Activité antioxydante des huiles des fruits "mélanges" de l'arbre (B).

D'après ces représentations graphiques, il est évident que le pouvoir antioxydant des extraits lipidiques diminue au fur et à mesure que la maturation des fruits progresse. Les valeurs de l'EC_{50} calculées pour l'ensemble des échantillons sont exposées dans le tableau 55. Le test de Student indique que la différence de l'activité antioxydante entre les deux groupes matures et immatures mentionnée dans le tableau est significative ($p<0,05$). Par contre, elle ne l'est pas entre "mélange 1" et "mélange 2". Ceci serait dû aux mêmes raisons que pour les tocophérols. Ainsi, ici aussi, les huiles des fruits verts sont plus actives que celles des fruits noires.

Pour les échantillons "mélanges", la diminution de l'activité antiradicalaire en fonction de l'ordre chronologique de la cueillette est évidente pour les fruits issus des trois arbres. Ainsi les fruits seraient dotés d'activité antioxydante plus prononcée qu'ils sont cueillis précocement.

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux présentés précédemment concernant les cueillettes de 2009 et de 2011. Nous constatons également que les intervalles où se situe l'EC_{50} pour l'ensemble des échantillons (2009, 2011 et 2013) ne varient que légèrement indiquant une reproductibilité des résultats.

Tableau 55 : Valeurs de l'EC_{50} des huiles des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons		**EC_{50} (mg/ml)**	**Moyennes (mg/ml)**
Immature	4.G.RC.1 4.G.RC.2 2.B.RC.1 2.B.RC.2 2.B.RC.3	21,79 24,49 15,54 17,29 22,08	20,24±3,70*
Maturité intermédiaire	2.B.RF.1 2.B.RF.2 2.B.RF.3	22,49 26,67 27,37	25,51±2,64
Mature	4.G.N.1 4.G.N.2 2.B.V.1 2.B.V.2 2.B.V.3	29,07 38,53 23,02 27,87 34,15	30,53±5,97
Echantillons "mélanges"			
Arbre G	4.G.MEL.1 4.G.MEL.2	21,93 24,86	Moyenne Mél 1 19,25±2,73
Arbre H	6.H.MEL.1 6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	16,48 23,15 24,4	Moyenne Mél 2 23,80±0,93
Arbre B	2.B.MEL.1 2.B.MEL.2 2.B.MEL.3	19,35 23,38 27,24	Moyenne Mél 3 25,82±2,01

*$p<0,05$ (comparés par rapport aux échantillons matures).

4.2. Evaluation du pouvoir réducteur par le test au Molybdate Phosphate.

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par le test DPPH, nous avons mené des essais par le test au Molybdate Phosphate et ce en vue d'estimer le pouvoir réducteur de nos échantillons. Ce test, pour des contraintes expérimentales, n'a pu être effectué que pour des échantillons représentatifs. Les résultats exprimés en capacité équivalente de la vitamine E (mg/g d'huile) sont présentés dans le tableau 56. Nous remarquons globalement que la capacité équivalente diminue en fonction de la maturation c'est-à-dire selon à la fois la couleur du fruit et la date de sa cueillette. Les fruits de l'arbre (G) semble avoir l'activité la plus basse par rapport aux autres arbres. Nous avons déjà discuté les résultats relatifs à l'activité antioxydante par rapport à la littérature dans le chapitre précédent.

Tableau 56 : Pouvoir réducteur (exprimé en capacité équivalente) déterminé pour des échantillons représentatifs.

Echantillons		**Capacité équivalente (mg vit E/g d'H)**	**Valeurs moyennes (mg vit E/g d'H)**
Immature	4.G.RC.2 2.B.RC.3	9,79 12,24	11,02±1,73
Maturité intermédiaire	2.B.RF.2 2.B.RF.3	9,42 8,03	8,73±0,98
Mature	4.G.N.1 4.G.N.2 2.B.V.1 2.B.V.3	5,90 4,39 8,02 9,11	6,86±2,12
Echantillons "mélanges"			
Arbre G	4.G.MEL.1 4.G.MEL.2	8,80 8,67	Moyenne Mél 1 8,80 Moyenne Mél 2 9,55±1,24 Moyenne Mél 3 6,59±2,31
Arbre H	6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	10,43 8,22	
Arbre B	2.B.MEL.3	4,96	

4.3. Régressions linéaires entre teneurs en tocophérols et pouvoir antioxydant

Nous avons établi des régressions linéaires entre les paramètres sus indiqués afin de déceler d'éventuelles relations fonctionnelles. Nous nous sommes basés sur les résultats de l'analyse des tocophérols par CLHP qui n'a concerné que les échantillons "mélanges". Les représentations graphiques mentionnées dans la figure 69 montre l'aspect du nuage de point, quoique limité. Nous nous sommes contentés de présenter les régressions entre EC_{50} et, respectivement, teneur en tocophérols et teneur en α-tocophérol.

Nous remarquons une très forte corrélation négatives entre l'activité antioxydante exprimée par l'EC_{50} et la teneur en tocophérols (totaux et α-tocophérol). Les coefficients de corrélation sont identiques (-0,83). Encore une fois, il semble que les échantillons "mélanges" indique mieux le degré de maturité (couleur et date de la cueillette) que la couleur seule. En effet, nous avons trouvé un coefficient de corrélation de -0,56 pour l'α-tocophérol dans le chapitre 2. Etant donné qu'il est doté d'importantes activités antioxydantes **(Hussain *et al.*, 2013)**, son rôle dans l'activité antioxydante de l'huile serait considérable.

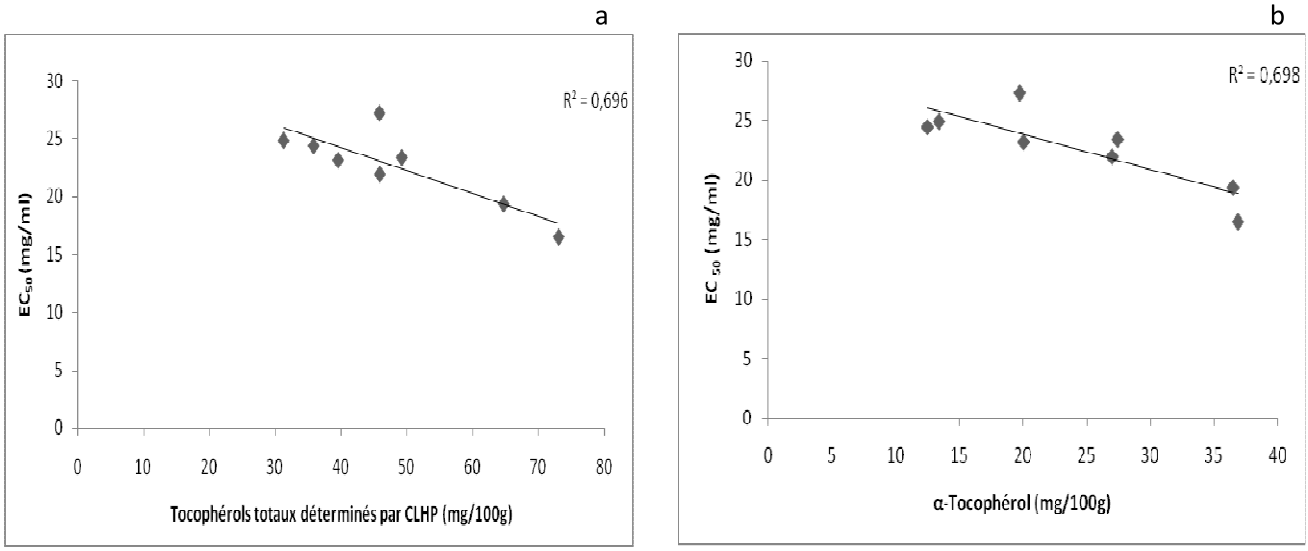


Figure 69 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminée par CLHP (a) et la teneur de l'α-Toc (b) de l'autre part.

5. Etude de cinq échantillons d'huiles groupées sans et après extraction des composés phénoliques

Etant donné la nature hydrosoluble des composés phénoliques et donc leur taux très faible dans l'huile, nous avons été contraints de grouper les huiles les plus proches (Tableau 9 dans le chapitre matériel et méthodes) afin d'augmenter le rendement d'extraction. Nous avons testé le pouvoir antioxydant des huiles groupées avant et après extraction des composés phénoliques. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 57. Nous remarquons avec intérêt des différences notables en ce qui concerne l'activité antioxydante. En effet, cette dernière se voit diminuer après l'extraction des polyphénols indiquant qu'elle serait due à la fois à la présence de tocophérols et de composés phénoliques et, peut être, d'autres composés. Nous relevons également que la variation des paramètres étudiés selon le degré de maturité reste inchangée avant et après extractions des polyphénols (Tableau 57).

Les résultats obtenus avec cette série d'expériences confirment en partie ce qui a été obtenu pour la première série (21 échantillons) notamment en ce qui concerne les fruits de couleur noire (I et II) et ceux de couleur verte (III et IV).

Tableau 57 : Activités antioxydantes des huiles sans et après extraction des composés phénoliques.

Echantillons	**Activités antioxydantes des huiles brutes (sans extraction phénolique)**		**Activités antioxydantes des huiles après extraction phénolique**	
	EC_{50} (mg/ml)	**Capacité équivalente (mg vit E/g d'H)**	**EC_{50} (mg/ml)**	**Capacité équivalente (mg vit E/g d'H)**
I (Immature)	20,33	13,01	22,66	8,83
I (mature)	21,73	5,63	26,53	4,38
III (immature)	19,69	15,30	22,24	10,17
IV (mature)	21,22	7,14	25,45	5,26
V (mélange)	19,75	7,45	22,97	3,77
Moyenne immature	20,01±0,45	14,16±1,62	22,45±0,30*	9,50±0,95
Moyenne mature	21,48±0,36	6,39±1,07	25,99±0,76*	4,82±0,62

*$p<0,05$ (comparés par rapport aux échantillons sans extraction phénolique).

6. Extraction, dosage et activités antioxydantes des composés phénoliques à partir des échantillons groupés d'huiles de *Pistacia atlantica*

Nous avons extrait des composés phénoliques à partir des cinq échantillons d'huiles groupées. Le rendement de l'extraction, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont récapitulés dans le tableau 58. Nous relevons que la masse de l'extrait phénolique obtenu est assez appréciable vu sa nature hydrosoluble. Elle varie selon, notamment, le degré de maturation. En effet, les rendements les plus élevés sont obtenus avec les huiles groupées d'échantillons immatures.

Tableau 58 : Récapitulatif des résultats obtenus pour les extraits phénoliques à partir des échantillons des huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons des huiles groupées	**Masse de l'huile (g)**	**Masse de l'extrait phénolique brut (g)**	**Rendement de l'extraction phénolique (%) (m/m)**	**Teneurs en phénols totaux (mg EAG/kg d'H)**	**Teneurs en Flavonoïdes (mg ER/kg d'H)**	**Proportion des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)**
I (Immature)	31,13	0,313	1	73	16	21,9
I (mature)	25,27	0,182	0,72	65	15	23,07
III (immature)	22,74	0,261	1,15	178	35	19,66
IV (mature)	26,39	0,086	0,32	45	11	24,44
V (mélange)	38,88	0,141	0,36	19	6	31,57
Moyenne immature	26,94±5,93	0,29±0,04	1,08±0,11	125,5±74,25	25,5±13,44	20,78±1,58
Moyenne mature	25,83±0,79	0,13±0,07	0,52±0,28	55±14,14	13±2,83	23,76±0,97

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, H : Huile.

Dans la littérature, il n'y a que Saber-Tehrani et ses collaborateurs (2013) qui ont rapporté la présence de composés phénoliques dans l'huile de ces fruits. A notre connaissance, c'est la première fois qu'on s'intéresse à leur variation, dans les huiles, selon le degré de maturation des fruits, ce qui donne un caractère très original à notre travail.

Il est capital de relever que la variation en teneurs de phénols totaux est fortement liée au degré de maturation. En effet, les deux échantillons immatures contiennent plus de polyphénols par à rapport aux échantillons matures. Cette variation n'est pas évidente pour les flavonoïdes (Tableau 58 et figure 70). Cette observation rime parfaitement avec ce qui a été observé pour les tourteaux. Les échantillons immatures pourraient contenir d'autres composés phénoliques différents des flavonoides.

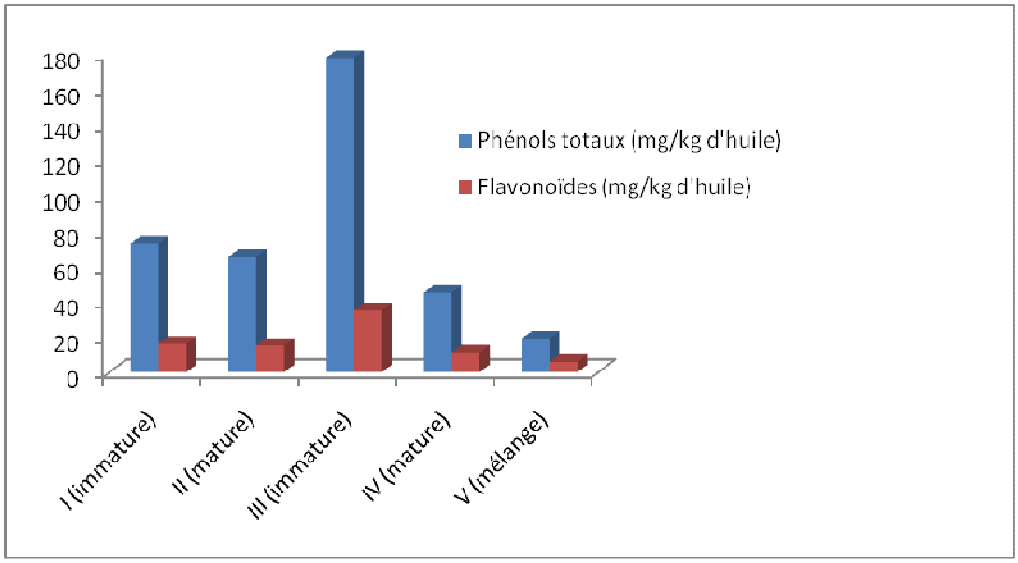


Figure 70 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*.

Les données sur les polyphénols dans l'huile rapportées par la littérature concernent surtout l'huile d'olive. En effet, leur teneur serait environs 400 mg/Kg d'huile **(Nakbi *et al.*, 2010)**.

L'étude de l'activité antioxydante (par DPPH et Molybdate Phosphate) de ces extraits montre qu'elle est assez prononcée, notamment, pour les fruits immatures (Figure 71 et tableau 59), ce qui est en parfait accord avec les résultats obtenus pour les huiles.

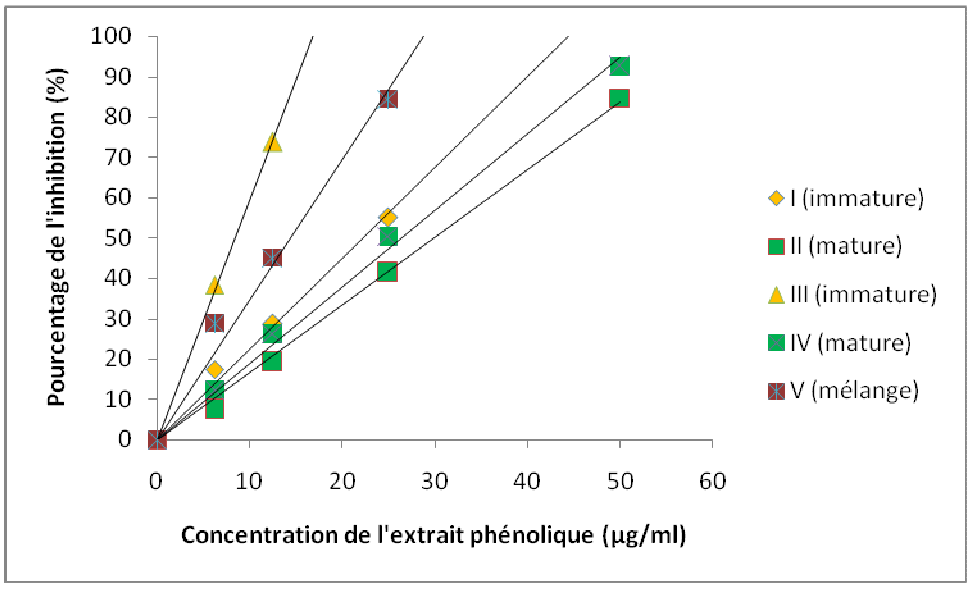


Figure 71 : Variation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des huiles groupées selon le degré de maturation des fruits de *Pistacia atlantica*.

Tableau 59 : Activités antioxydantes (DPPH et Molybdate Phosphate) des extraits phénoliques des huiles groupées des fruits de *Pistacia atlantica*.

Echantillons	**EC_{50} (µg/ml)**	**Capacité équivalente (mg vit E/g d'H)**
I (Immature)	22	13,57
I (mature)	30	4,30
III (immature)	8	21,99
IV (mature)	26	10,99
V (mélange)	14,4	12,27
Moyenne immature	15±9,9	17,78±5,95
Moyenne mature	28±2,83	7,65±4,73

Les régressions linéaires (Figure 72) montrent que les phénols totaux et les flavonoïdes pourraient être impliqués d'une manière plus évidente dans le pouvoir réducteur que dans l'activité antiradicalaire. En effet, les coefficients de corrélation sont respectivement 0,72 et 0,70 dans le premier cas et -0,55 et -0,55 dans le deuxième cas. Etant donné le nombre restreint d'échantillons testés, ces constatations restent à vérifier.

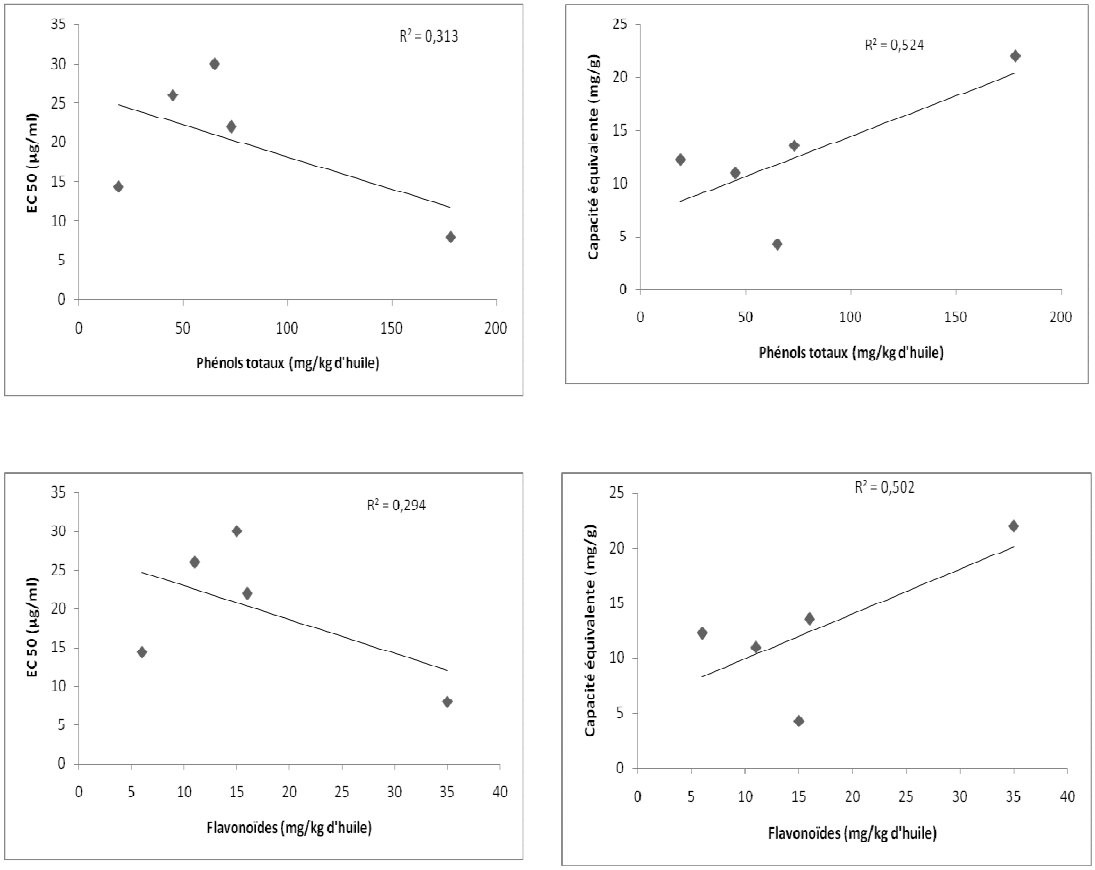


Figure 72 : Régressions linéaires entre, d'une part, activité antioxydante (DPPH et Molybdate Phosphate) et, respectivement, teneurs en phénols totaux (en haut) et teneurs en flavonoïdes (en bas), de l'autre part, pour les extraits phénoliques des huiles groupées.

7. Dosage et activités antioxydantes des extraits phénoliques à partir des tourteaux

Pour cette partie, nous avons travaillé uniquement sur les fruits issus des arbres (B) et (H). Ainsi, nous avons 9 échantillons de maturité différente (selon la couleur) et 6 échantillons "mélanges". Les caractéristiques de ces fruits sont présentées dans le chapitre matériel et méthodes.

Les résultats du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes sont présentés dans les tableaux 60 et 61 ainsi que la figure 73. Nous insistons sur le fait que nous n'avons pas atteint l'épuisement lors de l'extraction. De ce fait, nous ne discutons pas le rendement.

Tableau 60 : Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons de tourteaux testés.

Echantillon		**Masse de l'extrait phénolique (g)**	**Phénols totaux (mg EAG/g MS)**	**Flavonoïdes (mg ER/g MS)**	**Proportion de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)**
Immature	2.B.RC.1 2.B.RC.2 2.B.RC.3	0,6761 0,4293 0,3987	82,28 71,66 54,26	17,1 14,1 13,13	20,78 19,68 24,20
Moyenne		0,50±0,15	69,40±14,15*	14,78±2,07	21,55±2,36*
Maturité intermédiaire	2.B.RF.1 2.B.RF.2 2.B.RF.3	0,6506 0,5319 0,5536	61,27 50,8 42,27	12,44 13,23 12,84	20,30 26,04 30,38
Moyenne		0,58±0,06	51,45±9,52	12,84±0,40	25,57±5,25
Mature	2.B.V.1 2.B.V.2 2.B.V.3	0,336 0,49 0,3	36,74 24,69 18,68	11,93 13,75 10,39	32,47 55,69 55,62
Moyenne		0,38±0,10	26,7±9,20	12,02±1,68	47,93±13,39

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche. *$p<0,05$ (comparés par rapport aux échantillons matures).

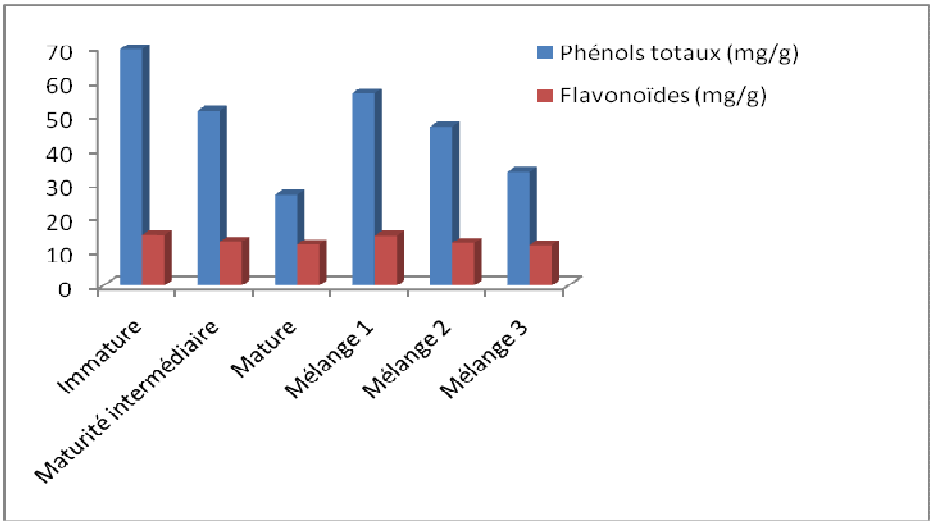


Figure 73 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les tourteaux des fruits de *Pistacia atlantica*.

Tableau 61 : Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons de tourteaux des fruits "mélanges" testés.

Echantillon		**Masse de l'extrait phénolique (g)**	**Phénols totaux (mg EAG/g MS)**	**Flavonoïdes (mg ER/g MS)**	**Proportion de flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)**
Arbre H	6.H.MEL.1 6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	0,550 0,385 0,394	59,74 47,19 35,4	13,82 12,51 12,05	28,76 26,51 34,04
Arbre B	2.B.MEL.1 2.B.MEL.2 2.B.MEL.3	0,762 0,410 0,509	53,23 46,01 31,35	15,31 12,44 11,58	23,13 27,04 36,94
Moyenne Mél 1		0,66±0,15	56,49±4,60*	14,57±1,05	25,95 ±3,98
Moyenne Mél 2		0,41±0,04	46,60±0,83	12,48±0,05	26,77±0,37
Moyenne Mél 3		0,45±0,08	33,38±2,86	11,82±0,33	35,49±2,05

EAG : Equivalents acide gallique, ER : Equivalents rutine, MS : Matière sèche. *$p<0,05$* (comparés par rapport à "mélange" 3).

Nous notons avec intérêt une différence significative ($p<0,05$) entre les échantillons immature et mature en ce qui concerne les phénols totaux. La même constatation entre les échantillons "mélanges" cueillis à la mi-août (mélange 1) et ceux cueillis un mois plus tard ("mélange" 3). Ceci pourrait être expliqué par la composition de ces "mélanges" caractérisés par une proportion élevée en fruits immatures pour les "mélanges" 1 et en fruits matures pour les "mélanges" 3.

En dépit du nombre restreint des échantillons testés pour chaque groupe, nous remarquons une étendue (différence entre la plus grande valeur et la plus petite) plus large pour les échantillons triés (immature, intermédiaire et mature) par rapport aux groupes des "mélanges" notamment pour les phénols totaux (Tableaux 60 et 61). Ceci pourrait rendre compte de l'hétérogénéité des fruits triés dans chaque groupe. Nous rappelons que le tri a été effectué selon la couleur du fruit quelque soit la date de la récolte. Il ressort de ces données que la date de cueillette serait aussi informative du degré de maturation que la couleur du fruit. Un tel constat est étayé par l'écart

considérable, particulièrement pour les polyphénols totaux, entre les fruits triés selon la couleur (immature, intermédiaire et mature) de la première récolte et leurs pairs de la dernière un mois plus tard.

Comme nous l'avons détaillé en chapitre 1 et chapitre 2, la variation des quantités des flavonoïdes n'est que légère. D'autres composés phénoliques semblent être impliqués dans la variation des teneurs en phénols totaux. Pour ce chapitre, nous n'avons pas fait des analyse par CLHP concernant les extraits phénoliques. Seuls des procédés expérimentaux performants tels que la CLHP couplée à la spectrométrie de masse sont à même de mettre en évidence la plupart des composés phénoliques.

Nous avions déjà discuté les résultats relatifs aux composés phénoliques par rapport à la littérature dans les chapitres précédents.

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante (par le test au DPPH) de nos éxtraits phénoliques sont résumés dans la figure 74 (échantillons "mélanges") et le tableau 62. En dépit de la grande étendue au sein de chaque groupe en particulier les fruits triés, nous notons une différence significative ($p<0,05$) selon le degré de maturation, ce qui confirme ce que nous avons rapporté en chapitre 1.

Il y a lieu d'indiquer que tous les échantillons testés se sont montrés moins actifs que l'antioxydant de référence la Vitamine C (déjà discuté en chapitre 1)

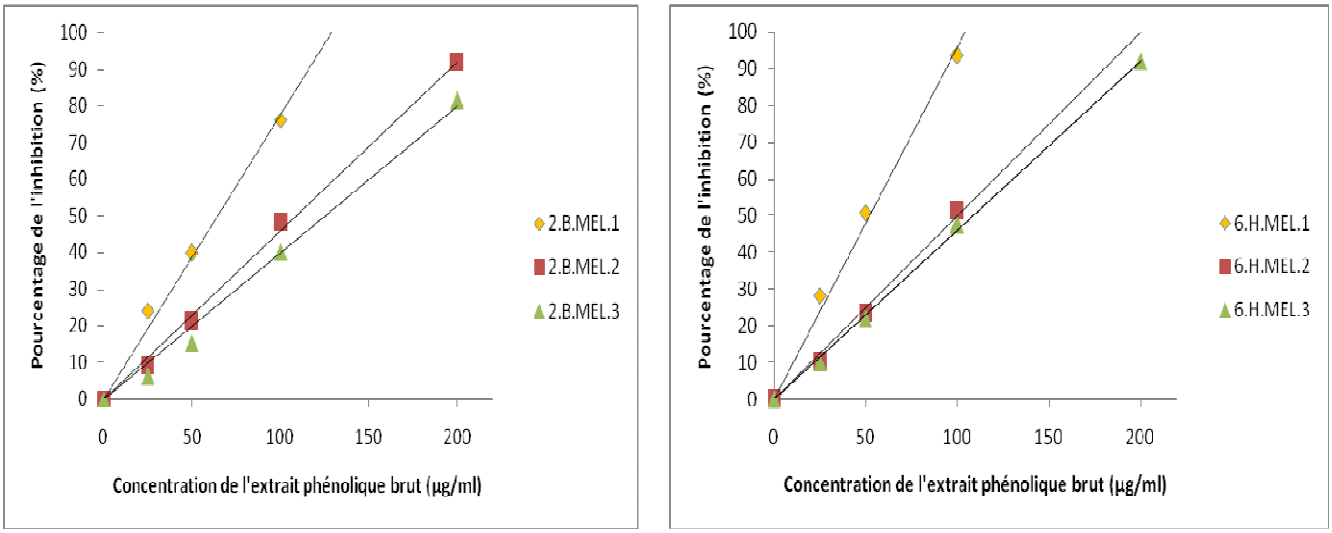


Figure 74 : Variation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux selon le degré de maturation des fruits de l'arbre (B), à gauche, et ceux de l'arbre (H), à droite.

Tableau 62 : Activité antioxydante (par le test au DPPH) exprimée en EC_{50} pour les différents échantillons testés.

Echantillon		**EC_{50} (µg/ml)**	**Moyenne (µg/ml)**
Immature	2.B.RC.1 2.B.RC.2 2.B.RC.3	12,50 27,41 40,68	26,86±14,10*[1]
Maturité intermédiaire	2.B.RF.1 2.B.RF.2 2.B.RF.3	36,10 23,76 135,19	65,02±61,08
Mature	2.B.V.1 2.B.V.2 2.B.V.3	99,85 120,00 187,27	135,71±45,78
Echantillons "mélanges"			
Arbre H	6.H.MEL.1 6.H.MEL.2 6.H.MEL.3	51,8 98,93 106,38	<u>Moyenne Mél 1</u> 58,05±8,83*[2] <u>Moyenne Mél 2</u> 103,40±6,32 <u>Moyenne Mél 3</u> 117,29±15,43
Arbre B	2.B.MEL.1 2.B.MEL.2 2.B.MEL.3	64,29 107,87 128,2	

*[1]$p<0,05$ (comparés par rapport aux échantillons matures). *[2]$p<0,05$ (comparés par rapport à "mélange" 3).

Les régressions linéaires (Figure 75) indiquent une corrélation négative assez appréciable entre l'EC_{50} et les composés phénoliques (-0,88 pour les phénols totaux et -0,69 pour les flavonoïdes). C'est tout à fait logique étant donné que les valeurs d'EC_{50} sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante. Ces résultats montrent clairement l'implication des composés phénoliques dans l'activité antioxydante des extraits des fruits de *Pistacia atlantica*. Néanmoins, d'autres composés seraient également impliqués. Leur identification requerrait des procédés techniques perfectionnés.

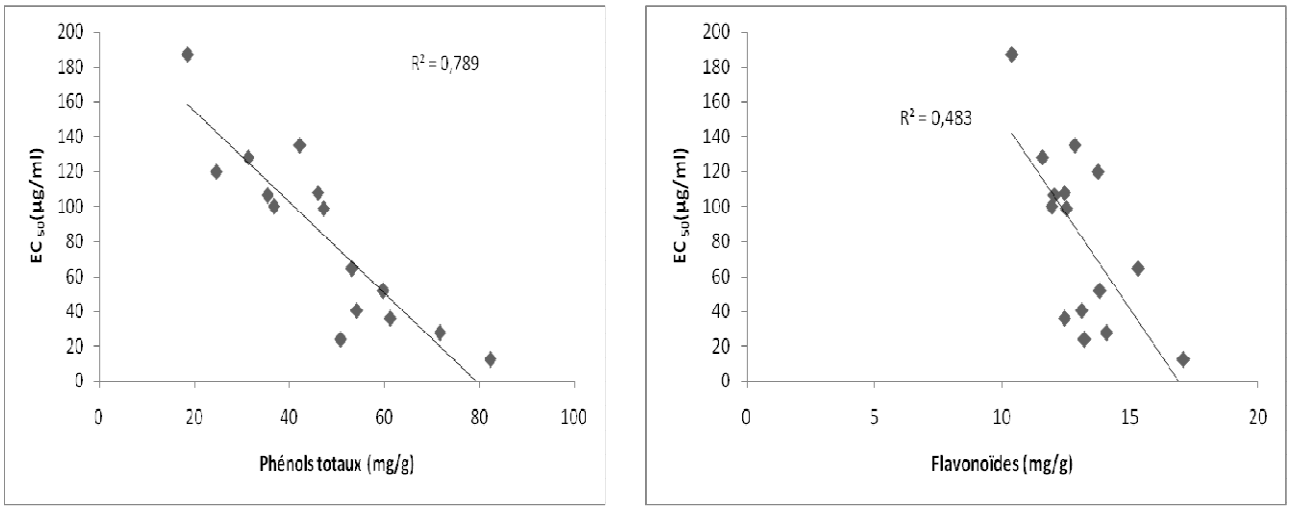


Figure 75 : Régression linéaire entre, d'une part, activité antioxydante (DPPH) et, respectivement, teneurs en phénols totaux (à gauche) et teneurs en flavonoïdes (à droite), de l'autre part, pour les extraits phénoliques des tourteaux.

De tout ce qui a été discuté, nous pouvons dire que les fruits de *Pistacia atlantica* pourraient constituer une source importante d'antioxydants naturels pouvant être utiles pour diverses applications.

Discussion générale

Discussion générale

Nous avons présenté les résultats de plusieurs expériences effectuées sur des échantillons de fruits de *Pistacia atlantica* différents en ce qui concerne la position géographique de l'arbre, le degré de maturation et la saison de récolte.

Les résultats extrêmement importants obtenus pour les huiles des fruits de la première cueillette (2009) ont été à la base des démarches expérimentales suivantes. Ainsi, nous avons inclus l'étude des tourteaux (chose qui n'était pas prévue au départ) et nous avons également adapté le choix du matériel biologique d'étude (les fruits) en fonction des résultats antérieurs. De ce fait, nous avons effectué d'autres cueillettes en 2011 et en 2013.

Vu la quantité d'information cumulée, nous avons présenté les résultats en trois chapitres complémentaires où chacun se limite à la récolte d'une saison. Dans le présent chapitre, nous discutons d'une manière globale l'ensemble des résultats obtenus. Pour ce faire, nous commençons par ceux relatifs aux huiles avant de passer à ceux concernant les tourteaux et en dernier lieu, nous cherchons d'éventuelles relations entre eux.

1. Résultats relatifs à l'huile pour l'ensemble des fruits cueillis

Le rendement d'extraction de l'huile varie considérablement selon la couleur du fruit considérée comme indicateur du degré de maturation. Les fruits noirs et les fruits verts considérés comme matures avaient un rendement nettement supérieur par rapport à ceux de couleur rouge claire. Nous avons noté le rendement d'extraction de l'huile des fruits de couleur rouge foncée (considérés comme des fruits à maturité moyenne) qui est pratiquement intermédiaire. Nous avons également noté avec intérêt l'augmentation de la teneur en huile au sein de la même catégorie (même couleur) issue du même arbre selon l'ordre chronologique des cueillettes (Tableau 52). Il semble que l'augmentation de la teneur en huile est fonction à la fois de la couleur du fruit et la date de sa cueillette. Ces deux paramètres associés semblent être de bons indicateurs du degré de maturation du fruit.

L'analyse des acides gras constitutifs de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* par CPG a été réalisée en mode isotherme, ce qui a permis une meilleure séparation par rapport au programme de variation de la température.

La composition en acides gras varie considérablement selon la couleur du fruit qui indique, en grande partie, son degré de maturation. En effet, nous avons remarqué une diminution de la proportion de l'acide palmitique associée à une augmentation de celle de l'acide linoléique en fonction de la maturation du fruit (coefficient de la corrélation négative -0,74). Nous relevons aussi une légère variation pour ces deux acides gras entre les fruits de même couleur et du même arbre cueillis à un mois d'intervalle (Tableau 43).

Les trois acides gras majoritaires dans l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* sont l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide palmitique lesquels entrent dans la composition de la plupart des triacylglycérols de cette huile **(Yousfi *et al.*, 2005)**.

Les indices chimiques présentés au chapitre 2 et en particulier l'indice d'iode sont en accord avec les résultats de l'analyse par CPG des acides gras.

La fraction insaponifiable semble être très importante dans les huiles des fruits rouges par rapport à celle des fruits verts ou noirs et son taux semble diminuer en fonction de la maturation. Nous avons trouvé que ce taux est presque six fois plus important dans l'huile d'un fruit rouge par rapport à celle issue d'un fruit vert. Ce résultat est corroboré par les différences notables concernant la teneur en stérols totaux, en tocophérols totaux et individuels entre ces deux groupes. La variation de la composition de cette fraction au cours de la maturation des fruits mérite d'être étudiée.

Le dosage colorimétrique des stérols totaux, qui n'a été réalisé que pour douze échantillons (saison 2011), a révélé les mêmes variations entre les deux groupes principaux (mature et immature). Il nous a été impossible de mener une CPG pour l'analyse de la variation des phytostérols constitutifs. Le Pr Yousfi et ses collaborateurs avaient rapporté la très grande prédominance de β-Sitostérol (87 %) parmi les phytostérols de l'huile de fruits matures **(Yousfi *et al.*, 2002)**.

Le dosage colorimétrique des tocophérols totaux a abouti, lui aussi, aux mêmes différences. La variation de ce paramètre en fonction de la maturation (couleur du fruit et le moment de sa cueillette) est évidente notamment pour les fruits cueillis en 2011 et ceux de 2013. L'analyse selon la couleur du fruit a conduit à des séries avec des étendues larges apparentes dans les écart-types élevés, ce qui montre que la couleur du fruit, bien qu'elle soit indicatrice en grande partie du degré de sa

maturation, mais elle n'en est pas la seule. La date de cueillette est un autre paramètre à prendre en considération, ce qui justifie l'étude des échantillons non triés ou "mélanges". Nous avons également rapporté que la teneur en tocophérols totaux est plus marquée au niveau des huiles des fruits verts (tout au long du processus de maturation) par rapport à celle des fruits noirs.

Dans le but d'une analyse plus fine des tocophérols et étant donné leur rôle important dans l'activité antioxydante, nous les avons analysés par CLHP en utilisant une colonne polaire de silice. Les résultats obtenus sont extrêmement intéressants où nous avons noté une variation tant au niveau de la teneur des différents isomères qu'au niveau de leurs proportions. La teneur en tocophérols (totaux et individuels) est significativement substantielle dans l'huile des fruits immatures et elle diminue en fonction de leur maturation (couleur et ordre chronologique). La proportion des différents isomères change aussi où nous avons noté avec intérêt, d'une manière globale, le passage d'une prédominance de l'α-tocophérol dans les huiles des fruits immatures à celle de γ-tocophérol dans l'huile des fruits matures. Il a été rapporté dans la littérature que l'α-Toc est prédominant dans les feuilles alors que le γ-Toc prédomine dans les graines **(Hussain *et al.*, 2013)**. Nous n'avons pas trouvé de données concernant la variation, en fonction du stade de maturation, de la composition en tocophérols dans les fruits. Cependant, il a été rapporté que le phytol, lors de la dégradation de la chlorophylle, est recyclé et pourrait être impliqué dans la biosynthèse de γ-tocophérol au niveau des fruits **(Peisker *et al.*, 1989 ; Rise *et al.*, 1989 ; Doermann, 2007)**. L'analyse par les techniques de biologie moléculaire des enzymes clés impliquées dans la biosynthèse des tocophérols fournirait des données supplémentaires à ces informations.

Il est à relever que l'étendue des valeurs relatives aux tocophérols totaux déterminées par CLHP est moins large par rapport à celle des résultats du dosage colorimétrique révélant les limites de ce dernier où d'autres composés pourraient y interférer.

Nous n'avons pas pu identifier formellement les différents isomères de tocotriénols faute de disponibilité de standards de référence. Au demeurant, en comparant nos chromatogrammes avec ceux publiés pour d'autres huiles et sachant que les tocotriénols sont plus polaires que les tocophérols, nous avons tenté d'attribuer les

pics importants, non identifiés comme tocophérols, aux tocotriénols. La comparaison de nos différents profils chromatographiques indique une très probable variation de la teneur ainsi que de la proportion des isomères de tocotriénols. Ceci pourrait être le cas notamment pour l'α-tocotriénol dont la proportion pourrait augmenter avec la progression de la maturation. Les figures 63, 64 et 65 (chapitre 3) le montrent clairement. Nous avions déjà indiqué l'importance de ces composants dans le chapitre 2. Ainsi, leur étude et celle de leur variation au cours de la maturation des fruits pourraient être d'une importance capitale.

Nous avons rapporté en chapitre 1 (où la plus grande série de l'étude a été présentée), l'existence d'une corrélation positive appréciable (coefficient de corrélation 0,63) entre la proportion de l'acide linoléique (C18:2ω6) et la teneur en α-tocophérol. C'est extrêmement intéressant dans la mesure où α-tocophérol joue un rôle important dans la protection des acides gras insaturés contre la peroxydation lipidique **(Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996 ; Della Penna, 2005)**. L'acide linoléique, vu la présence de deux insaturations, y est fortement exposé. Hussain *et al.* (2013) ont proposé un modèle (Figure 76) qui pourrait expliquer cette relation. Ainsi, les tocophérols limitent l'expansion de la peroxydation lipidique par piégeage de radicaux peroxyle et probablement, en synergie avec les caroténoïdes, par un effet préventif en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène. Les interactions entre tocophérols, espèces réactives de l'oxygène et les phytohormones (acide jasmonique, acide salicylique, acide abscissique, éthylène) pourraient être impliquées dans un mécanisme de signalisation cellulaire. Ce dernier, qui n'est pas jusqu'à l'heure actuelle parfaitement élucidé, pourrait réguler directement ou indirectement l'expression de gènes codant pour les enzymes clés de la biosynthèse des tocophérols.

Il ne faut pas omettre le rôle de l'acide ascorbique et le glutathion dans la régénération des tocophérols à partir des radicaux tocophéroxyle.

La relation directe cause à effet entre une proportion élevée en acide gras polyinsaturés, dont l'acide linoléique est le plus important dans l'huile de fruits de *Pistacia atlantica*, et une teneur substantielle en tocophérols notamment l'α-tocophérol reste à clarifier davantage.

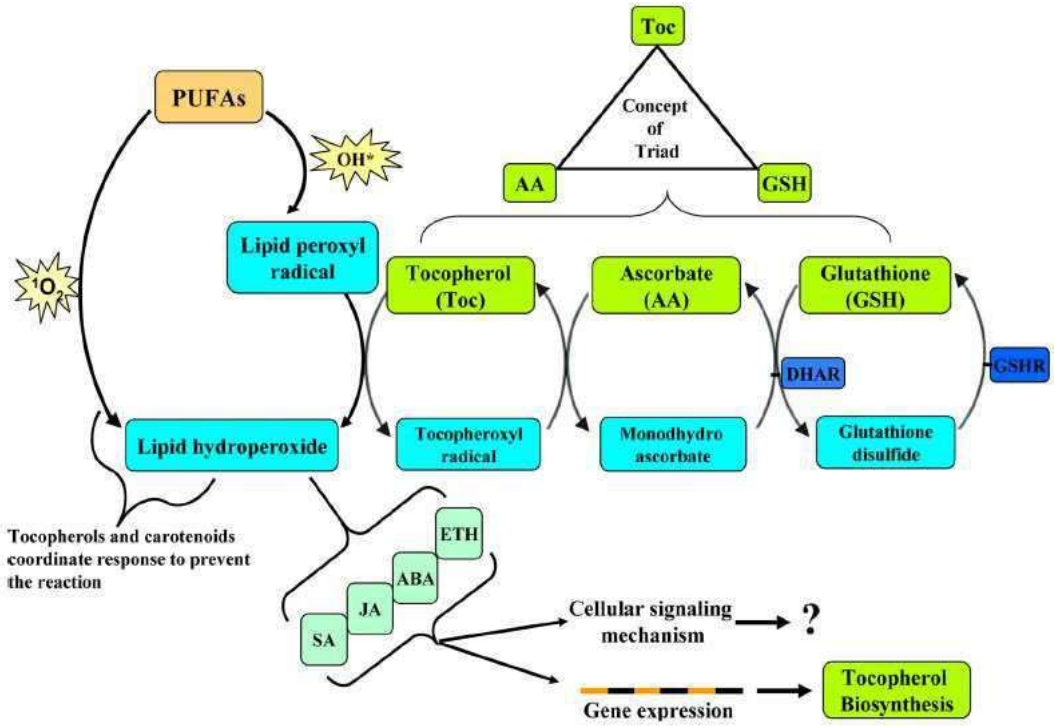


Figure 76 : Modèle proposé pouvant expliquer la relation entre les acides gras insaturés et les tocophérols **(Hussain *et al.*, 2013)**.

L'étude de l'activité antioxydante (par le test au DPPH notamment) des huiles extraites des fruits a montré que plus ces derniers sont matures moins leurs huiles sont actives. Comme nous l'avons noté pour la teneur en huiles et celle des tocophérols, nous avons noté pour l'EC_{50} des étendues larges pour le même groupe indiquant ici aussi que le degré de maturation pourrait être indiqué à la fois par la couleur du fruit et la date de sa cueillette. L'évaluation du pouvoir réducteur par le test au Molybdate Phosphate n'a été réalisée que pour des échantillons huileux représentatifs. A l'instar du test au DPPH, il a montré que l'huile des fruits immatures recèle le pouvoir le plus important.

Il est important de préciser que nous nous sommes contentés de ces deux tests de référence et nous n'avons pas fait des essais sur la cinétique des réactions car nous nous sommes intéressés en priorité à la variation de la composition des huiles selon le degré de maturation ainsi qu'aux composés phénoliques, lesquels n'étaient pas prévus au départ.

Il va sans dire que le pouvoir antioxydant de tout extrait naturel est déterminé par sa composition. Dans cette optique nous avons établi des régressions linéaires entre d'une part la teneur en tocophérols totaux (par CLHP) et celle en α-tocophérol et de l'autre part les valeurs de l'EC_{50} pour les échantillons de la saison 2009 qui sont les plus nombreux. Les résultats sont montrés dans la figure 77.

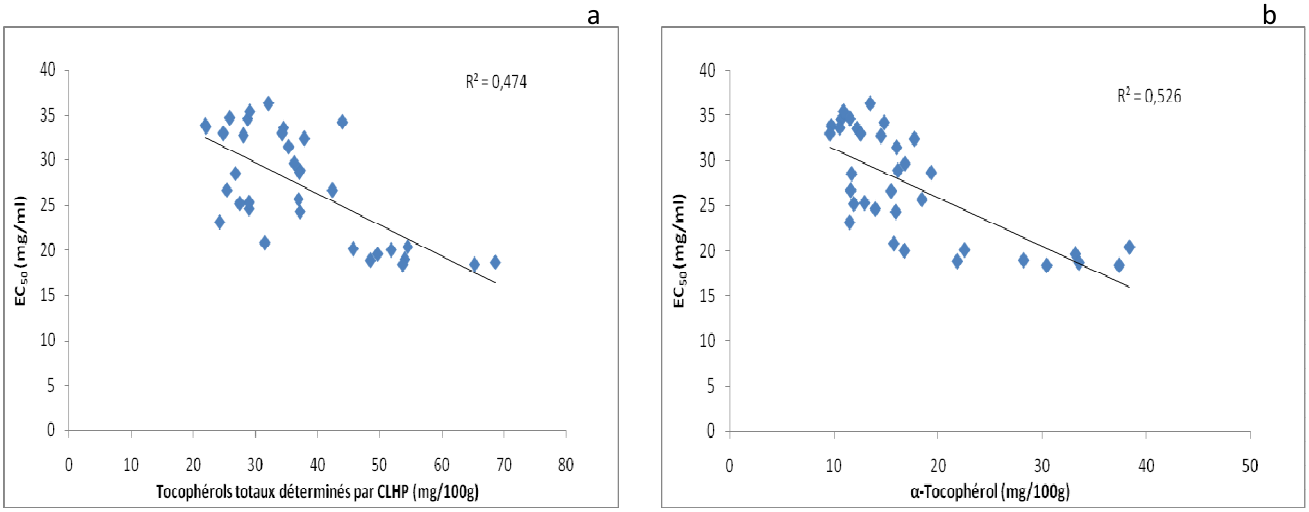


Figure 77 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en tocophérols totaux déterminée par CLHP (a) et la teneur de l'α-Toc (b), de l'autre part, pour 35 échantillons de la première série d'étude.

Nous notons une corrélation négative appréciable (-0,68) entre l'activité antioxydante et la teneur en tocophérols totaux et une corrélation négative plus prononcée (-0,72) entre la même activité et l' α-tocophérol. Ce résultat est consistant avec le pouvoir antioxydant des tocophérols notamment l'isomère alpha. Nous avons trouvé un coefficient de corrélation de -0,56 entre le pouvoir antioxydant et l' α-tocophérol pour les 12 échantillons de la séire 2 (saison 2011). Par contre, il est à -83 pour les échantillons de la série 3 (2013). Ceci rend compte de l'extrême compléxité de la composition en molécules dotées d'activités biologiques et leur probable variation d'une saison à une autre sous l'effet de facteurs climatiques tels que la température, l'indice UV ou de facteurs anthropiques.

Les résultats obtenus pour les échantillons de 2009 et de 2011 nous ont incités à rechercher l'éventuelle présence de composés phénoliques dans l'huile des fruits de

Pistacia atlantica. Selon les données disponible dans la littérature, il n'y a que l'huile d'olive qui a suscité un grand intérêt **(Nakbi *et al.*, 2010 ; Godoy-Caballero *et al.*, 2013 ; Becerra-Herrera *et al.*, 2014)**. Nos résultats ont montré la présence assez appréciable de composés phénoliques dont la teneur varie considérablement selon le degré de maturation des fruits dont est extraite l'huile. Nous avons en plus testé le pouvoir antioxydant de ces extraits phénoliques par les deux tests de références sus cités qui ont indiqué une activité assez importante. Ainsi, l'activité antioxydante de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* serait due à des composés différents à leur tête les tocophérols et les composés phénoliques. La variation, selon le degré de maturation, de la teneur et de l'activité des composés phénoliques est ainsi rapportée pour la première fois. D'autres analyses, notamment par CLHP, sont nécessaires pour déterminer la composition de ces composés phénoliques contenus dans l'huile.

Il est à relever en denier lieu qu'en dépit de quelques cas sporadiques, l'emplacement géographique de l'arbre ne semble pas avoir un effet déterminant sur la composition et l'activité de l'huile.

2. Résultats relatifs aux tourteaux pour l'ensemble des fruits cueillis

Les résultats que nous avons rapportés à travers les trois derniers chapitres sont extrêmement intéressants et dénotent d'une variation, aussi bien qualitative que quantitative, de la composition des composés phénoliques dans les tourteaux au cours de la maturation des fruits. En effet, la teneur en phénols totaux est très élevée dans les fruits immatures et elle diminue avec la maturation. Cependant, celle des flavonoïdes ne semble varier que légèrement, mais leur proportion par rapport aux phénols totaux l'est considérablement. Cette observation renseigne sur une très grande hétérogénéité de la composition phénolique et sa variation selon le degré de maturation. Le niveau des flavonoïdes est au plus bas dans les fruits matures de couleur noire. Cette différence concernant ces composés entre deux fruits matures de couleur différente mérite d'être explorée et analysée finement.

Comme nous l'avons indiqué pour les huiles, la couleur du fruit, en premier lieu, et la date de sa cueillette semblent être de bons indicateurs de son degré de maturation. Un tel constat est étayé par les différences de la teneur en phénols totaux observées au sein d'une même catégorie de couleur de fruits issus du même arbre mais cueillis à des

dates différentes. Le rôle de facteurs climatiques (température, indice UV,…) n'est pas à négliger notamment dans le cas d'étude sur plusieurs saisons.

L'activité antioxydante (par le test au DPPH) des extraits phénoliques bruts obtenus des tourteaux a été évaluée pour un bon nombre d'échantillons (dix-huit de la saison 2009 et quinze de la saison 2013). Nos résultats ont montré une diminution très importante de l'activité antioxydante, traduite par l'augmentation de l'EC_{50}, au fur et à mesure que la maturation des fruits progresse. Ceci semble être lié à la diminution de la charge en phénols totaux évoquée précédemment. La variation légère de la teneur en flavonoïdes plaide en faveur de la présence d'autres composés phénoliques qui seraient plus actifs. Nous avions présenté en chapitre 3 des régressions linéaires reliant l'EC_{50} à la teneur en phénols totaux et à celle des flavonoïdes (Figure 75). Nous avons trouvé les coefficients de la corrélation négative respectifs -088 et -069, ce qui conforte nos constations. Nous présentons dans cette section les mêmes régressions linéaires pour les dix-huit échantillons de la saison 2009. Les résultats sont montrés dans la figure 78. Nous constatons une corrélation négative très étroite (-0,96) entre la teneur des phénols totaux et les valeurs de l'EC_{50}. Par contre, elle est presque inexistante (0,07) entre la teneur des flavonoïdes et l'EC_{50}. Cette dernière observation est intrigante dans la mesure où les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir antioxydant. Nous pouvons expliquer ce cas particulier par la présence d'autres composés phénoliques plus puissants dont l'activité aurait masqué celle des flavonoïdes.

Les différences observées entre les coefficients de corrélation (reliant l'EC_{50} à la teneur des flavonoïdes) entre la saison 2009 et la saison 2013 plaident fortement en faveur d'un rôle influençant des facteurs climatiques, propres à chaque saison, dans la variation de la composition et l'activité des composés phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica.* L'impact de ces facteurs mérite une étude détaillée.

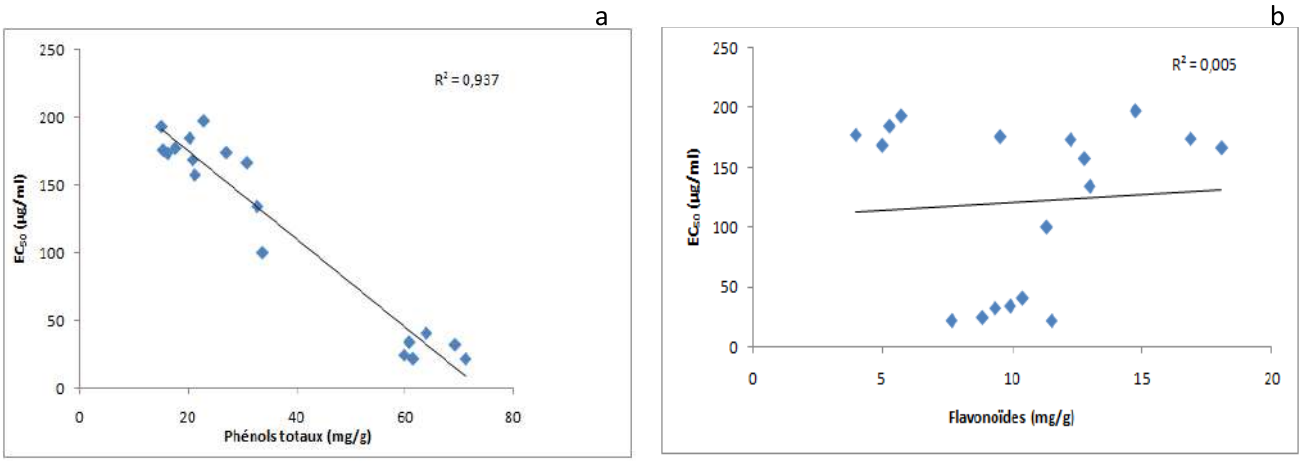


Figure 78 : Régression linéaire entre, d'une part, l'EC_{50} et, respectivement, la teneur en phénols totaux (a) et la teneur des flavonoïdes (b), de l'autre part, pour 18 échantillons de la première série d'étude.

Concernant l'emplacement géographique des arbres, nous avons relevé quelques différences entre la région de Laghouat et celle d'Ain Ouassara mais avec une ampleur beaucoup moins prononcée par rapport à celle de la variation selon le degré de maturation.

Il nous a été possible de réaliser des CLHP pour des extraits phénoliques bruts obtenus à partir de fruits des saisons 2009 et 2011. Par contre, nous n'avons pas pu identifier formellement les différents composés à cause de l'indisponibilité de standards de référence ou d'une identification par spectrométrie de masse. En dépit de cette limite, Nous avons visualisé, à travers les différents chromatogrammes, des différences, sur le plan qualitatif et quantitatif, selon notamment le degré de maturation des fruits. La variation constatée concerne particulièrement deux pics, le premier pic et le pic dont le temps de rétention est compris, selon l'échantillon et la longueur d'onde de détection, entre 22,80 et 24,90. Nous avons montré qu'il y a diminution de l'amplitude, jusqu'à la disparition, du premier pic associée à une augmentation concomitante de la proportion de l'autre pic au fur et à mesure que la maturation des fruits progresse. Nous nous sommes déjà interrogés si ce pic correspondait à un ou plusieurs flavonoïdes, vu sa variation qui évolue dans le même sens que celle de ces composés déterminé par dosage colorimétrique.

Etant donné le nombre extrêmement élevé (plusieurs milliers) de composés phénoliques dans la nature ainsi que la complexité de leur structure, leur analyse par CLHP est une tache des plus ardues. L'optimisation des conditions opératoires en vue d'une meilleure séparation de ces composés est devenue le souci de plusieurs équipes de recherche s'attelant à améliorer les colonnes, la phase mobile, les conditions de détection et l'identification des composés **(Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001 ; Kalili et de Villiers, 2011 ; Mradu *et al.*, 2012)**.

En ce qui nous concerne, nous avons optimisé nos conditions opératoires (programme de variation de la phase mobile et longueur d'onde de détection par DAD) après plusieurs semaines d'essais. Le protocole que nous avons adopté nous a permis d'avoir la meilleure séparation.

Il est à préciser que, vu le nombre importants d'échantillons, nous n'avons pas recherché l'effet de la méthode d'extraction (notamment la nature du solvant) sur la composition et l'activité de nos composés phénoliques. Tous nos échantillons ont été traités de la même manière, ce qui nous a permis de faire les différentes comparaisons discutées précédemment.

En dernier lieu, nous insistons qu'il n'y a que très peu de données disponibles dans la littérature sur la composition et les activités des composés phénoliques au niveau des fruits de *Pistacia atlantica* encore moins sur leur variation, qualitative et quantitative, selon le degré de maturation. Ainsi, nos résultats sur ces composés, bien qu'ils soient préliminaires, revêtent un caractère original ouvrant la voie à des analyses plus perfectionnées en vue d'une caractérisation de toutes les molécules impliquées.

3. Synthèse des résultats relatifs aux huiles et aux tourteaux

L'ensemble des résultats cumulés sur les fruits de *Pistacia atlantica* met clairement l'accent sur le caractère distinctif de certains paramètres distinguant ainsi les fruits immatures de ceux matures. Ces paramètres varient au cours de la maturation des fruits.

Dans le but d'avoir une vue d'ensemble des paramètres relatifs aux huiles et ceux relatifs aux tourteaux, nous avons effectué une analyse de données par ACP pour 34 échantillons de la saison 2009 de degré de maturité différent. Nous nous sommes

intéressés particulièrement au rendement d'extraction de l'huile, aux acides gras majoritaires (acides palmitique, oléique et linoléique), à la teneur des trois isomères de tocophérols (α-, γ- et δ-tocophérol), à la teneur en phénols totaux et à la teneur en flavonoïdes. La distribution des échantillons étudiés par rapport à ces paramètres (Figure 79) indique pertinemment que les échantillons sont répartis en deux groupes distincts. Le premier englobe les fruits de couleur rouge, considérés comme immatures, caractérisés par des teneurs élevées en α-, γ-tocophérol et en phenols totaux ainsi qu'une proportion importante en acide linoléique. Cependant, ce groupe est caractérisé par un rendement faible d'extraction lipidique et une proportion moins élevée en acide palmitique. Le deuxième groupe, quant à lui, comprend les fruits de couleur verte ou noire considérés comme matures. Ils sont caractérisés par un rendement d'extraction d'huile important et une proportion importante en acide palmitique. Cependant, ils sont moins riches en tocophérols, en acides gras insaturés et en composés phénoliques par rapport au premier groupe.

Nous notons avec intérêt que la teneur en flavonoïdes et la proportion de l'acide oléique ne sembleraient pas constituer de paramètres distinctifs entre les fruits immatures et les fruits matures.

Nous pouvons dire enfin, qu'à la lumière de ces résultats, un optimum pour l'ensemble de ces paramètres pourrait être atteint au niveau des fruits de maturité moyenne ou bien des fruits "mélanges" cueillis au milieu du mois d'aout. Ces fruits allient à la fois un rendement d'extraction d'huile appréciable avec une richesse en tocophérols, en acides gras insaturés et en composés phénoliques. Cette richesse est associée à une activité antioxydante importante, ce qui augmente leur valeur économique, diététique et pharmaceutique.

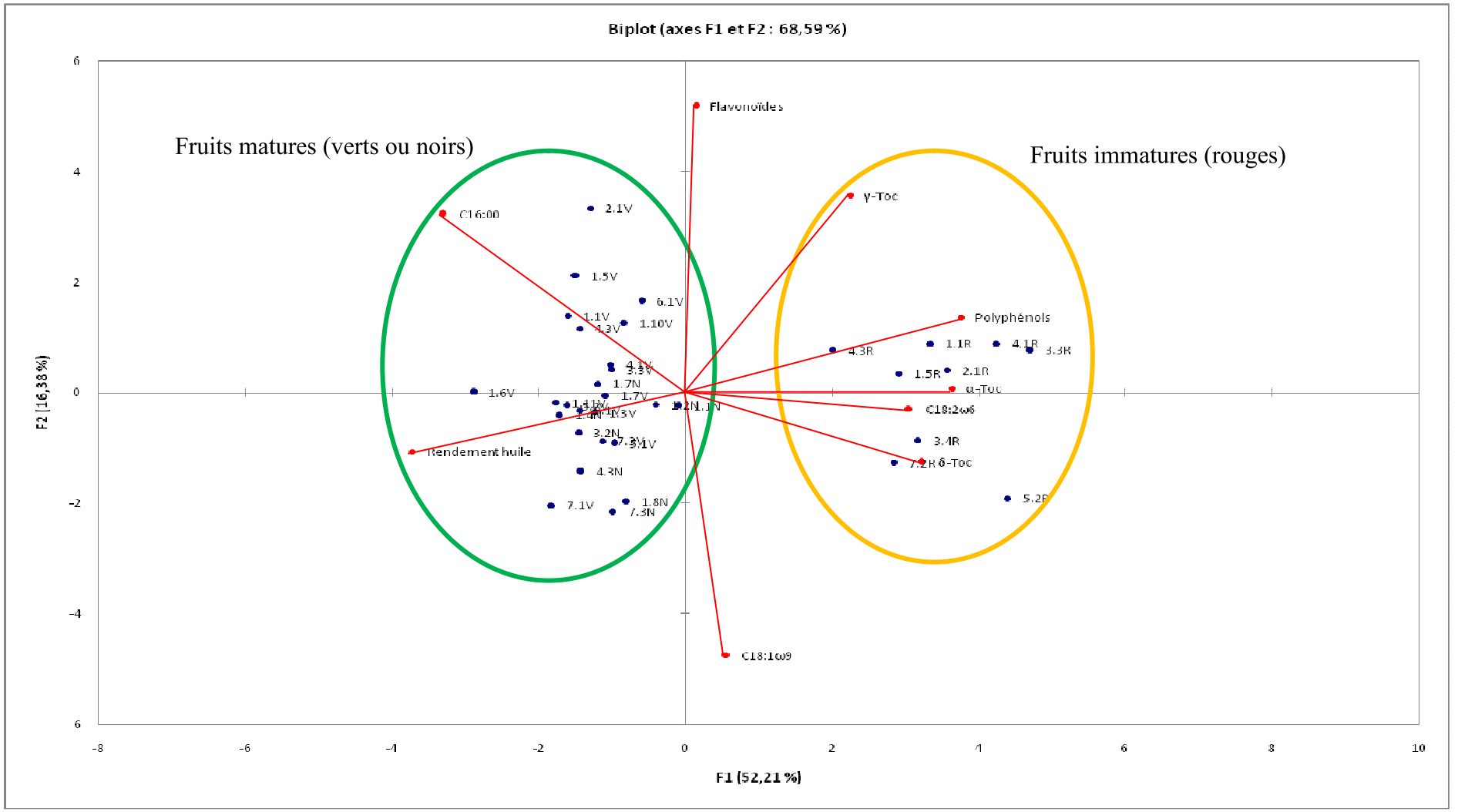


Figure 79 : Distribution de 35 échantillons (verts, noirs et rouges) de la saison 2009 par rapport à la position de paramètres lipidiques et phénoliques établie par ACP.

Conclusion générale

Conclusion générale

Pistacia atlantica, arbre aux vertus multiples pour les populations locales, ne cesse de livrer ses mystères à la communauté scientifique. En dépit des centaines voire des milliers de travaux expérimentaux lui ont été consacrés, de nombreux aspects n'ont pas encore été appréhendés. Dans cette optique, nous nous somme assignés, au départ, la mission d'étudier l'activité antioxydante de l'huile des fruits de cet arbre. A la lumière des premiers résultats obtenus, nous nous sommes demandés s'il était plus judicieux de nous intéresser à la variation de la composition (notamment en acides gras, en tocophérols et en composés phénoliques) et de l'activité antioxydante d'extraits obtenus à partir de ces fruits en fonction de paramètres tels que l'emplacement géographique de l'arbre et le degré de leur maturation. Cette approche nous a paru fondamentale dans la mesure où les résultats obtenus pourraient avoir un impact tant en recherche développement qu'en recherche fondamentale. En effet, outre la connaissance de l'effet de ces facteurs, il nous serait possible, notamment en ce qui concerne le stade de maturation, de situer un optimum pour des paramètres lipidiques et non lipidiques impliqués dans les propriétés bénéfiques des fruits de cet arbre.

Les différentes expériences que nous avons menées ont débouché sur des résultats dont certains sont rapportés pour la première fois. Nous en tirons les conclusions suivantes :

- ✓ Le rendement d'extraction de l'huile à partir des fruits augmente avec leur degré de maturation.

- ✓ Le taux de l'acide linoléique diminue avec la progression de la maturation. Cette diminution est associée à l'augmentation de celui de l'acide palmitique.

- ✓ Le taux de la fraction insaponifiable, la teneur en stérols totaux ainsi que la teneur en tocophérols totaux et individuels semblent être directement influencés par le stade de maturation des fruits dont est extraie l'huile. Plus ils sont immatures plus ils en sont riches.

- ✓ La composition relative en tocophérols varierait en fonction de la maturation. C'est ainsi qu'elle passe, dans la plupart des cas, d'une prédominance de l'α-tocophérol à celle de γ-tocophérol.

- ✓ L'activité antioxydante des huiles serait fortement associée au stade de maturation du fruit et à sa couleur à maturité. Ainsi, l'huile des fruits verts serait plus active que celle des fruits noirs et ce pour les différents stades de maturation. L'huile extraite de fruits immatures, donnant à maturité une couleur verte, recèle le pouvoir antioxydant le plus élevé.

- ✓ L'huile des fruits de *Pistacia atlantica* contient une teneur assez appréciable en composés phénoliques dotés d'un pouvoir antioxydant assez marqué. Ce pouvoir est d'autant plus élevé que l'huile est extraite de fruits immatures. Quant aux flavonoïdes, leur variation dans l'huile ne semble être que légère. Ces résultats sont rapportés pour la première fois.

- ✓ La composition phénolique au niveau des tourteaux semble être influencée, qualitativement et quantitativement, par le stade de maturation des fruits. En effet, la teneur en phénols totaux décroit avec la maturation des fruits, celle des flavonoïdes ne varie que légèrement, indiquant la variation, qualitative et quantitative, d'un ou plusieurs autres composés phénoliques.

- ✓ Le pouvoir antioxydant des extraits phénoliques des tourteaux semble, lui aussi, être influencé par le degré de maturation des fruits. Les fruits immatures recèleraient l'activité antioxydante la plus élevée.

- ✓ Les fruits de maturité moyenne auraient pratiquement des propriétés intermédiaires entre les fruits immatures et ceux matures, indiquant l'effet du degré de maturation sur les paramètres testés.

- ✓ L'emplacement géographique de l'arbre ne semble, d'une manière générale, influer que légèrement sur la composition et l'activité des extraits de fruits de *Pistacia atlantica*.

L'ensemble de ces résultats nous permet de spéculer que les fruits de maturité moyenne (rouge foncé) ou ceux non triés constitués de "mélanges" (fruits verts, rouges et jaunes) cueillis au hasard mais précocement pourraient constituer l'optimum pour leurs propriétés bénéfiques. En effet, ces fruits allient, à la fois, le bon rendement d'extraction de l'huile à la richesse en composés bioactifs. Ce constat doit être étayé par des études complémentaires car l'effet de facteurs inhérents à la saison (température, indice UV,..) ainsi que la présence d'éventuels endophytes ne doivent pas être négligés.

Finalement, Nous pouvons dire que notre étude a apporté des résultats extrêmement intéressants et originaux mettant en valeur la qualité des fruits de *Pistacia atlantica* avant leur maturation complète. Ils contribueraient, avec ceux rapportés par l'équipe du Pr Yousfi, à lever le voile sur quelques secrets de cet arbre. Il n'en demeure pas moins que des études plus approfondies, sur un échantillon plus large, sur une période plus longue et visant l'isolement et la caractérisation des composés (majoritaires et minoritaires) dotés d'activités biologiques soient nécessaires pour appuyer nos constatations. Il ne faut pas omettre l'intérêt de l'analyse par les techniques de Biologie moléculaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces molécules. En dernier lieu, des tests, *in vitro* et *in vivo*, sont également nécessaires pour l'approfondissement de l'étude des activités biologiques (antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antidiabétiques, anticancéreuses,....) des différents composants du fruit du Pistachier de l'Atlas.

Références bibliographiques

Adams, M., Plitzko, I., Kaiser, M., Brun, R., Hamburger, M. (2009). HPLC-profiling for antiplasmodial compounds—3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica. Phytochemistry Letters.* **2**: 159-162.

Akhisa, T., Kokke, W. (1991). Naturally occurring sterols and related compounds from plants. *In* Patterson, G. W., Nes, W. D. Physiology and Biochemistry of Sterols. Champaign, IL: *American Oil Chemists' Society*. pp. 172-228.

Alamovitch, C., Lean, M.E.J., Burns, J. (2007). Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. *Diabètes*. **48**: 176-181.

Alarcon-Flores M.I., Romero-Gonzalez, R., GarridoFrenich, A., Martinez Vidal, J.L., 2012. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **134**: 2465-2472.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J*. **357**: 593-615.

Al-Saghir, M.G., Porter, D.M. (2012). Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *Am. J. Plant Sci*. **3**: 12-32.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. **70**: 200-214.

Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014). Etude phytochimique et evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *J. Fund. App. Sci.* **6** (1): 79-93.

Asghar-Hatamnia, A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*) fruits. *Food Chem.* **145**: 306-311.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. (1984). Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés. *AFNOR*, 3ème édition, Paris.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, A., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.* **112**: 303-309.

Baba Aissa, F. (1999). Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident. Ed. Librairie moderne. Rouiba. 368p.

Barcelo-Coblijn, G., Murphy, E.J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain *n*-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue *n*-3 fatty acid levels. *Progress Lipid Res.* **48**(6): 355-374.

Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Med. Sci***. 22**: 267-270.

Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R., Sayago, A. (2014). Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-equadrupole mass spectrometry. *LWT-Food Sci. Tech.* **57**: 49-57.

Belhadj, S. (2001). Les pistacheraies algériens: état actuel et dégradation. *in* Ak B.E. (ed.). XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds. Zaragoza: CIHEAM. *Cahiers Options Méditerranéennes*. N° 56/107-109.

Belyagoubi-Benhamou, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen. pp. 54-86.

Benabderrahmane, M., Benali, M., Aouissat, H., Jordan Buesso, M-J., (2009). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica Desf.* De l'Algérie. *Phytothérapie.* **7**: 304-308.

Benabid, A., (2000). Flore et écosystème du Maroc. Ibis Press, Paris. pp. 130-221.

Benabid, H., Rutledge, D.N., Naamoune, H. (2008). Comparison of the olive oils produced in different areas of Algeria by chemometric analysis of their composition. *J. Food Agric. Environ*. **6**: 43-51.

Benhamou, N., Atik-Bekkaral, F., Kadifkova-Panovska, T., (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2**: 22-28.

Benhassaini, H., (2003). Contribution à l'étude de l'autoécologie de *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* et valorisation. Thèse de Doctorat. Université de Sidi Bel-Abbès. 93p.

Benhassaini, H., Belkhodja, M. (2004). Le pistachier de l'Atlas en Algérie entre la survie et disparition. *La feuille et l'aiguille*. **54**: 1-2.

Benhassaini, H., Bendahmane, M., Benchalgo N. (2007). The chemical composition of fruits of *pistacia atlantica* desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Chem. Nat. Comp*. **43** (2): 121-124.

Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239** (1): 70-6.

Berset, C., Cervelier, M.E. (1996). Methods of estimationg the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Science des Aliments*. **16**: 219-245.

Bloor, S. J. (2001). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Method. Enzymol*. **335**: 3-14.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Biol*. **54** (1): 519-546.

Borg, J., Reeber, A. (2008). Biochimie métabolique. Ed. Ellipses Marketing. Paris. 2ème edition. pp. 257-272.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Method. Enzymol* .**186**: 343-355.

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. S., Shams-Ardekani, M. R. Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*. **Volume 2013**: 1-33.

Brand-Williams,W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. **28**: 25-30.

Brigelius-Flohe, R., Traber M. (1999) .Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. **13**: 1145-1155.

Brisson, G. (1982). Lipides et nutrition humaine. Ed. Les presses de l'université Laval. 181p.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Editions médicales internationales (3ème Ed). Ed: Tec &Doc Lavaoisier. 1120p.

Burke, R.W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, R.A., Menis, O. (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clin. Chem.* **20** (7) : 794-801.

Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med*. **14**: 303-311.

Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Aparicio-Soto, M., Alarcon-de-la-Lastra, C. (2014). Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chem.* **147**: 117-123.

Castellano, G ., Tena, J .,Torrens, F. (2012). Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. MATCH *Commun. Math. Comput. Chem.* **67**: 231-250.

Changbumrung, S., Buavatana, T., Migasena, P. (1980). Alpha-tocopherol in vegetable oils. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. **50**: 242-246.

Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., Stocher, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (Quercus), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**:921-924.

Chaudiere, J., Tappel, A.L. (1983). Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys*. **226**: 448-457.

Chebouti-Meziou, N., Doumandji, S., Chebouti, Y. (2011). Entomofaune saisonnière du Pistachier de L'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) dans la steppe centrale de l'Algérie. *Silva Lusitana*. Nº spécial: 1-9.

Chenoune, K. (2005). La flore et la végétation du Hoggar. *Bois Forêts Tropiques*. N° 284: 79-83.

Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux. Corps gras. Lipides*. **13** (1): 24-29.

Crane, S., Aurore, G., Joseph, H., Mouloungui, Z., Bourgeois, P. (2005). Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe. *Phytochemistry*. **66**: 1825-1831.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. pp.1-24.

Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Hornick, J.-L., Istasse, L. (2004). Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **148**: 133-140.

Cuvelier M-E., Maillard M-N. (2012). Stabilite des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *Oléagineux. Corps gras. Lipides*. **19** (2): 125-132.

Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014). *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Products*. **61**: 31-40.

Daum-Badouard, C. (2006). Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation: Thèse de Doctorat. Universite Joseph Fourier-Grenoble. pp. 13-99.

Dedon, P.C., Tannenbaum, S.R. (2004). Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch. Biochem. Biophys*. **423**: 12-22.

Delattre, J., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. *In* Delattre, J., Beaudeux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydants. Aspects biologiques et pathologiques. Ed. Technique et Documentation. Londres-Paris -New york. pp. 281-309.

DellaPenna, D. (2005). Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci*. **10**: 574-579.

Del Rio, D., Stewart, A.J. Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. **15**: 316-28.

Denisov, E.T., Afanas'ev I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), pp. 703-861.

Déroanne, C., Whatelet, J.P., Severin, M. (1976). Etude de la structure des triglycérides de l'huile de palme fractionnée. *Revue française des corps gras*. **1**: 27-32

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*. **97**: 654-660.

Djidel, S., Khennouf, S., Ameni, D., Baghiani, A., Arrar, L. Charef, N. (2013). Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Pharmac. Commun.* **3** (2): 28-34.

Doermann, P. (2007). Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta*. **225**: 269-276.

Drigues, P., Lafforgue, D., Asselineau, J. (1981). Etude des phospholipides de *Pseudomonas solanacearum*: présence d'acides gras α-hydroxylés monoéthyléniques. Biochimica et Biophysica Acta. **666**: 504-507.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82** (1): 47-95.

Droge, W., Schipper, H.M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell.* **6**(3): 361–370.

Drotleff, A.M., Ternes, W. (1998). Separation and characterization of cis-trans isomers of a-tocotrienol by HPLC using a permethylated b-cyclodextrin phase. *Z Lebensm Unters Forsch A*. **206**: 9-13.

Emmerie, A. Engel, C.H.R., (1939). Estimation of tocopherol in blood serum. *Rec. trav. Chim*. Pays-bas. **58**: 895-902.

Eromosele, C-O., Eromosele, I-C. (2002). Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri and Ximenia americana*. *Bioresource Technology*. **82**: 303-304.

Esterbauer, H., Wäg, G., Puhl, H. (1993). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br. *Med. Bull*. **49**(3): 566-576.

FAO. (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Food and agriculture organization of the United Nations: 3-10.

Fatemi, S.H., Hammond, E.G. (1980). Analysis of oleate, linoleate and linolenate hydroperoxyde in oxidized ester mixtures. *Lipids*. **15**: 379-385.

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.

Feeter, D.K. (1974). Determination of tocopherols, sterols, and steryl esters in vegetable oil distillates and residues. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **51**: 184-187.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med*. **36** (4): 327-358.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem*. **64**: 97-112.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. 11-12, 91-96.

Gaussen, H., Leroy, J.F., Ozenda, P. (1982). Précis de botanique. Les végétaux supérieurs. Ed. Masson. 579p.

Gerchman, Y., Inbar, M. Distinct antimicrobial activities in aphid galls on *Pistacia atlantica*. (2011). *Plant Signaling & Behavior*. **6** (12): 2008-2012.

Ghaffari, S.M., Shabazaz, M., Behboodi, B.S. (2003). Chromosome variation in Pistacia genus. XIIIème réunion de GREMPA sur l'Amandier et le Pistachier. Portugal. Options méditerranéennes, Série A, Séminaires méditerranéens. p. 63.

Ghafourifar, P., Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci*. **26**: 190-195.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **4**: 162-169.

Giacometti, J. (2001). Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst*. **126**: 472-475.

Godoy-Caballero, M.P., Acedo-Valenzuela, M.I., Galeano-Diaz, T. (2013). New reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromathography with ultraviolet–visible and mass spectrometry detection. *J. Chromat. A.* **1313**: 291-301.

Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydou, E-M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Ind. Crops Products*. **31**: 203-208.

Griendling, K.K., Sorescu, D. Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res*. **86**: 494-501.

Guenane, H. Hartani, D., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, OS., Mazari, F., Touil-Boukoffa, C. (2006). Production of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in Behçet's uveitis and idiopathic uveitis. *J. Fr. Ophtalmol*. **29** (2):146-52.

Guetens, G., De boeck, G., Highley, M., van Oosterom, A.T., de Bruijn, E.A. (2002) Oxidative DNA damage : biological significance and methods of analysis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. **39**: 331-457.

Guichardant, M., Bacot, S., Molière, P., Lagarde, M. (2006). Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux. Corps gras. Lipides*. **13** (1): 31-34.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev. Med. Liège*. **62**: 628-638.

Halliwell, B., Gutterridge, J.M.C. (1990). The antioxidant of human extracellular fluids. *Arch. biochem. biophys*. **280**: 1-8.

Halliwell, B., Gutterridge, J.M.C., Cross, C. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: How are we now? *J. Lab. Clin. Med*. **119**: 598-620.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*. **344** (8924): 721-724.

Halliwell, B., Gutterridge, J.M.C. (1999). Free Radicals, other reactive species and disease. *in* Halliwell, B., Gutterridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine: Oxford University Press. pp. 617-784.

Halliwell, B. (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group. 1-7.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British J. pharmacol*. **142** (2): 231-255.

Harborne, J.B. (1980). Plant Phenolics. *in* Bell, E.A., Charlhood, B.V. Encyclopedia of Plant Physiology. Ed. New series Springer. Berlin. **8**. pp. 329-402.

Harfouche, A., Chebouti-meziou, N., Chebouti, Y. (2005). Comportement comparé de quelques provenances algériennes de Pistachier de l'Atlas introduites en réserve naturelle de Mergueb (Algérie). *Forêt méditerranéenne.* **t. XXVI** (n°2): 135-142.

Harold, E., Seifried., Darrell, E., Anderson., Evan, I., Fishera., John, A., (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr. Biochem.* **18**: 567-579.

Harrison, D., Griendling, K.K ., Landmesser, U ., Hornig, B ., Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology.* **91**: 7-11.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Pro*. **59**: 205-215.

Hatamnia, A.A., Abbaspour N., Darvishzadeh, R. (2014)**.** Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chemi*. **145**: 306-311.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **96**: 67-202.

Hemler, M., Lands, W.E., Smith, W.L. (1976). Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem*. **251**: 5575-5579.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. **1**: 3-6.

Hertog, M.GL., Hollman, P.C.H. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food. Chem.* **40**: 1591-1598.

Hibbeln, J.R., Nieminen, L.R., Blasbalg, T.L., Riggs, J.A., Lands, W.E. (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**(suppl): 1483S-1493S.

Hider, R.C., Liu, Z.D., Khoder, H.H. (2001). Metal chelation of polyphenols. *Method. Enzymol*. **335**: 190-203.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet B., Legrand M. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. **16** (6): 1446-1465.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.I. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*. **53**: 1841-1856.

Hussain, N., Irshad, F., Jabeen, Z., Haider Shamsi, I., Li Z., Jiang, L. (2013)**.** Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in Plant; Past, Present, and Future Perspectives. *J. Agric. Food. Chem*. **61**: 6137-6149.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. (1994). Flavonoids as antioxydants. *J. Am. Chem. Soc*. **116**: 4846-4851.

Kadi-Bennane, S. (2005). Étude adaptative de trois populations de *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* (Ain Oussera - Messaad - Taissa) par le biais du complexe stomatique. *Options Méditerranéennes*, Série A*,* **N°**63: 365-368.

Kafkass, S., Perl-Treves, R., Gucluturk, H., Karaca, S., Cetinerm, S. (2001). Monoecious *P. atlantica* trees in the Yunt Montains of Manisa province of Turkey. 11ème colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier Zaragoza. *Cahiers options Méditerranéennes.* **56**: 416p.

Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic. Biol. Med*. **33**: 1037-1046.

Kalili, K.M. de Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *J. Sep. Sci.* **34**, 854-876.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701.

Kamal-Eldin, A., Görgen, S., Pettersson, J., Lampi, A.M. (2000). Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*. **881**: 217-227.

Karlenskind, A. (1992). Manuel des corps gras. Tome 1. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. pp. 120-207.

Kaska, N., Caglar, S., Kafkas, S. (1996). Genetic diversity and germplasm conservation of *Pistacia* species in Turkey. *in* Workshop "Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of *Pistacia* Genetic Resources", Palermo, Italie, 1995, Padulosi, S., Caruso, T. et Barone, E. (éds). IPGRI, Roma. pp. 46-50.

Knothe, G. (2002). Structure indices in FA chemistry. How relevant in the iodine value ? *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **79**: 847-854.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **30**: 620-650.

Laudat, P. (1972). Intolérance au phytol: Maladie de Refsum. *Biochimie.* **54**: 735-738.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.

Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*. **300**: 31-36.

Li, C.Y., Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, **282**: C227-C241.

Liu, Z. Q. (2010). Chemical methods to evaluate antioxidant ability. *Chem. Rev.* **110**: 5675-5691.

Maamri, S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister ès sciences. Université M'hamed Bougara. Boumerdes. 108p.

Macheix, J.J, Fleuriet, A., Allemand, Ch.J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires Romandes. Lausane. pp. 37-66.

Magder, S. (2006). Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Crit. care*. **10**: 208-216.

Matthäus, B., Özcan, M.M. (2006). Quantification of fatty acids, sterols and tocopherols in Turpentine (*Pistacia terebenthus* Chia) growing wild in Turkey. *J. Agric. Food. Chem.* **54**: 7667-7671.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**: 673-839

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*. **84**: 407-412.

Mohamed, H. M. A., Awatif, I.I. (1998). The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. *Food chem.* **62** (3): 269-276.

Molyneux., P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* **26**: 212-219.

Monjauze, A. (1968). Répartition et écologie de *Pistacia atlantica* Desf. en Algérie. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord. **56**: 1-127.

Monjauze A. (1980). Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica Desf*. Biologie et forêt. *Revue Forestière Française.* **4**: 357-363.

Mosharrafa, S.A.M., Kawashty, S.A., Saleh, N.A.M. (1999). Flavonoids of *Pistacia atlantica* Desf. *Bull. Nat. Res. Centre Egypt*. **24**: 109-114.

Mradu, G., Saumyakanti, S., Sohini, M., Arup, M. (2012). HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *Internat. J. Pharmacognosy Phytochem. Res*. **4**(3): 162-167.

Murley, J.S., Kataoka, Y., Hallahan, D.E., Roberts, J.C., Grdina, D.J. (2001). Activation of NF kappa B and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med*. **30**: 1426-1439.

Naczk, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in foods. *J. Chromat. A*. **1054** (1-2): 95-111.

Nakbi, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Koubaa, N., Echbili, A., Hammami, M., Attia, N. (2010). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *J. Food Comp. Anal*. **23**: 711-715.

Naudet, M. (1992). *In*. Karleskind, A. Manuel des corps gras, Technique et Documentation Lavoisier. Paris. pp. 43-45.

Nicolas, J.F., Thivolet, J., Goujon, C. (2001). Les urticaires de la clinique à la thérapeutique. Edition John Libbey Eurotext. Paris. p. 20.

Nielsen, M.M., Hansen, A. (2008). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *Cereal. Chem*. **85**: 248-251.

Packer, L., Weber, S., Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J. Nutr*. **131**: 369-373.

Pal Yu, B. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopath. Rev.* **74**: 139-155.

Peisker, C., Duggelin, T., Rentsch, D., Matile, P. (1989). Phytol and the breakdown of chlorophyll in senescent leaves. *J. Plant Physiol.* **135**: 428-432.

Peksel, A., Arisan, I., Yanardag, R. (2013). Radical scavenging and anti-acetylcholinesterase activities of aqueous extract of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) leaves. *Food Sci. Biotechnol*. **22**: 515-522.

Pelli, K., Lyly, M. (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology. Finland. 28p.

Perkins, A.V. (2006). Endogenous antioxydants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **46**(2): 77-83.

Perronne, C. (1999). Maladies infectieuses 1. Edi Doins Groupe liaisons SA, Paris. p. 57.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*. **269** (2)**:** 337-341.

Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med*. **28**: 141-164.

Quézel, P., Médail, F. (2003). Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Elsevier, Collection Environnement. Paris. 576p.

Rahman, T., Hosen, I., Islam, M.M.T., Shekhar, H.U. (2012). Oxidative stress and human health. *Adv. Biosci. Biotech.* **3**: 997-1019.

Rahmani, M. (2005). Composition chimique de l'huile d'argane « vierge ». *Cahiers Agricultures*. **14** (5) : 461-465.

Rezaei, PF., Fouladdel, Sh., Hassani, Sh., Yousefbeyk, F., Ghaffari, SM., Amin Gh., Azizi, A. (2012[a]). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food. Chem. Toxicol*. **50**: 1054-1059.

Rezaei, P.F., Fouladdel1, Sh., Ghaffari, S.M., Amin, G., Azizi, E. (2012[b]). Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. *DARU J. Pharma. Sci.* **20**:101-105.

Rezanka, T. (1999). Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Analytyca. Chemica. Acta*. **398**: 253-261.

Rise, M., Cojocaru, M., Gottlieb, H.E., Goldschmidt, E.E. (1989). Accumulation of α-tocopherol in senescing organs as related to chlorphyll degradation. *Plant Physiol*. **89**: 1028-1030.

Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Pérez, J.P., Borges, T., Garcia-Montelongo, F.J. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromat. A*. **912**: 249-257.

Russo-marie, F., Peltier, A., POLLA, B. (1998). L'inflammation. Editions John Libbey Eurotext. pp. 69-78.

Saber-Tehrani, M., Givianrad, M.H., Aberoomand-Azar, P., Waqif-Husain, S., Jafari Mohammadi, S.A. (2013). Chemical composition of Iran's *Pistacia atlantica* cold-pressed oil. *J. Chem.* **Volume 2013**: 1-6.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food. Sci. Technol. Int*. **4**: 391-399.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci. Tech. Int*. **8** (3): 121-137.

Sastre, J., Pallardo, F. V., Vina, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. **49**: 427-435.

Saud Ahmad, N., Waheed, A., Farman, M., Qayyum, A. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. *J. Ethnopharmacol*. **129**: 250-253.

Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compo. Anal.* **21**: 152-161.

Seltzer, P. (1946). Le climat de l'Algérie. Travaux de l'Institut de météorologie et de physique du globe de l'Algérie. Université d'Alger. Ed. Impr. "La Typo-litho" & J. Carbonel. 219p.

Serve, L. (1983). Dosage des acides et aldéhydes phénoliques par chromatographie liquide haute-performance: analyse comparative des sols de haute montagne et de leur végétation. *J. Chromat. A.* **259**: 319-328.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Met. Enzym*. **299**: 152-178

Sohal, R.S ., Mockett, R.J ., Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 575-586.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. **327**: 649-662.

Souchard, J.P., Amal, J.F., Rochette, L. (2002). Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. *Techniques en Biologie*. **23**: 245-257.

Spielmann, D., Mendy, F. (1993). Nomenclature, synthèse et métabolisme des acides gras insaturés. *Nutr. Clin. Métabol*. **7**: 3-18.

Stolyhwo, A. (2007). Lipids and food quality. *In* Sikorski, Z.E. Chemical and functional properties of food components. Third Edition. CRC Press. Boca Raton. FL. pp. 177-207.

Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann T., Rédei, G., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C. (1995). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90. *Cell*. **85**: 171-182.

Taran, M., Mohebali, M., Esmaeli, J. (2010). *In vivo* efficacy of gum obtained *Pistacia atlantica* in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. *Iranian J. Publ. Health*. **39** (1): 36-41.

Thorne, R.F., Reveal, J.L. (2007). An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). *The Botanical Review*. **73**(2): 67-182.

Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukhchina, S., Mayer, P. (2012). Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chem.* **131**: 434-440.

Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res*. **42**: 318-43.

Urquiaga, I., Leighton F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* **33**(2): 55-64.

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. **285**: 1393-1396.

Uttara, B., Singh, A-V., Zamboni, P., Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol*. **7**: 65-74.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interac.* **160**: 1-40.

Victor, VM., Rocha, M., Solá, M., Bañuls, C., Garcia-Malpartida, K., Hernández-Mijares, A. (2009). Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* **15**: 2988-3002.

Von Schacky, C. (2006). A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. *Vasc. Health Risk Manag*. **2**: 251-262.

Weinman, S., Méhul, P. (2004). Toute la Biochimie. Ed. Dunod. Paris. pp. 324-326.

Will, J.C., Byers, T. (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nut. Rev*. **54**:193-202

Wong, R.S.Y., Radhakrishnan, A.K. (2012). Tocotrienol research: past into present. *Nutr. Rev.* **70**, 483-490.

Yoshida, Y., Niki, E.J. (2003). Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Nutr. Sci. Vitaminol.* **49** (4): 277-280.

Yousfi, M., Nedjmi, B., Bellal, R.,. Ben Bertal, D., Palla, G. (2002). Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **79** (10): 1049-1050.

Yousfi, M., Nedjemi, B., Belal, R., Ben bertal, D. (2003). Étude des acides gras de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas algérien. *Oléagineux. Corps gras. Lipides*. **10** (5-6): 425-427.

Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydoud, E-M. (2005). Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* of fruit growing in Algeria. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **82** (2): 93-96.

Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Hamia, Ch., Duhem, B., Gaydou, E.M. (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother. Res.* **23:** 1237-1242.

Zhishen, J., Mengcheng, T. Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. **64**: 555-559.

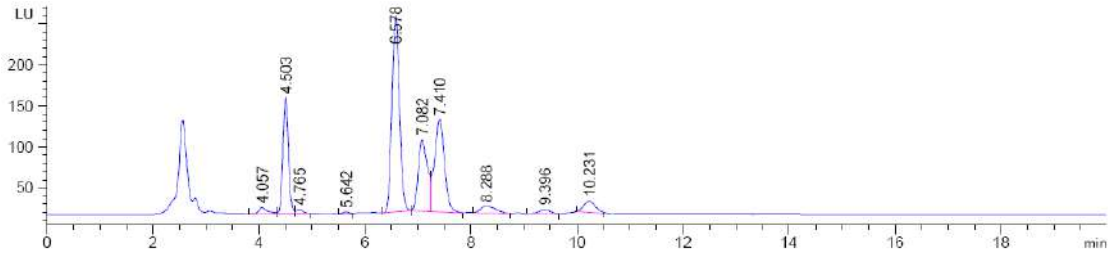
Zohary, M. (1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine J. Bot. Jerusalem.* **Vol. 5:** 187-228.

Annexes

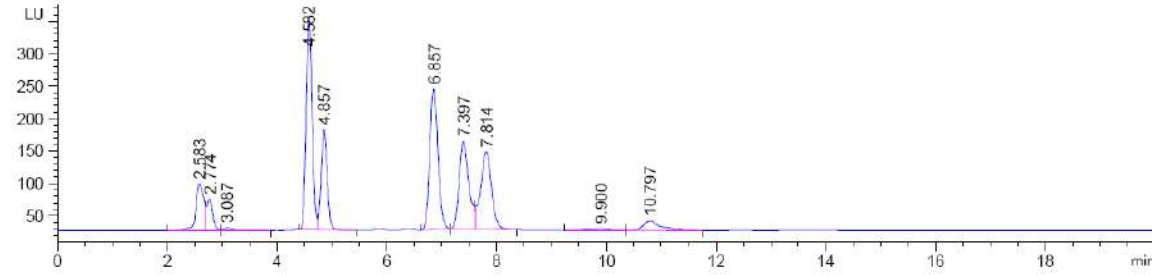
Annexe I

Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, des tocophérols pour quelques échantillons de la saison 2009.

1.1R

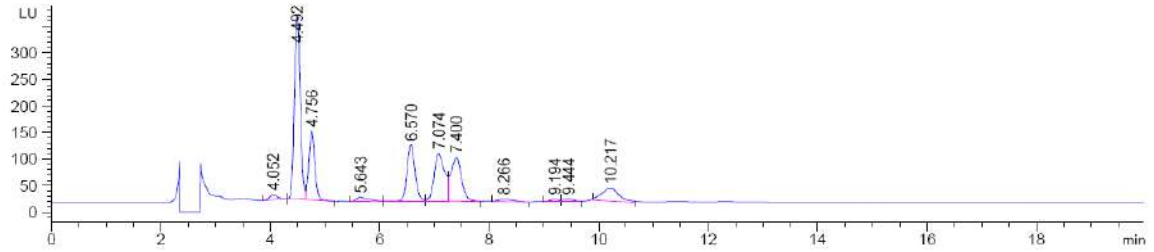


1.5R

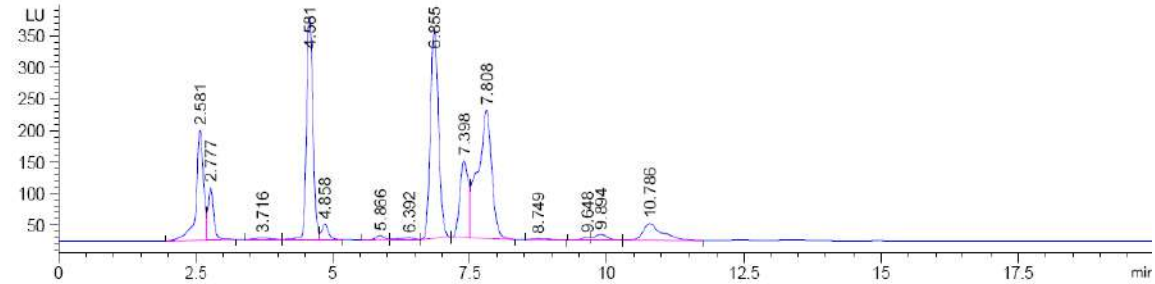


Fluorescence (mVolts)

3.4R

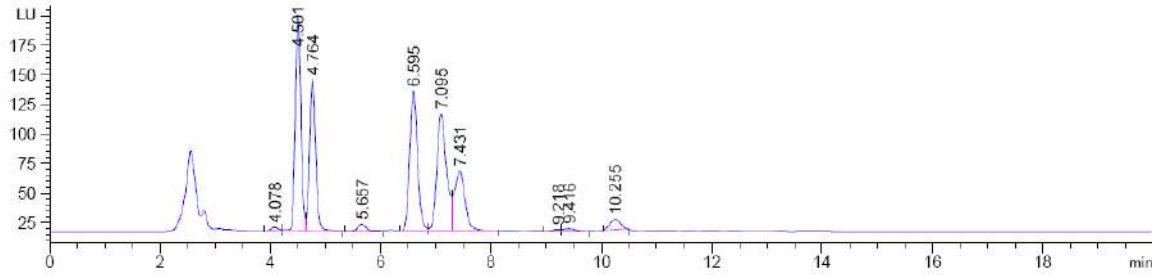


7.2R

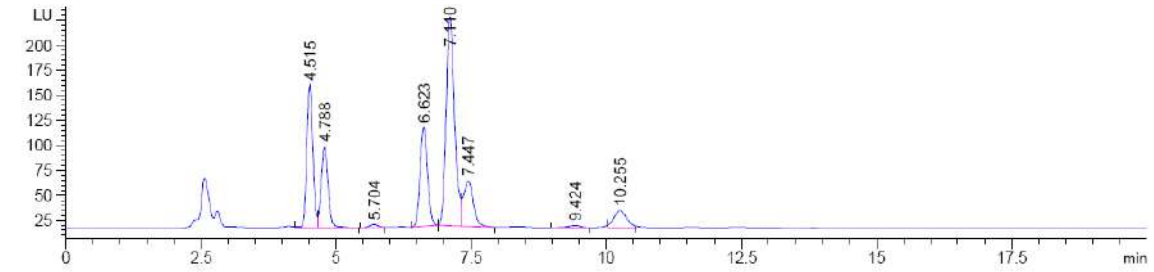


Temps de rétention (min)

1.2N

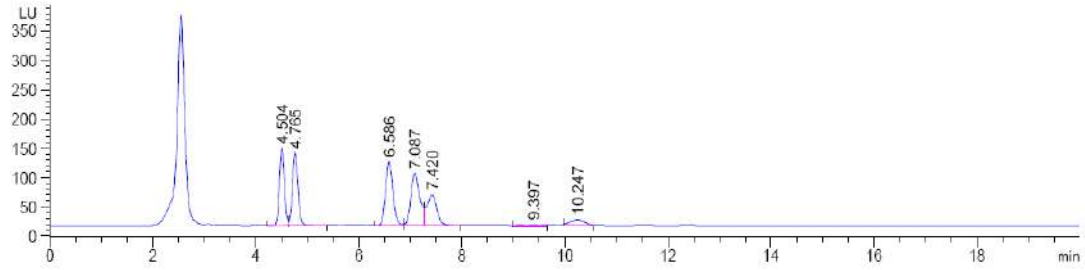


1.4N

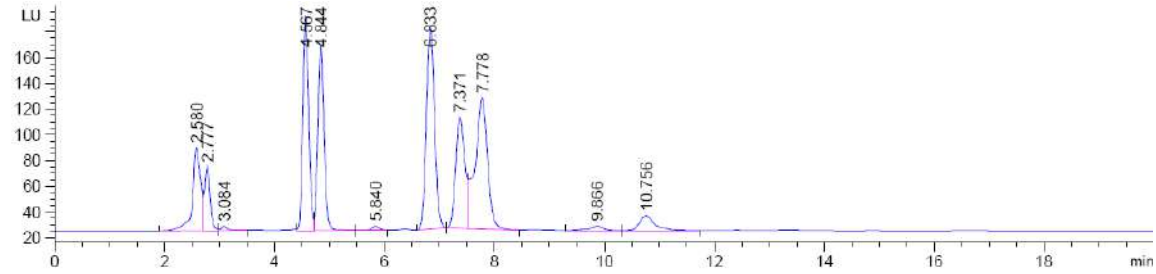


Fluorescence (mVolts)

4.3N

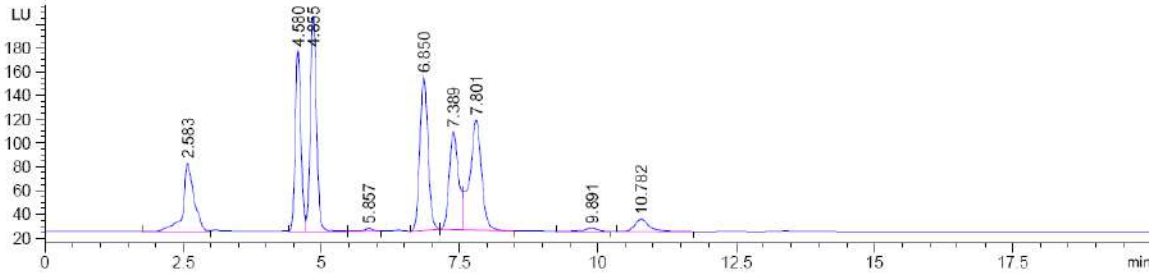


1.5V

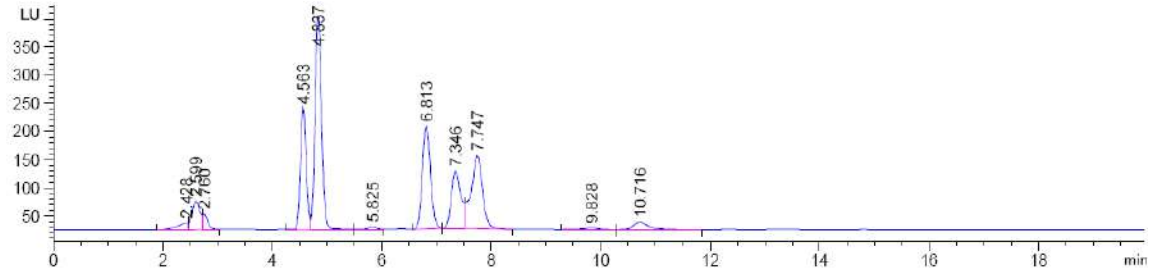


Temps de rétention (min)

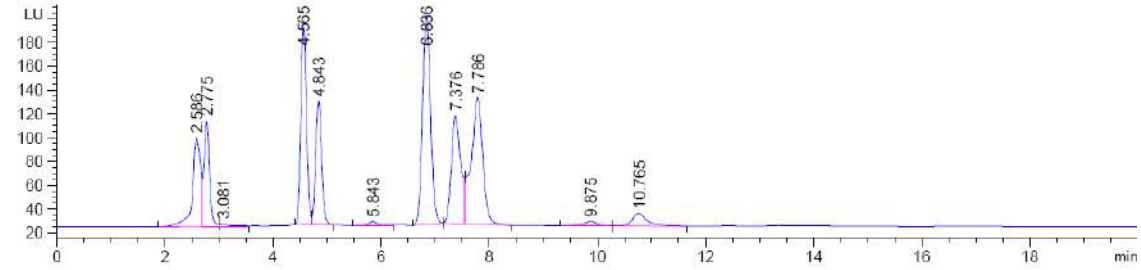
1.6V



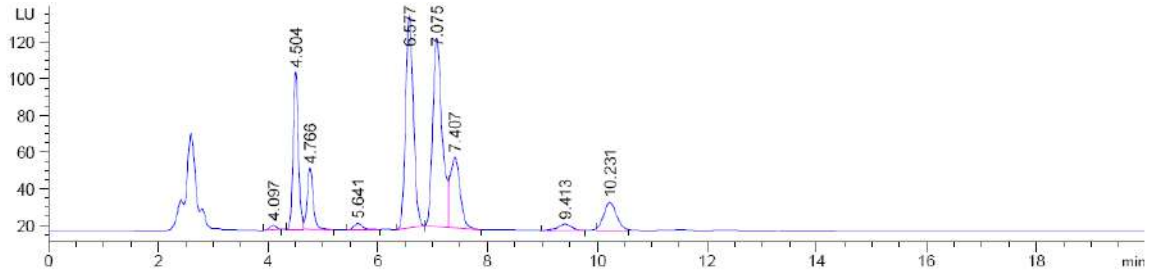
1.10V



1.11V



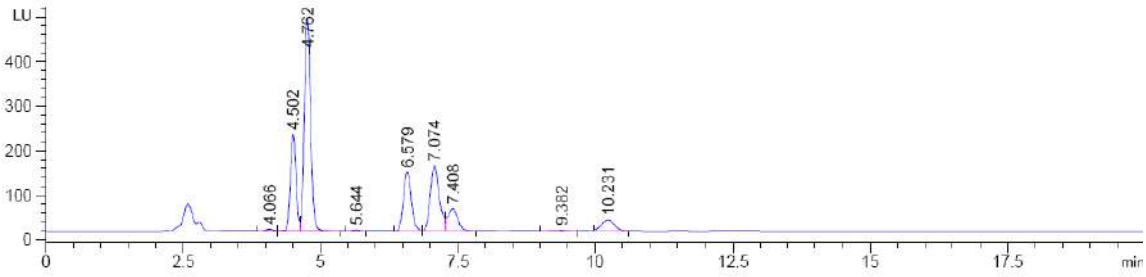
2.1V



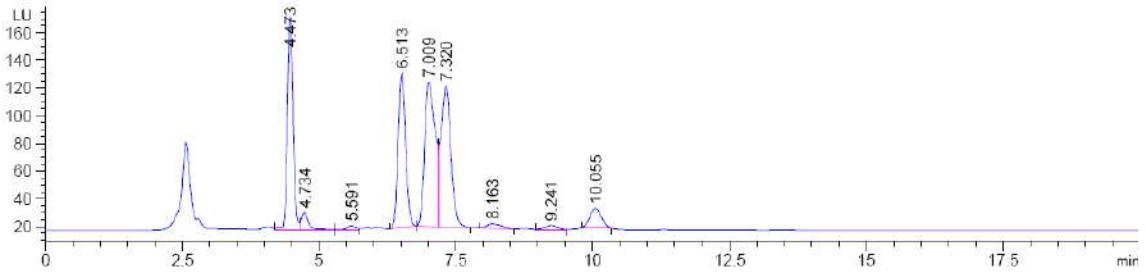
Fluorescence (mVolts)

Temps de rétention (min)

3.4V



5.1V

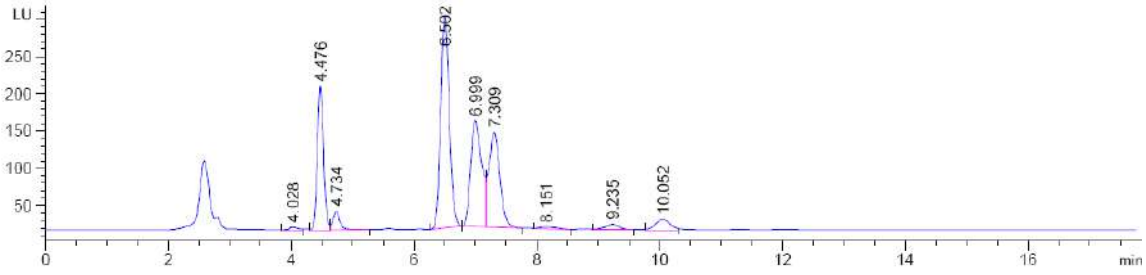


Fluorescence (mVolts)

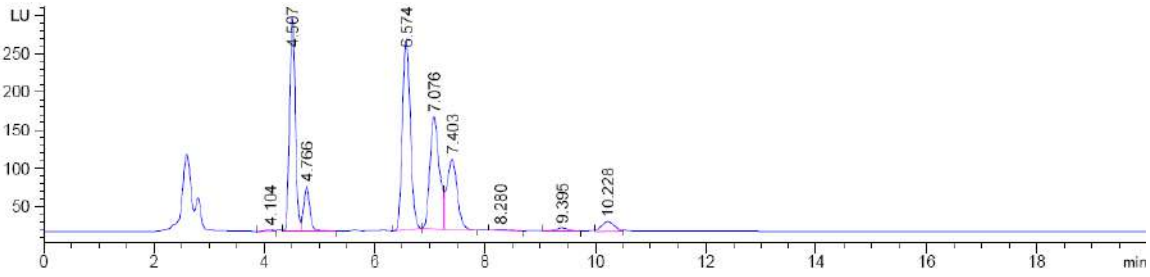
Temps de rétention (min)

Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, des tocophérols pour quelques échantillons de la saison 2011.

5.A.RF1



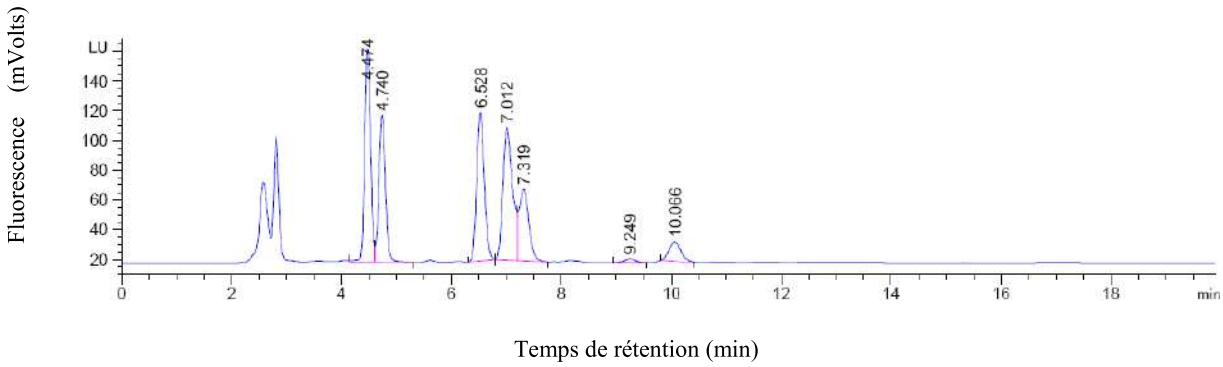
5.A.V1



Fluorescence (mVolts)

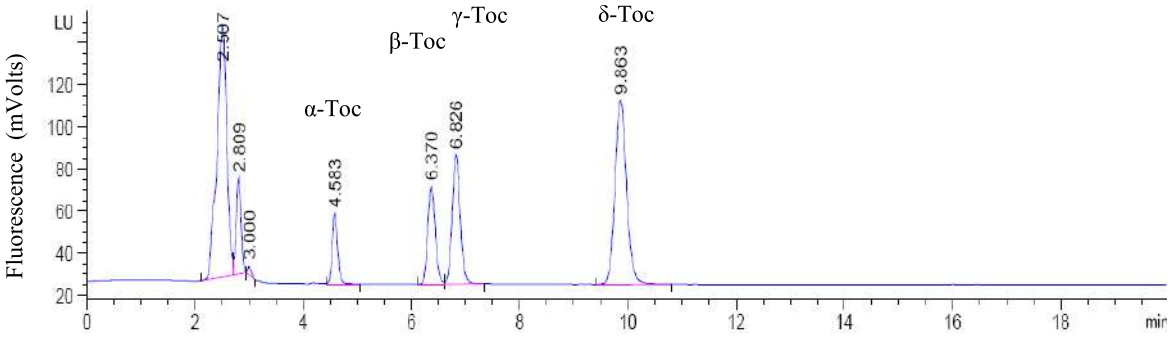
Temps de rétention (min)

1.C.N



Temps de rétention (min)

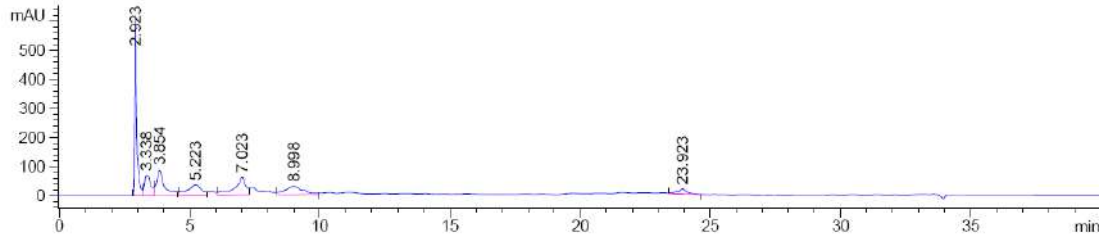
Profil chromatographique (CLHP) des quatre standards commerciaux des tocophérols utilisé pour les échantillons de la saison 2013.



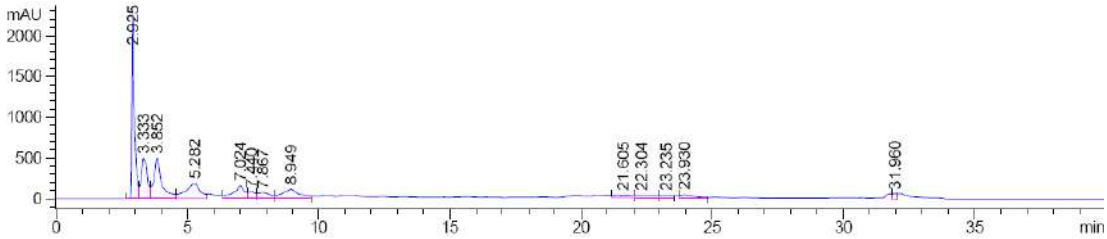
Temps de rétention (min)

Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, de l'extrait phénolique brut pour quelques échantillons de la saison 2009.

2.1R (à 320 nm)

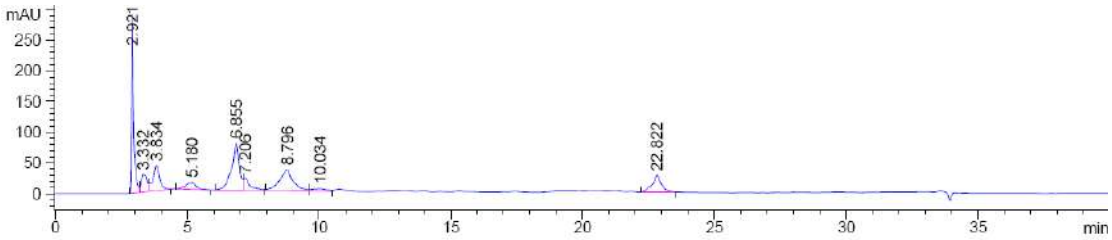


(à 260nm)

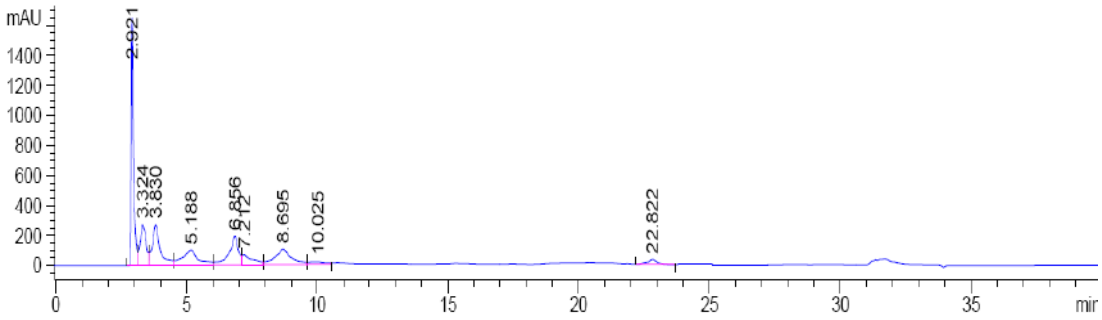


Absorbance (mAU)

3.4R (à 320 nm)

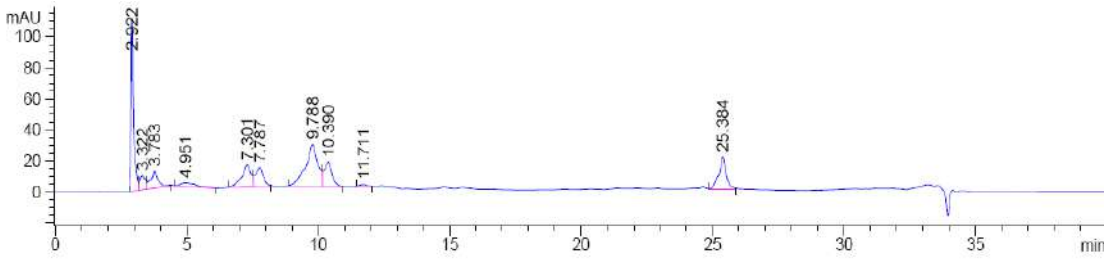


(à 260 nm)

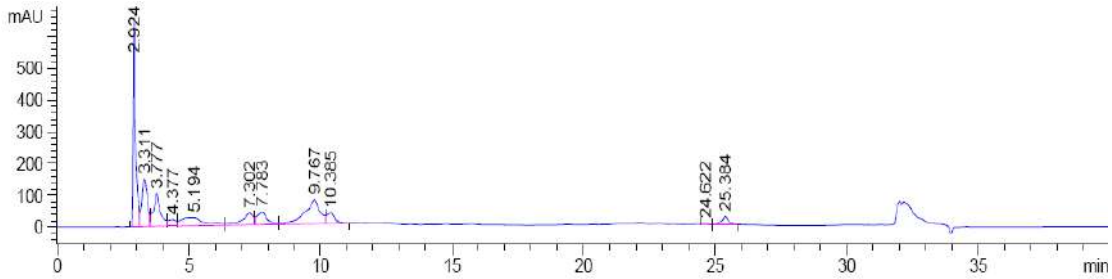


Temps de rétention (min)

3.2N (à 320 nm)

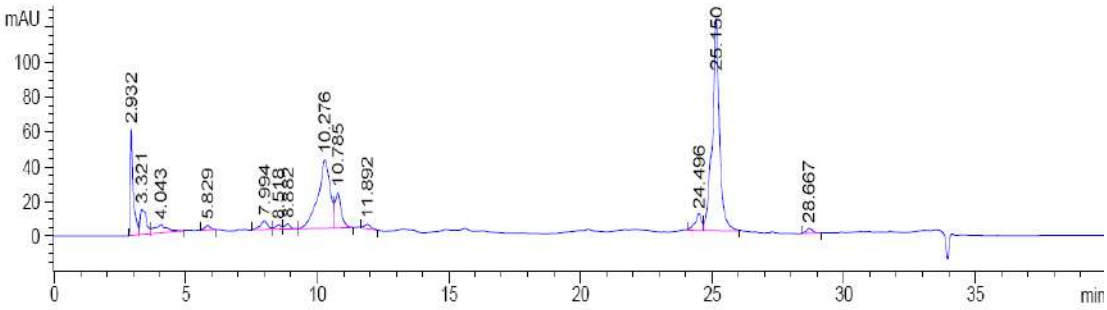


(à 260 nm)

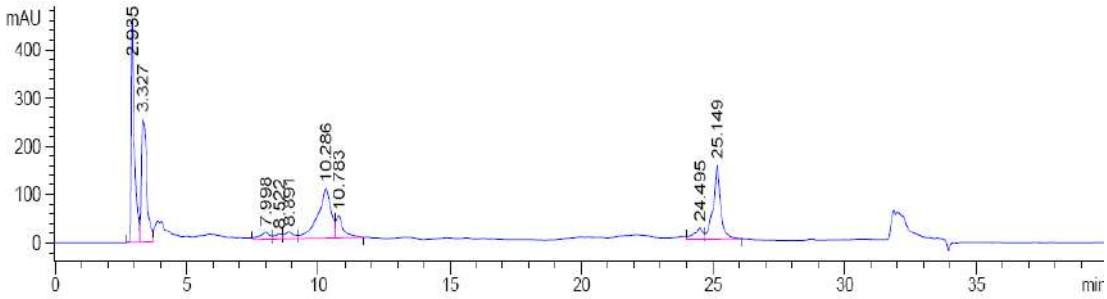


Absorbance (mAU)

7.3N (à 320 nm)

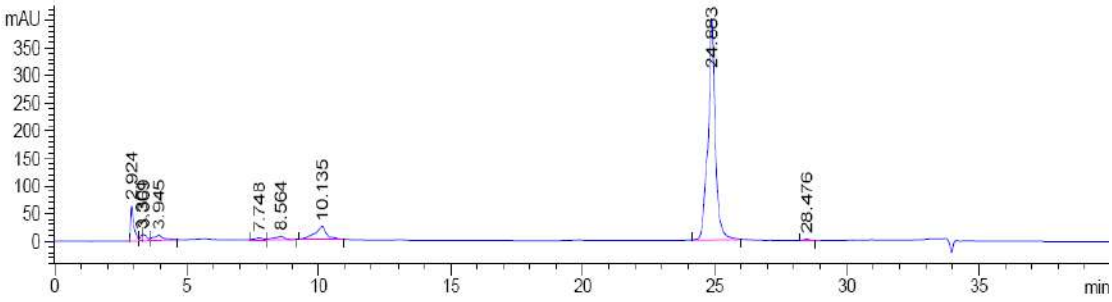


(à 260 nm)

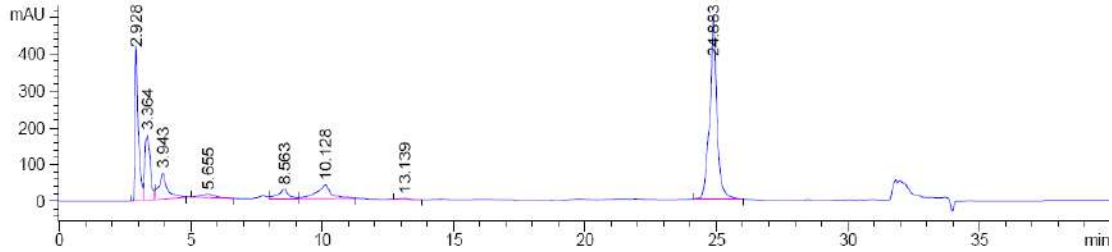


Temps de rétention (min)

1.1V (à 320 nm)

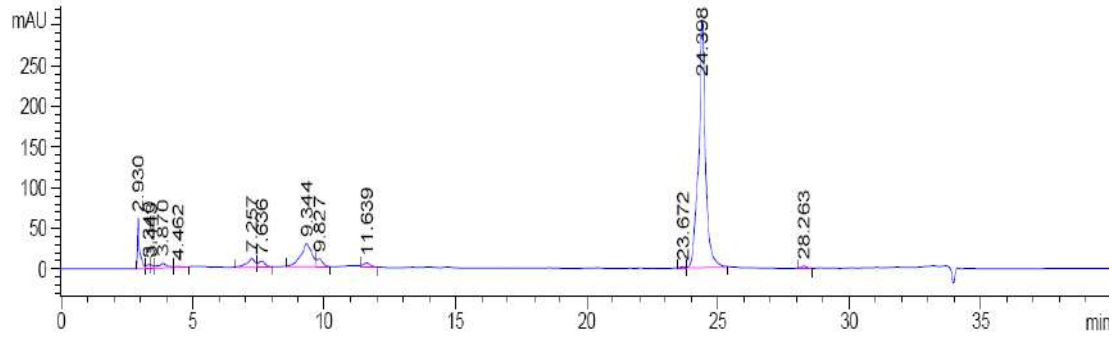


(à 260 nm)

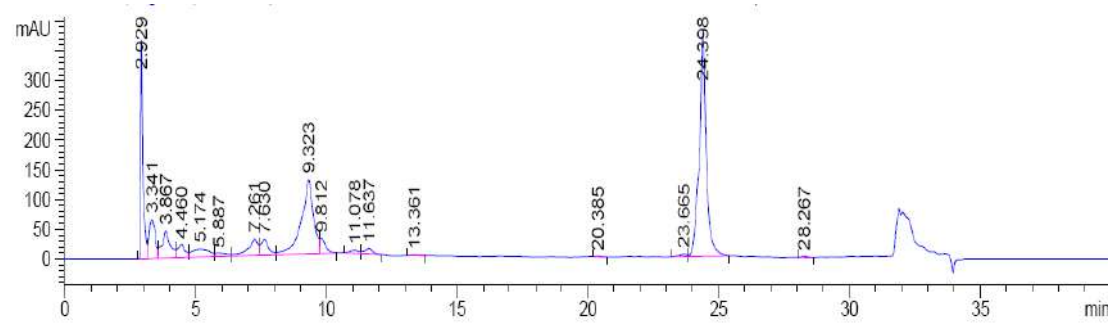


Absorbance (mAU)

1.6V (à 320 nm)

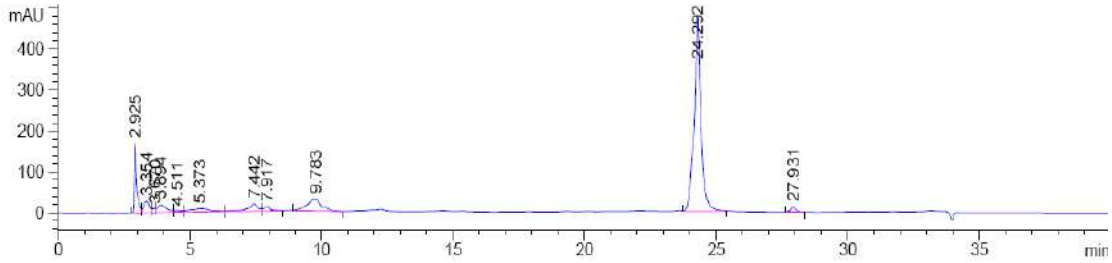


(à 260 nm)

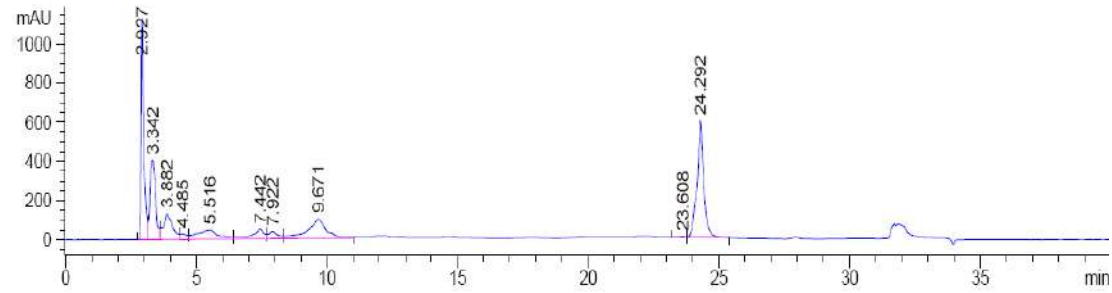


Temps de rétention (min)

2.1V (à 320 nm)

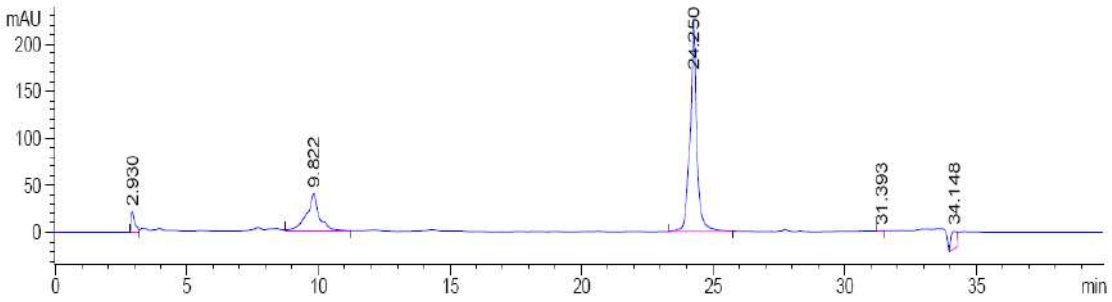


(à 260 nm)

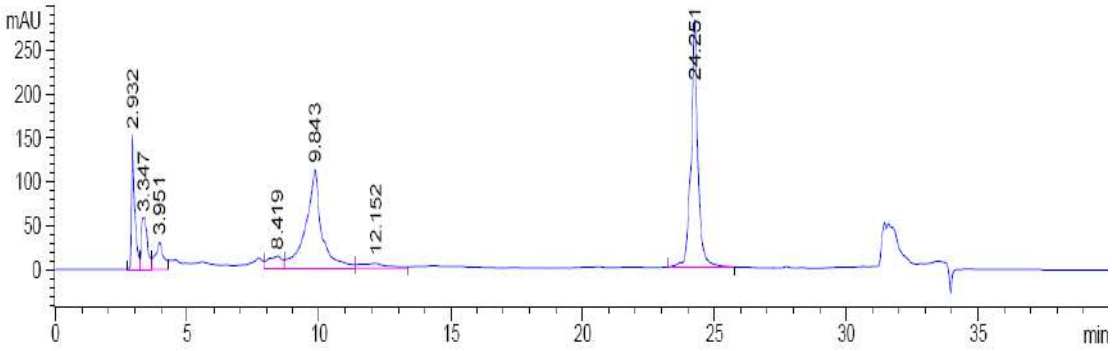


Absorbance (mAU)

7.3V (à 320 nm)



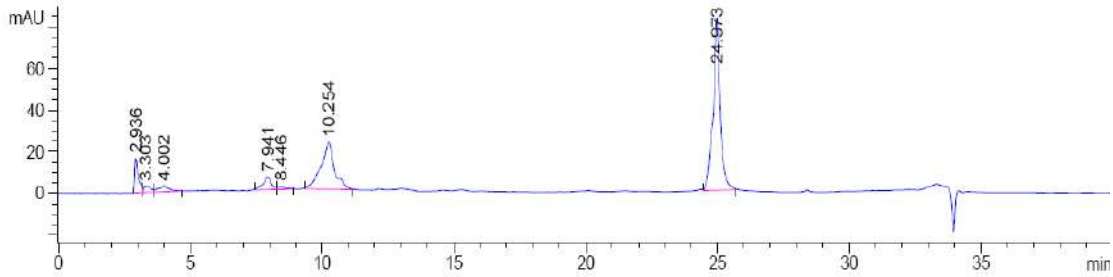
(à 260 nm)



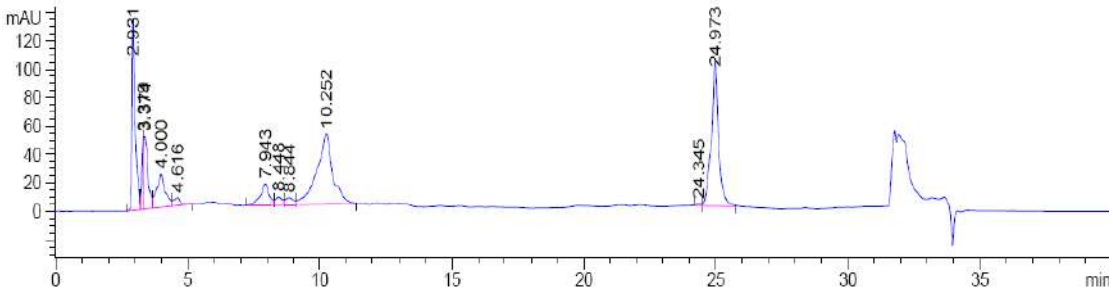
Temps de rétention (min)

Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, de l'extrait phénolique brut pour deux échantillons de la saison 2011.

5.A.V1 (à 320 nm)

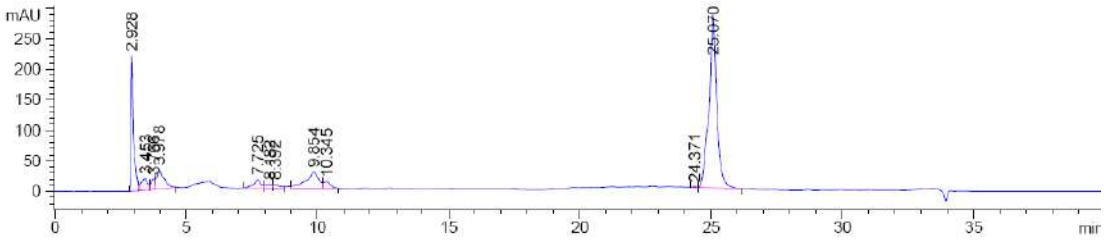


(à 260 nm)

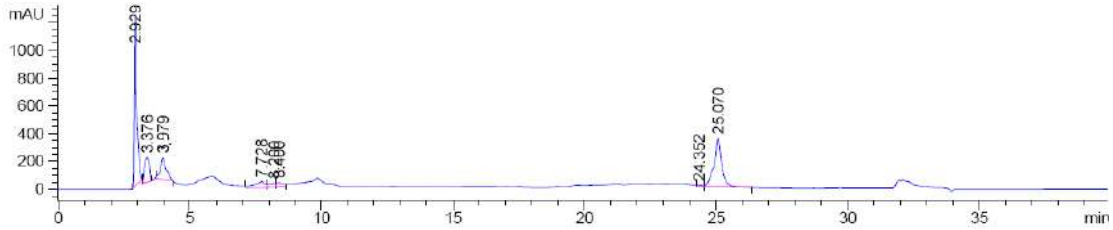


Absorbance (mAU)

1.C.N (à 320 nm)



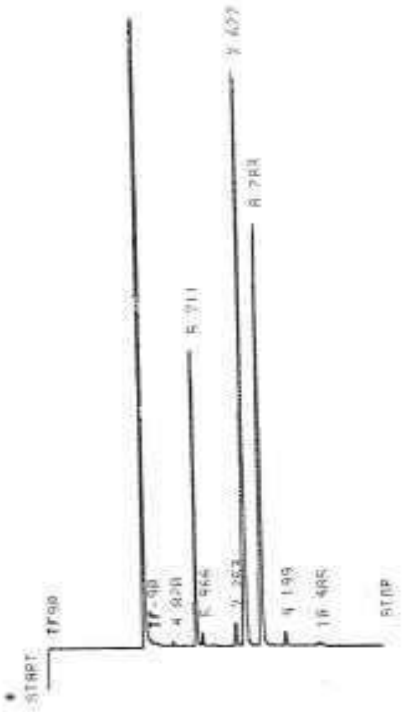
(à 260 nm)



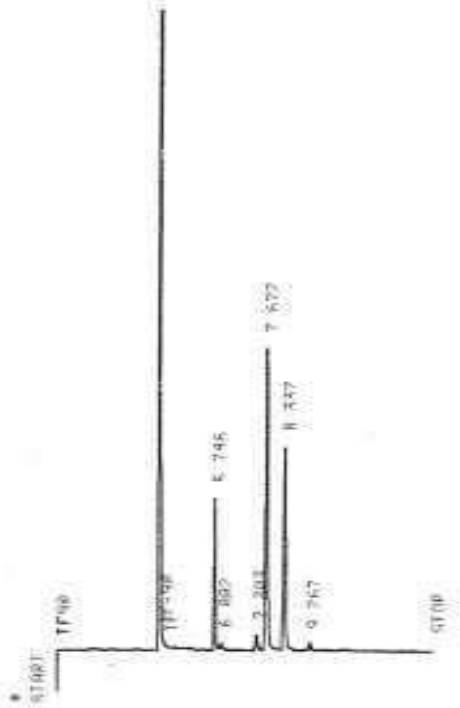
Temps de rétention (min)

Profils chromatographiques de l'analyse, par CPG, des EMAG pour quelques échantillons de la saison 2009.

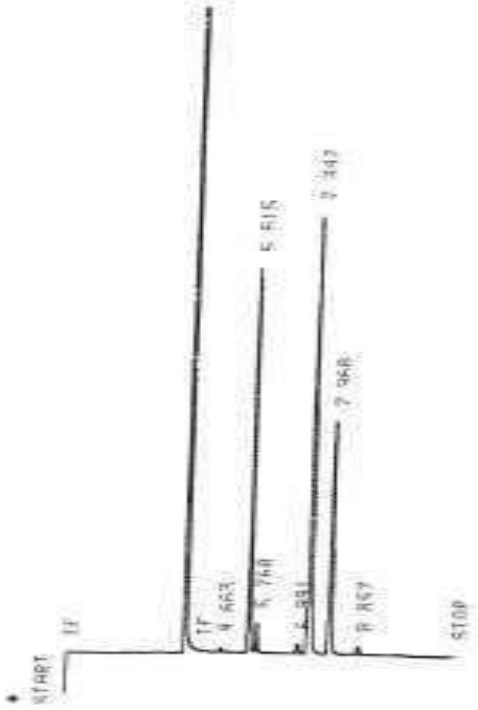
1.5R



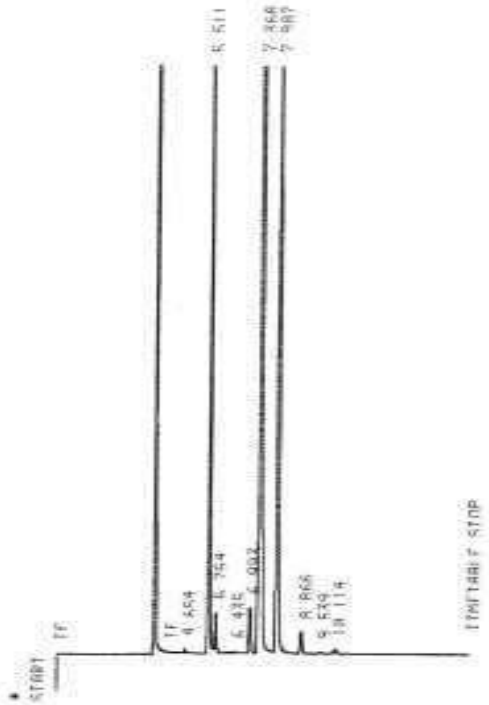
2.1R



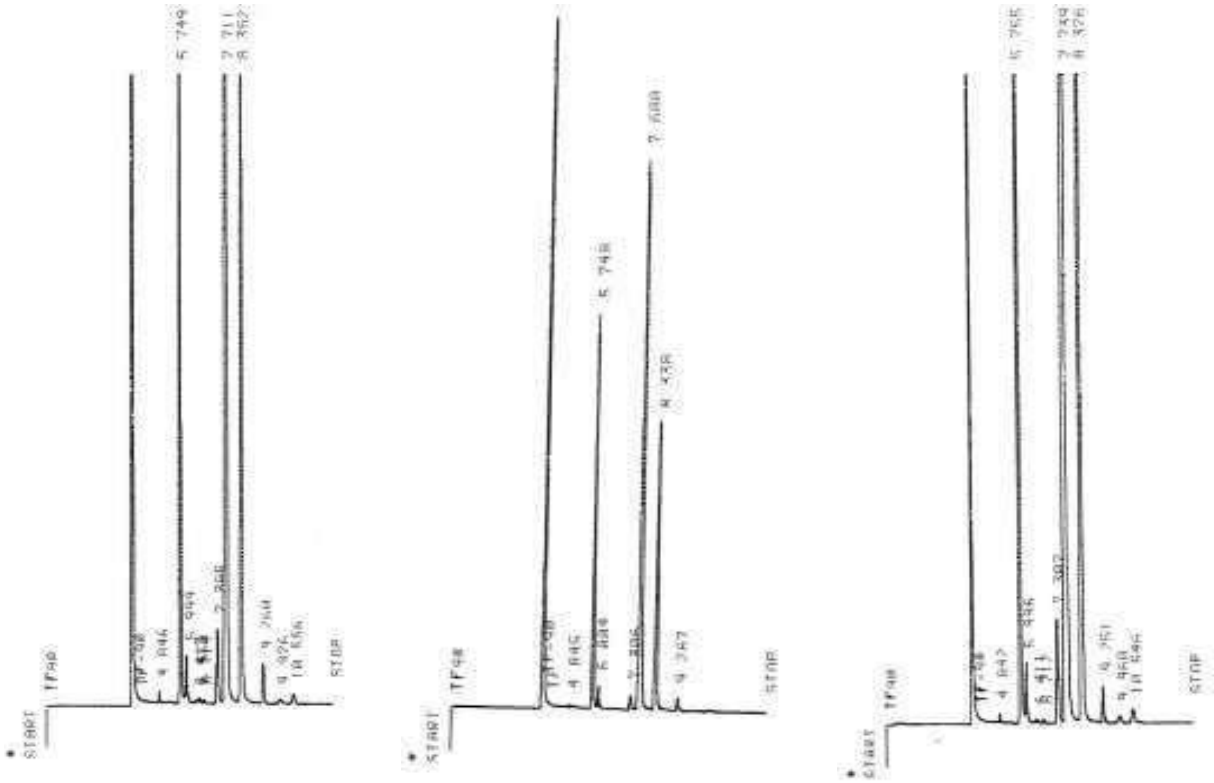
1.4N



4.3N

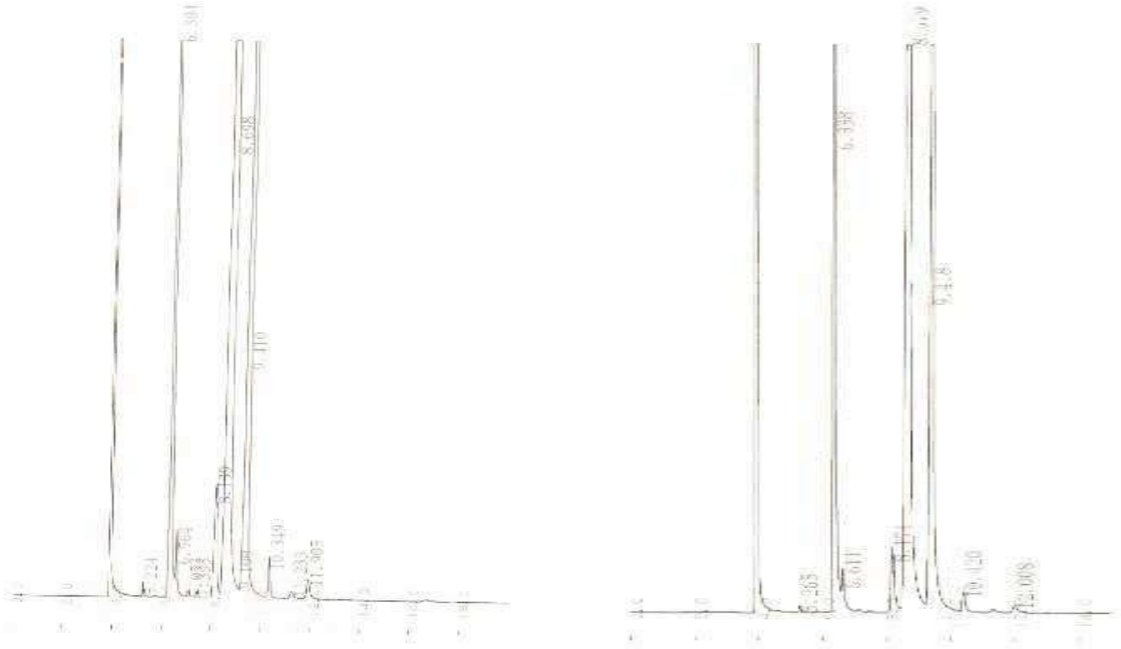


1.9V **3.1V** **5.2V**

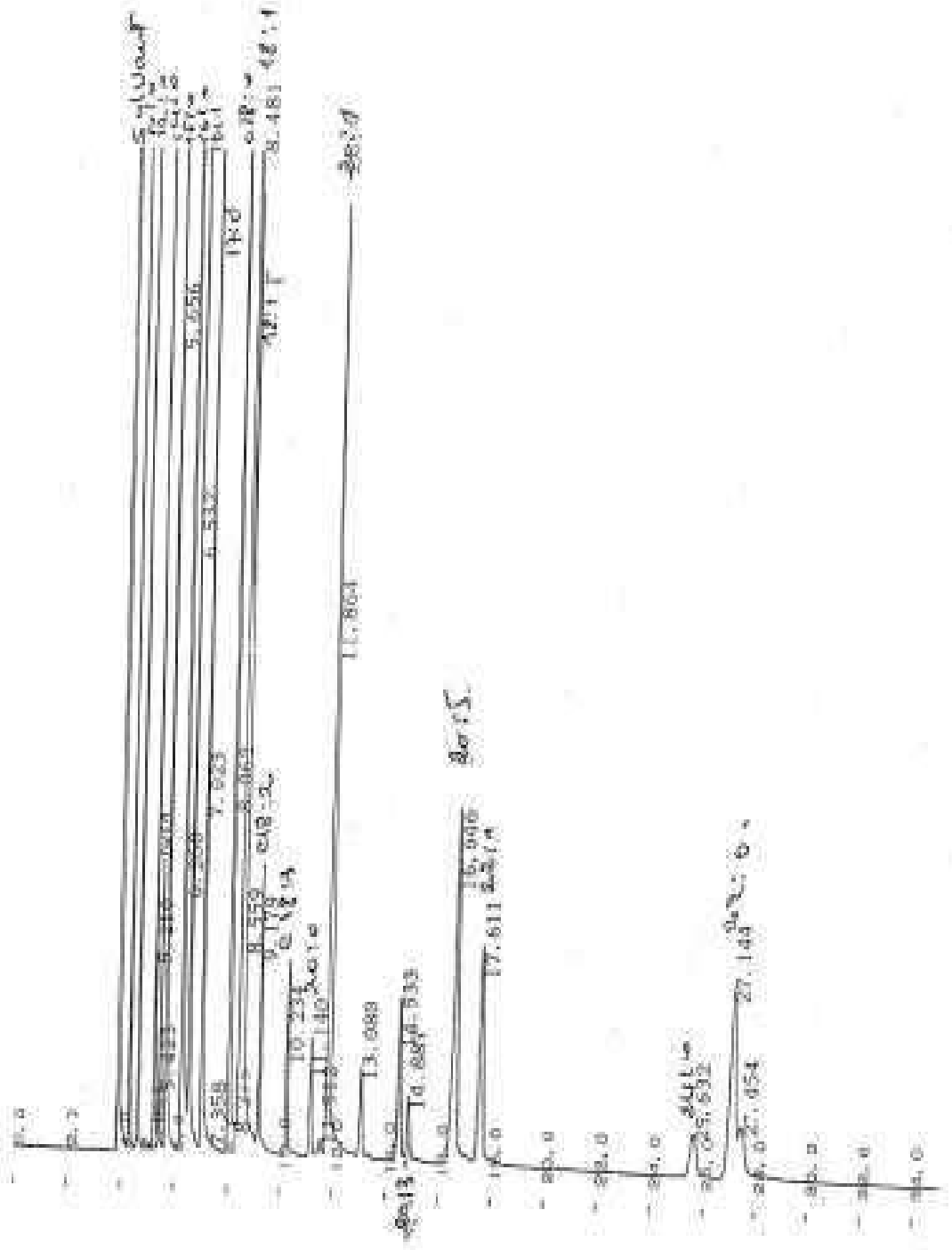


Profils chromatographiques de l'analyse, par CPG, des EMAG pour deux échantillons de la saison 2011.

5.A.RF1 **5.A.RF2**

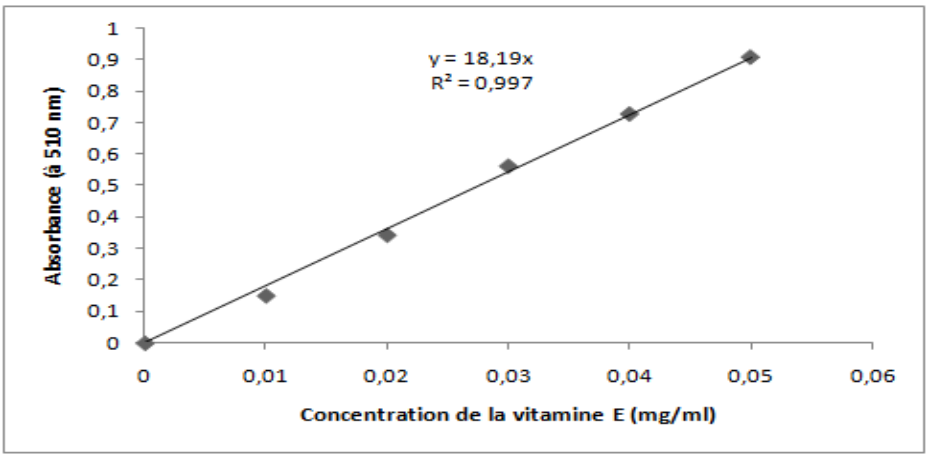


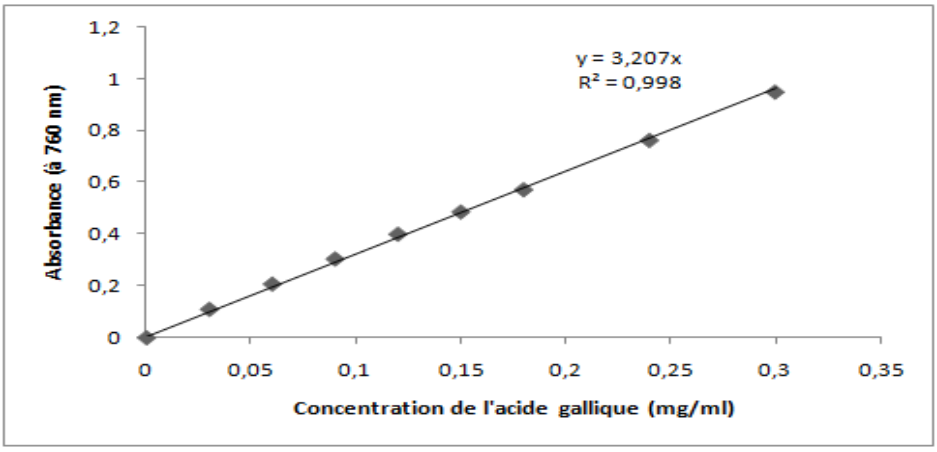
Profil chromatographique de l'analyse, par CPG, des EMAG standards utilisé pour l'identification des acides gras pour les échantillons de la saison 2011.

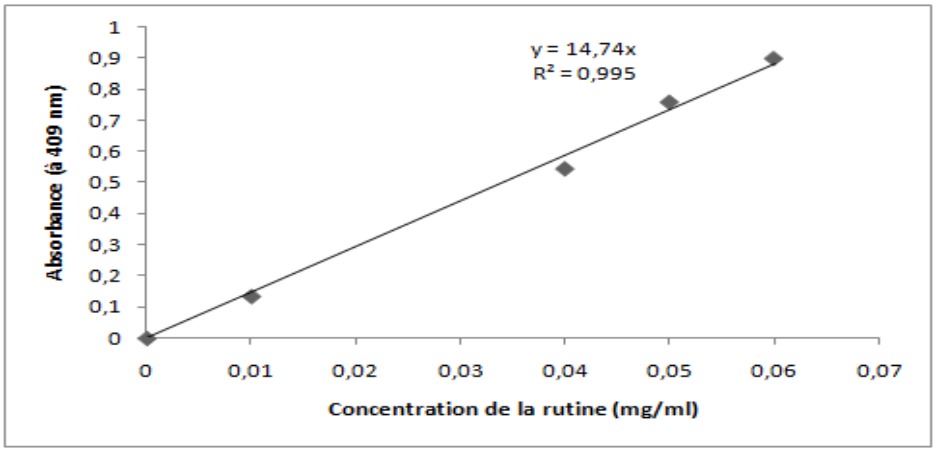


Annexe II

Droites d'étalonnage utilisées pour les dosages colorimétriques (tocophérols totaux, phénols totaux et flavonoïdes), pour les échantillons de la saison 2009.

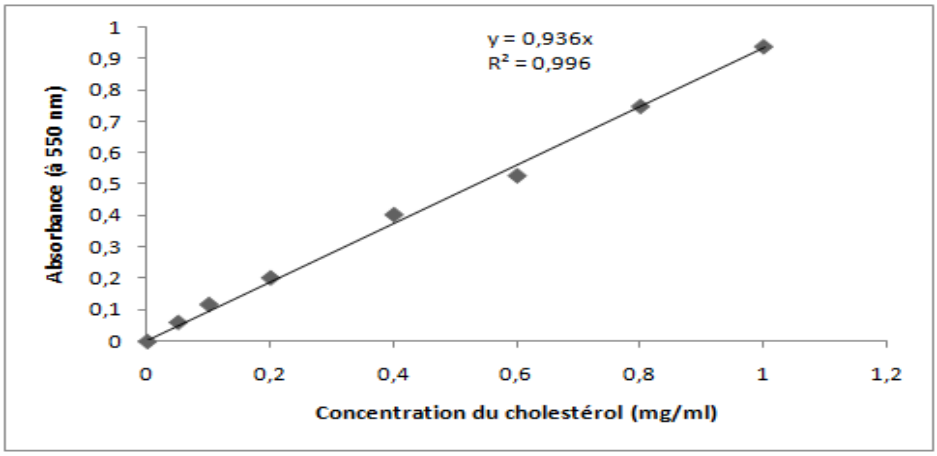


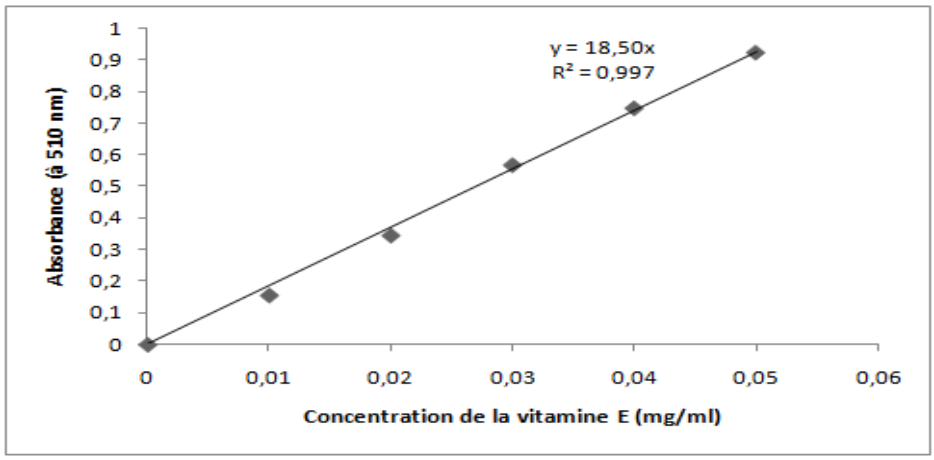


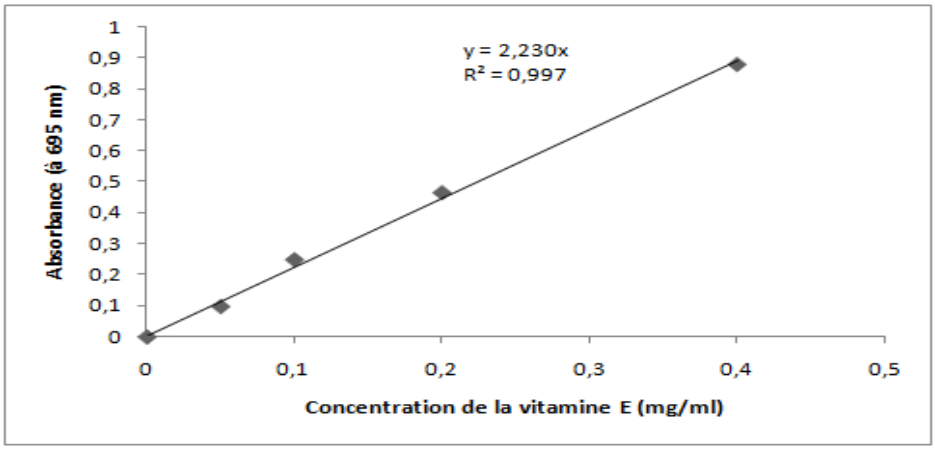


Droites d'étalonnage de, respectivement, la vitamine E, l'acide gallique et la rutine.

Droites d'étalonnage utilisées pour les dosages colorimétriques (stérols totaux et tocophérols totaux), et pour l'activité antioxydante de la vitamine E par le test Molybdate Phosphate, pour les échantillons de la saison 2011. Les phénols totaux et les flavonoïdes pour les saisons 2009 et 2011 ont été analysés en même temps.



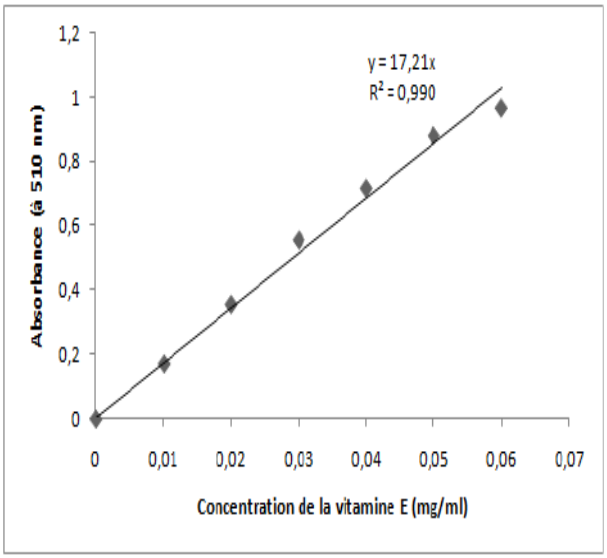




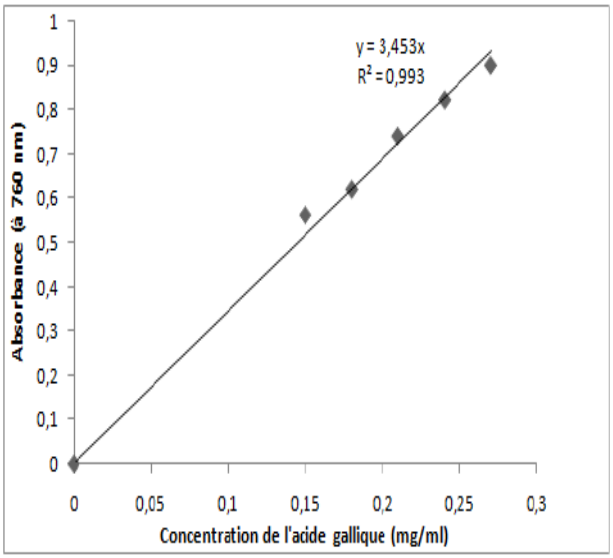
Droites d'étalonnage de, respectivement, cholestérol, la vitamine E et du pouvoir réducteur de la vitamine E.

Droites d'étalonnage utilisées pour les dosages colorimétriques (tocophérols totaux, phénols totaux et flavonoïdes), et pour l'activité antioxydante de la vitamine E par le test Molybdate Phosphate, pour les échantillons de la saison 2013.

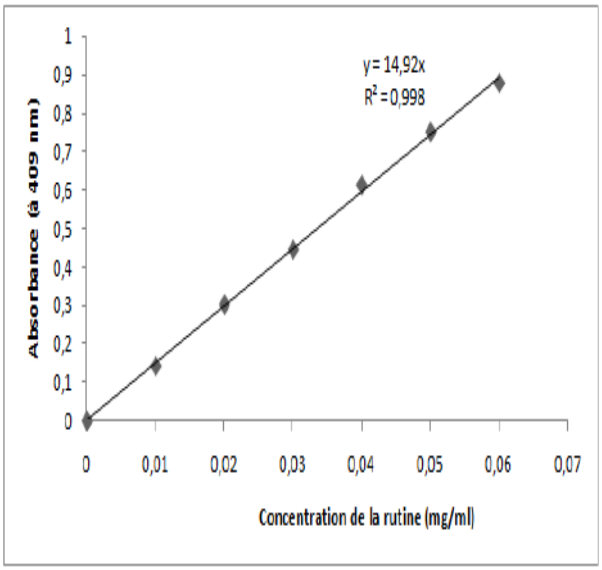
a



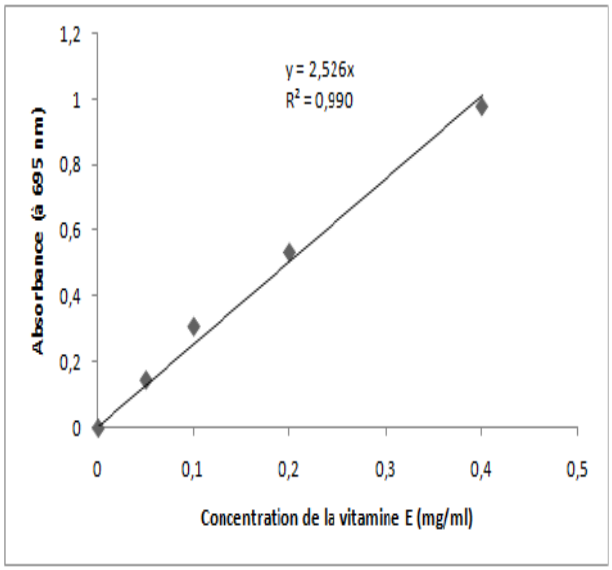
b



c

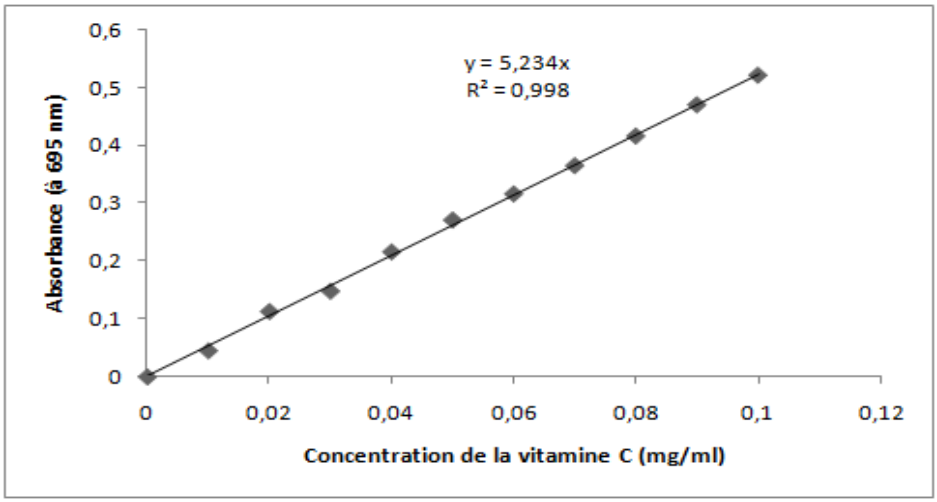


d



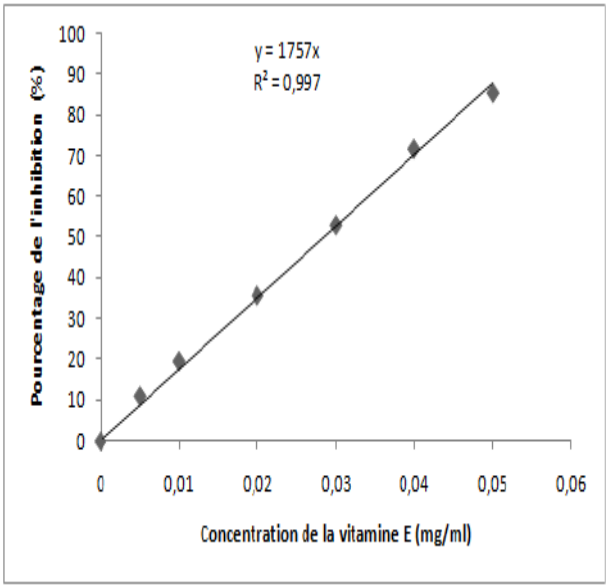
Droites d'étalonnage de la vitamine E (a), de l'acide gallique (b), de la rutine (c) et du pouvoir réducteur de la vitamine E (d).

Droite d'étalonnage utilisée pour l'activité antioxydante de la vitamine C par le test Molybdate Phosphate, pour les échantillons de la saison 2013.

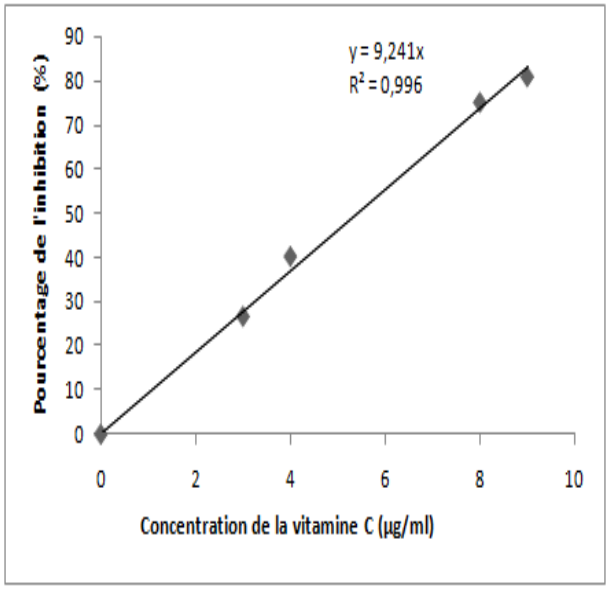


Droites d'étalonnages utilisées pour le calcul de l'EC_{50} de la vitamine E et de la vitamine C pour les échantillons de la saison 2009

a

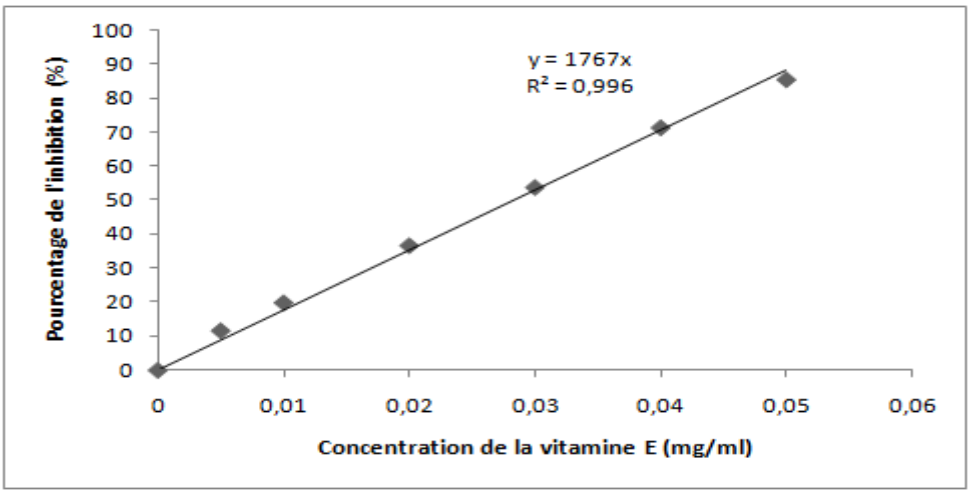


b



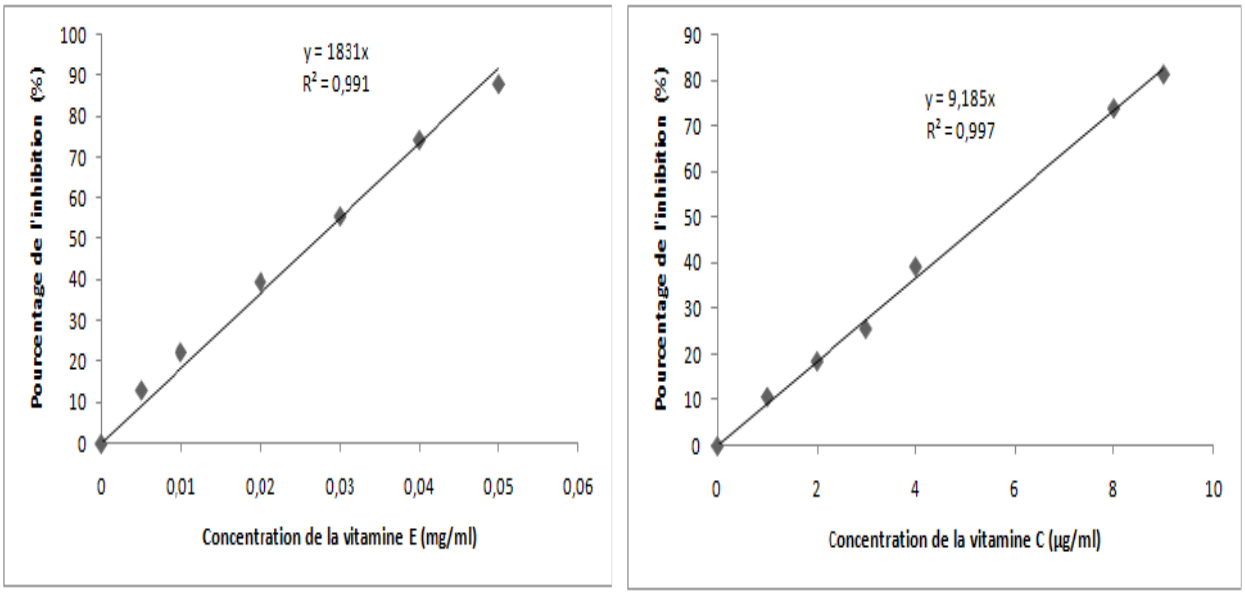
Droites d'étalonnage de l'activité antioxydante (DPPH) de la vitamine E (a) et de la vitamine C (b).

Droite d'étalonnage utilisée pour le calcul de l'EC_{50} de la vitamine E pour les échantillons de la saison 2011.



Droites d'étalonnages utilisées pour le calcul de l'EC_{50} de la vitamine E et de la vitamine C pour les échantillons de la saison 2013

a **b**



Droites d'étalonnage de l'activité antioxydante (DPPH) de la vitamine E (a) et de la vitamine C (b).

Annexe III

Rappels sur les indices d'acide, de saponification et d'iode.

Indice d'acide

C'est le nombre de milligramme de potasse nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans un gramme de corps gras.

- **Principe**

Il s'agit d'un titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution hydro-éthanolique de KOH selon la réaction.

$$R—COOH + KOH \rightarrow R—COO\ K + H_2O$$

- **Calcul**

L'indice d'acide est égal à :

$$\mathbf{IA} = \frac{V \,.\, 56{,}1 \,.\, N}{m}$$

V : volume en ml de la potasse utilisée pour le titrage.

N : normalité de la solution de potasse.

m : Masse de la prise d'essai (g).

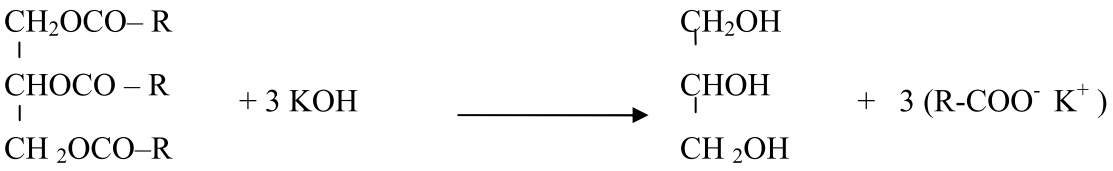
56,1 : Masse molaire du KOH (g/mole).

Indice de saponification

C'est la quantité de potasse exprimé en milligrammes nécessaire pour saponifier un gramme de corps gras.

- **Principe**

L'échantillon est soumis à l'ébullition sous réfrigérant à reflux avec une solution hydro-éthanolique de KOH. L'excès de KOH est titré avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique.



Les acides gras libérés réagissent avec KOH:

$$R\text{-}COOH + KOH \rightarrow R\text{-}COOK + H_2O$$

- **calcul**

Le calcul de l'indice saponification est fait à l'aide de la relation suivante :

$$IS = \frac{(V_0 - V_1).N.M_{KOH}}{m}$$

IS : indice de saponification.

V_0 : volume de HCl dans le test à blanc en ml.

V_1: volume de HCl en ml nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse dans l'essai.

N : Normalité de la solution de l'HCl.

M_{KOH} : masse molaire du KOH en g/mol.

m : masse d'huile en g.

Indice d'iode

C'est le nombre de gramme d'iode fixés par 100 grammes de corps gras dans les conditions de l'essai.

Nous avons choisi la méthode Wijs, qui est la plus utilisée, et qui utilise une solution de monochlorure d'iode dans l'acide acétique.

- **Principe**

Cet indice est mesuré par addition au corps gras, d'un excès de monochlorure d'iode en solution dans l'acide acétique ou réactif de Wijs. On introduit une quantité de réactif de Wijs en excès avec une masse d'huile connue avec précision. Après 60

minutes temps donné de réaction à l'obscurité, l'iode libéré dans un mélange d'iodure de potassium et d'eau est titré par une solution de thiosulfate de sodium de normalité connue.

Ce réactif s'additionne quantitativement sur les instaurations selon la réaction :

$$R\text{-}CH{=}CH\text{-}R' + ICl \longrightarrow R\text{-}CHI\text{-}CHCl\text{-}R'$$

Le réactif de Wijs qui n'est pas fixé sur les doubles liaisons est détruit lors de l'addition d'une solution d'iodure de potassium (KI) pour former du diiode I_2, selon la réaction :

$$ICl + K^+I^- \longrightarrow I_2 + K^+ Cl^-$$

Le titrage du diiode formé, par une solution connue de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$).

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons S_4O_6^{2-} + 2I^-$$

On réalise

- le titrage d'un témoin sans huile (ou titrage à blanc),
- le titrage après réaction de l'échantillon.

Par différence on détermine la quantité de diiode qui a réagi. Ce type de dosage est appelé titrage en retour ou indirect.

- **Calcul**

L'indice d'iode est donné par l'expression suivante:

$$\mathbf{II} = \frac{(V_0\text{-}V_1) \text{ X } 1{,}27 \quad g}{m} \quad \text{(en g d'}I_2\text{/100 g d'huile)}$$

V_0 : Volume en ml de thiosulfate de sodium exigé par le témoin.

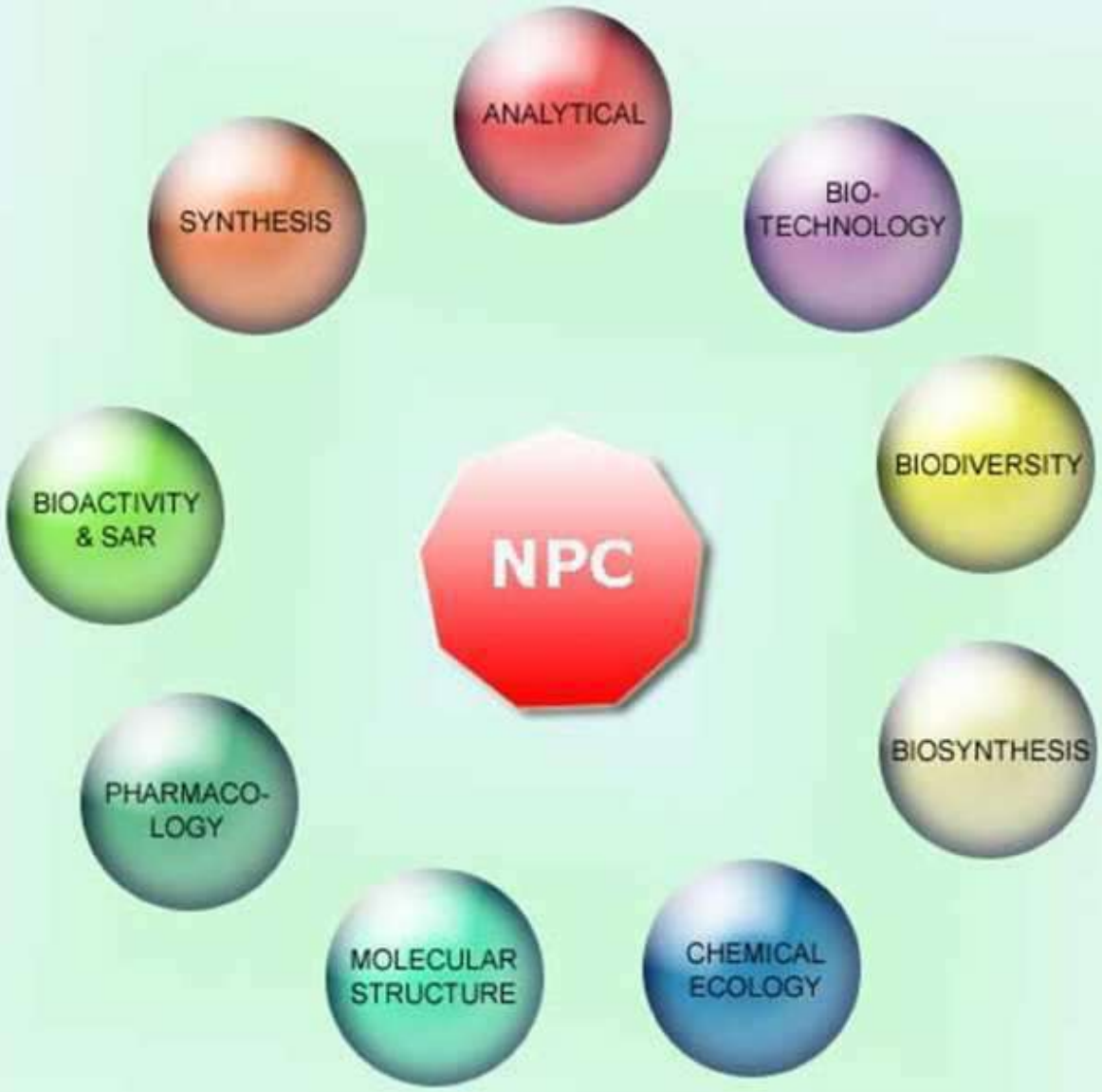
V_1 : Volume en ml de thiosulfate de sodium exigé par l'essai.

m : Masse de la prise d'essai (g).

Publication

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all Aspects of Natural Products Research



Volume 10. Issue 10. Pages 1641-1796. 2015
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

NPC Natural Product Communications

EDITOR-IN-CHIEF

DR. PAWAN K AGRAWAL
Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

HONORARY EDITOR

PROFESSOR GERALD BLUNDEN
The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

EDITORS

PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO
Department of Organic Chemistry,
University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR ALESSANDRA BRACA
Dipartimento di Chimica Bioorganicae Biofarmacia,
Universita di Pisa,
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy
braca@farm.unipi.it

PROFESSOR DE-AN GUO
State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,
School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University,
Beijing 100083, China
gda5958@163.com

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI
School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE
Department of Chemistry
University of Wollongong
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE
Department of Chemistry,
Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER
Department of Chemistry
The University of Alabama in Huntsville
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Hokuriku University
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON
Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
david.thurston@kcl.ac.uk

ADVISORY BOARD

Prof. Viqar Uddin Ahmad
Karachi, Pakistan
Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy
Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan
Prof. Roberto G. S. Berlinck
São Carlos, Brazil
Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy
Prof. Maurizio Bruno
Palermo, Italy
Prof. César A. N. Catalán
Tucumán, Argentina
Prof. Josep Coll
Barcelona, Spain
Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA
Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey
Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal
Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain
Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada
Prof. Dominique Guillaume
Reims, France
Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India
Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan
Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan
Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria
Prof. Vladimir I Kalinin
Vladivostok, Russia
Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam
Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa
Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan
Prof. Hartmut Laatsch
Gottingen, Germany
Prof. Marie Lacaille-Dubois
Dijon, France
Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan
Prof. Imre Mathe
Szeged, Hungary
Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada
Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium
Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany
Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia
Prof. Luca Rastrelli
Fisciano, Italy
Prof. Stefano Serra
Milano, Italy
Prof. Monique Simmonds
Richmond, UK
Dr. Bikram Singh
Palampur, India
Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada
Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa
Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia
Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies
Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia
Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site http://www.naturalproduct.us.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2015 subscription price: US$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US$2,995 (Print + single site online); US$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

NPC Natural Product Communications

2015
Vol. 10
No. 10
1723 - 1728

Effect of Maturation Degree on Composition of Fatty Acids and Tocopherols of Fruit Oil from *Pistacia atlantica* Growing Wild in Algeria

Hamid Guenane[a], Isabelle Bombarda[b], Mohamed Didi OuldElhadj[c] and Mohamed Yousfi[a,*]

[a]*Laboratoire des Sciences Fondamentales, Université Amar Télidji, Laghouat (03000), Algeria*

[b]*Aix Marseille Université, LISA, EA4672, Equipe METICA, 13397 Marseille cedex 20, France*

[c]*Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi arides, Université KasdiMerbah, Ouargla (30000), Algeria*

yousfim8@gmail.com

Received: June 3rd, 2015; Accepted: July 10th, 2015

Pistacia atlantica fruit oil has been used for a long time by local populations for culinary and medicinal purposes. In this study, the fatty acid composition and tocopherol content were determined in twelve samples of *P. atlantica* fruit oil at three stages of maturation (immature, intermediate maturity and mature) collected in three different sites from the region of Laghouat. The results indicated a significant difference between the oil of mature fruits (green and black) and the immature ones (light red), which were distinguished by richness in unsaturated fatty acids and tocopherols. The oil from fruits of intermediate maturity (dark red) seems to combine these properties with those of the mature group, including oil yields. Such data emphasize the value of this oil, which needs further investigation.

Keywords: *Pistacia atlantica*, Fruit oil, Fatty acids, Tocopherols, Maturity.

Fruits of *Pistacia atlantica* Desf. are widely consumed by the local population as a nutriment. The oil extracted from the fruit is usually used in traditional medicines against several diseases, such as inflammation [1]. Several works have revealed that plants constitute a major source of natural bioactive compounds, including essential oil [2, 3]. Among these plants, *P. atlantica* has a great value because of the antioxidant activity of its extracts [4, 5], the composition of its fruit oil [6, 7], its flavonoid content [8] and its anti-cancer activities [9]. All these virtues explain its diverse uses by local populations.

There are no data available on the variation of the composition of *P. atlantica* fruit oil, according to the degree of maturation. The aim of this work was the study of the fatty acid and tocopherol composition of the oil extracted from *P. atlantica* fruits, stemming from several sites in Laghouat, according to the degree of maturation. Such an approach could supply useful and exploitable information for possible applications.

Oil obtained from *P. atlantica* mature fruits has a clear yellow color with a pleasant smell, whereas, oil of immature fruits gives a green color with a very pleasant smell. Results of oil content are shown in Table 1. The oil content varies considerably according mainly to the maturation degree. Indeed, the highest yields (from 27.7% to 46.1 %) were obtained from mature fruits (green or black) compared with immature ones (p<0.001). Fruits of intermediate maturity have medium oil content (20.1% and 35.0%). Our results are similar to those reported for *P. lentiscus* [10, 11]. It seems from our results that the accumulation of oil in *P. atlantica* fruits occurs during maturation.

Nine fatty acids commonly found in vegetable oils were detected in the oil of *P. atlantica* fruits (Table 2). Palmitic acid (C16:0) was the most predominant saturated fatty acid. It represents between 13.9 % and 21.9 % for the immature fruits, and between 22.1 % and 25.7 %

Table 1: Oil content according to the maturation stage.

Sample	Oil (% w/w)	Mean of immature samples	Mean of intermediate samples	Mean of mature samples
G1	27.7			
DR1	20.1			
LR1	16.6			
G2	37.7			
DR2	35.0			
LR2	16.8	13.8±4.6**	27.5±10.5	37.8±6.2
G3	37.7			
LR3	7.0			
G4	41.7			
LR4	14.9			
B1	46.1			
B2	35.7			

**p<0.001; (compared with mature samples).

for the mature fruits. Stearic (C18:0), myristic (C14:0) and arachidic (C20:0) acids were found, but in a lower proportion. Concerning the unsaturated fatty acids, palmitoleic, oleic, linoleic and linolenic acids were found in all the oils. They represent a total percentage from 72.7 to 75.8 for the mature fruits, and from 75.9 to 83.7 for the immature fruits. Oleic acid, and in second place linoleic acid, were the most predominant unsaturated fatty acids. Their proportions were slightly higher in the oil of immature fruits. It should be noted that the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids was significantly higher in immature fruit oil compared with the mature ones (p<0.05). This ratio was also elevated in samples with intermediate maturity (Table 2). These results are comparable with those reported for *P. lentiscus*, in particular concerning linoleic acid [10, 11]. The high level of unsaturated fatty acids in *P. atlantica* fruit oil makes it a dietary nutriment.

In spite of the nutritional importance of tocopherols [12, 13], their content and composition in *P. atlantica* seed oils remain unknown. Tocopherols analysis was performed for eleven samples. Figure 1 shows chromatograms of three samples (with different maturation degrees) from the same tree. Peaks corresponding to tocopherol

Table 2: Fatty acids composition of *P. atlantica* samples obtained by CG (%).

Fatty acids	Samples											
	G1	DR1	LR1	G2	DR2	LR2	G3	LR3	G4	LR4	B1	B2
C14:0	0.09	0.08	0.1	0.07	0.07	0.1	Tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.08
C16:0	25.1	17.5	13.9	25.0	21.9	14.8	25.7	17.3	24.3	21.1	22.6	22.1
C16:1ω7	0.5	0.7	0.3	0.4	0.4	0.4	0.8	0.3	0.7	0.9	1.8	3.1
C18:0	1.9	2.2	2.2	1.8	2.1	2.1	1.6	2.4	2.6	2.0	1.5	2.0
C18:1ω9	49.6	53.1	51.7	47.4	48.6	51.2	41.7	48.0	40.4	48.3	50.1	40.21
C18: 2	22.0	25.6	30.8	24.4	26.2	30.8	29.4	30.8	30.8	26.6	23.1	32.9
C 18 :3w3	0.8	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	0.8	0.9	1.0	0.9	0.8	1.1
C20:0	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
C20:1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
ΣSFA	27.1	19.7	16.2	26.9	24.0	17.0	27.2	27.3	27.1	23.2	24.2	24.2
ΣMUFA	50.1	53.8	52.0	47.8	49.0	51.6	42.5	48.4	41.2	49.2	51.9	41.9
ΣPUFA	22.8	26.3	31.7	25.1	27.0	31.4	30.2	31.7	31.80	27.5	23.9	33.9
ΣUFA	72.9	80.2	83.7	73.0	75.9	83.0	72.7	80.1	73.0	76.8	75.8	75.8
ΣUFA/ΣSFA	2.7	4.6	5.1	2.8	4.65	4.9	2.7	2.9	2.7	3.3	3.1	1.7

Mean of ΣUFA/ΣSFA	Immature samples	Intermediate maturity samples	Mature samples
	4.06±1.11*	4.65±0.01	2.85±0.22

SFA saturated fatty acids, *MUFA* monounsaturated fatty acids, *PUFA* polyunsaturated fatty acids, *UFA* unsaturated fatty acids, *Tr* trace. *p<0.05 (compared with mature samples).

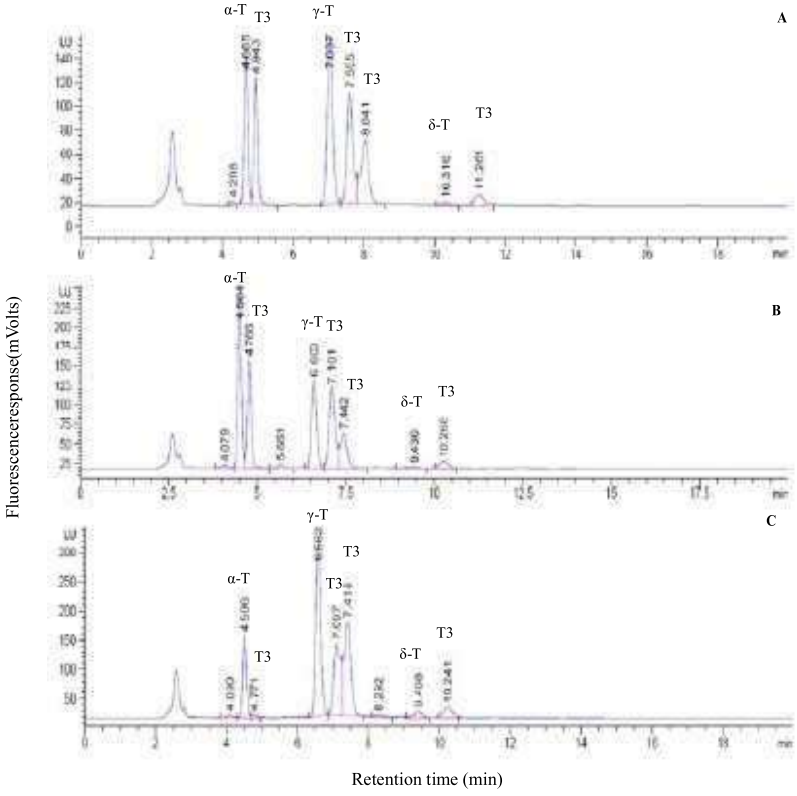


Figure 1: FLD-HPLC tocopherols chromatograms of 3 samples of different maturation degree issued from the same tree. A: mature sample (G2), B: sample of intermediate maturity (DR2) and C: immature sample (LR2). Tocopherols (T) were identified by co-injection with commercial standards. T3 means tocotrienols which were attributed by comparison with chromatograms obtained under similar conditions by Kamal-Eldin *et al.* [14] and Nielsen and Hansen [15]

isomers were identified by co-injection with commercial standards. α-Toc, γ-Toc and δ-Toc were detected, but β-Toc only in trace amounts. The other peaks most probably correspond to tocotrienols (more polar than tocopherols), which were attributed by comparison with chromatograms obtained under similar conditions by Kamal-Eldin *et al.* [14] and Nielsen and Hansen [15].

The quantification of tocopherols by liquid chromatography was based on an external standard method using α-tocopherol. The results are expressed as mg α-tocopherol equivalents per 100 g of oil. Results are presented in Table 3. Total tocopherol content shows differences between individuals and groups (immature fruits, fruits with intermediate maturity and mature fruits). We note a significant difference between the two main groups (mean value

Table 3: Total tocopherols content and relative composition of tocopherols of *P. atlantica* fruits oil (mg/100g oil).

Sample	Total tocopherols	Relative composition[a]		
		α-Toc	γ-Toc	δ-Toc
G1	51.5	22.5 (43.6%)	27.3 (52.9%)	1.8 (3.4%)
DR1	50.0	16.0 (31.9%)	31.8 (63.6%)	2.2 (4.5%)
LR1	nd	nd	nd	nd
G2	30.6	11.1 (36.2%)	17.9 (58.5%)	1.6 (5.32)
DR2	38.6	21.4 (55.4%)	15.4 (39.9%)	1.8 (4.7%)
LR2	49.4	11.8 (24.0%)	34.8 (70.5%)	2.7 (5.5%)
G3	22.61	7.5 (33.2%)	13.4 (59.2%)	1.7 (7.6%)
LR3	59.2	32.6 (55.1%)	23.0 (38.9%)	3.6 (6.0%)
G4	36.2	19.6 (53.9%)	15.5 (42.9%)	1.1 (3.2%)
LR4	43.5	29.0 (66.8%)	12.7 (29.2%)	1.7 (3.9%)
B1	23.8	11.8 (49.8%)	10.1 (42.7%)	1.8 (7.5%)
B2	39.9	14.6 (36.5%)	23.5 (59.0%)	1.8 (4.5%)
Mean of immature samples	50.7±7.9*	24.5±11.1 (48.6±22.1%)	23.5±11.0 (46.2±21.6%)	2.7±0.9* (5.1±1.1%)
Mean of intermediate samples	44.3±8.1	18.7±3.8 (43.66±16.6%)	23.6±11.6 (51.8±16.7%)	2.0±0.3 (4.6±0.1%)
Mean of mature samples	34.1±10.9	14.5±5.6 (42.2±8.3%)	18.0±6.4 (52.5±7.9%)	1.6±0.24 (5.2±1.9%)

[a] relative composition of tocopherols determined by HPLC, nd not determined. *p<0.05 (compared with mature samples).

50.7±7.9 mg/100 g for the immature fruits *versus* a mean value 34.1±10.9 mg/100 g for the mature group, $p<0.05$). Intermediate maturity samples had an intermediate value of 44.3±8.1 mg/100 g.

The predominant tocopherols in *P. atlantica* fruit oil were α- and γ-tocopherol with values ranging from 7.5 to 32.6 mg/100 g and from 10.1 to 34.8 mg/100 g, respectively. Their amounts were slightly higher in immature fruit oil. δ-Tocopherol was detected in all samples, but in low amounts. Its amount was significantly elevated in immature fruit oil ($p<0.05$). The proportion of γ-tocopherol was slightly elevated in mature fruits and the one of intermediate maturity (52.5±7.9% and 51.8±16.7%, respectively). To our knowledge, this is the first time that all tocopherols of *P. atlantica* fruit oil have been analyzed on a polar silica column, which allows for a good separation not only for the four isomers but also the corresponding tocotrienols (Figure 1). It seems that there is a difference between the studied groups concerning tocotrienol isomers, but a study of tocotrienol composition is necessary to confirm these observations

Saber-Tehrani *et al.* studied the tocopherol composition of Iranian *P. atlantica* cold pressed oil using a C-18 Lichrospher RP-100 apolar column and they reported that α-tocopherol was largely the most predominant [16]. Ours results on *P. atlantica* seem to be similar to those of Matthäus and Özcan for *P. terebinthus* [17]. *P. atlantica* fruit oil appears to be richer in tocopherols (particularly in the immature stage) than other food vegetable oils such as sunflower oil (67 mg/100 g) and olive oil (20 mg /100 g) [18]. This richness would supply to the oil beneficial properties. Indeed, tocopherols, notably α-tocopherol, not only have a protective effect on cells against oxidative stress, inflammatory response, lipid peroxidation and cancer, but contribute to the natural protection and conservation of the oil against oxidative deterioration [12, 13, 17, 19]. We should not neglect the anticancer, antidiabetic and cardioprotective effect of tocotrienols, which are now clearly demonstrated [20]. Thus, the study of these compounds in *P. atlantica* fruit oil is of a great interest.

The results of both studies, *i.e.*, fatty acids and tocopherols, allowed us to establish the dissimilarity dendrograms for these compounds using the XLStat software and literature data reported for other oils [18, 21-25]. Dendrograms are shown in Figure 2.

The fatty acids composition of *P. atlantica* fruit oil showed a similarity with vegetable oils of high dietary value such as olive oil and peanut oil (Figure 2A). Concerning tocopherols (Figure 2B), the dendrogram indicated two main groups: the first contains oils where α-Toc was largely the most predominant, such as olive oil, sunflower oil and palm oil; the second includes oils with substantial amounts of both α- and γ-Toc, such as rapeseed oil and corn oil. *P. atlantica* fruit oil seems to belong to this latter group.

According to the maturation stage, the dendrogram showed that our oil could be divided into two distinct subgroups. One subgroup was represented by the immature fruit oil, which was characterized by richness in both α- and γ-Toc. The second was composed of mature fruit oils and those of intermediate maturity that was slightly dominated by γ- over α-Toc. This observation should be confirmed by further investigations.

Finally, we can say that our work has brought very interesting and original preliminary results supporting the fact that *P. atlantica* fruit oil before full maturity might be a healthy diet and a valuable source of non-toxic natural bioactive molecules.

However, further studies are needed for the assessment of the biological activities of these compounds.

Experimental

Plant material: *Pistacia atlantica* fruits were collected in August and September 2011 at 3 different sites from the region of Laghouat. After air-drying in the shade at room temperature for one week, 12 samples were used for this study. These samples were divided into 3 groups according to the maturation degree revealed by the skin color. It is important to note that fruit maturation does not take place in an identical way for the same tree. Indeed, there are fruits which finish their maturation prematurely and others later. In that case it is not surprising to find mature fruits at the beginning of August and immature fruits at the end of September. The characteristics of samples are shown in Table 4.

Reagents and standards: Chemicals were purchased from Sigma (USA), Aldrich (Milwaukee, USA), Fluka Chemie (Buchs, Switzerland) and Merck (Germany).

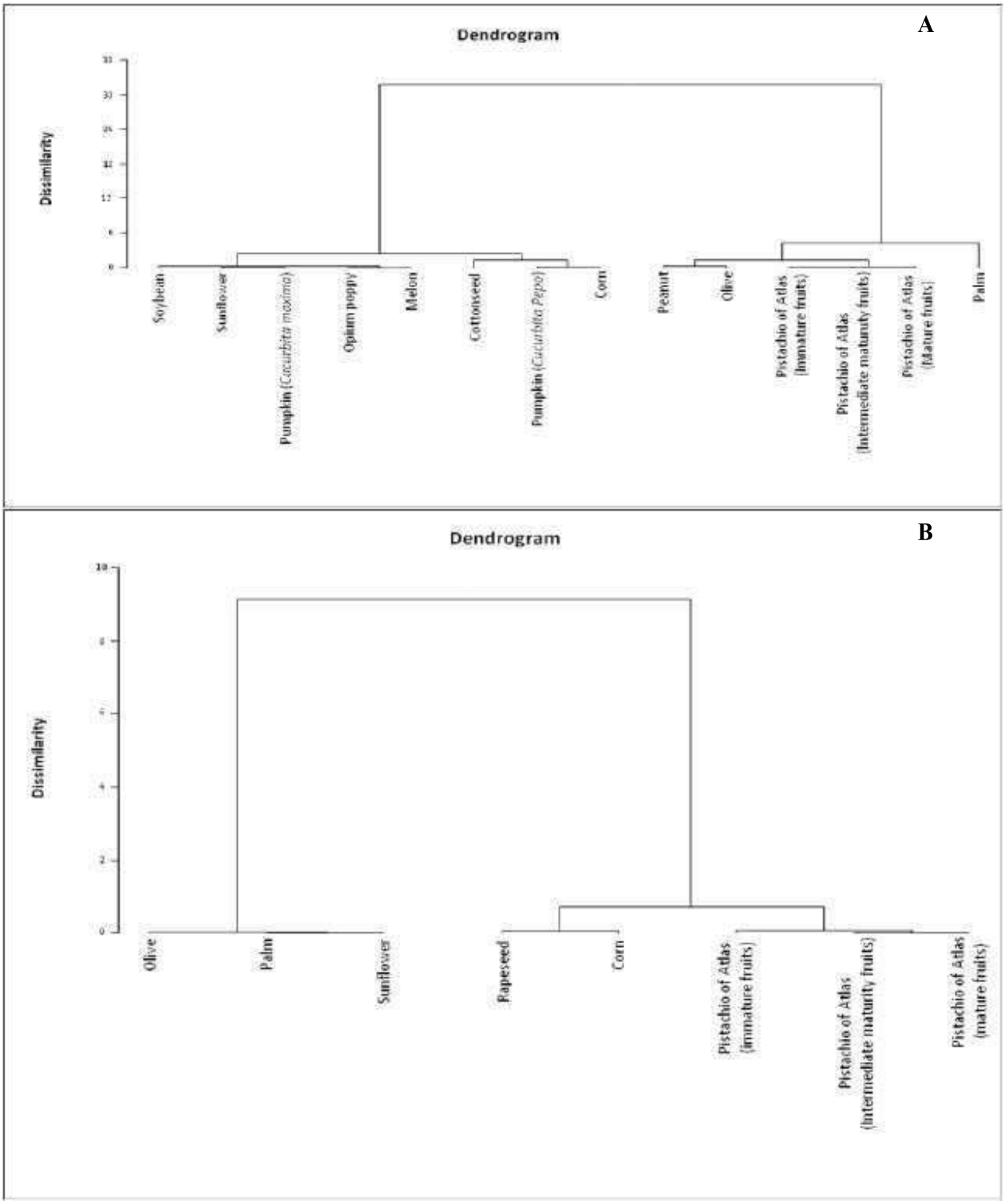


Figure 2: Dissimilarity dendrograms of different vegetable oils including *P. atlantica* fruit oil (with three stages of maturation; immature, intermediate maturity and mature) according to their fatty acids (A) and tocopherols composition (B).

Table 4: Characteristics of *P. atlantica* fruits samples.

Sample	Color of the skin	Degree of maturation	Month of harvest	Site of harvest
G1 [a]	Green	Mature	August	Site 1
DR1[a]	Dark red	Intermediate maturity	August	Site 1
LR1[a]	Light red	Immature	August	Site 1
G2[a]	Green	Mature	September	Site 1
DR2[a]	Dark red	Intermediate maturity	September	Site 1
LR2[a]	Light red	Immature	September	Site 1
G3[b]	Green	Mature	September	Site 2
LR3[b]	Light red	Immature	September	Site 2
G4	Green	Mature	September	Site 3
LR4	Light red	Immature	September	Site 3
B1	Black	Mature	September	Site 3
B2	Black	Mature	September	Site 3

[a] and [b] mean that the fruits were collected from the same tree in sites 1 and 2, respectively.
Site 1: 2°59'32,58"E, 33°30'37,07"N, 873m; Site 2 : 2°39'44,19"E, 33°41'23,50"N, 836 m; site 3 : 3°21'16,07"E, 33°09'17,84"N, 736m.

Oil extraction: The fruits (100 g) were milled into powder using a manual mill and extracted with *n*-hexane (150 mL) by stirring at room temperature for 48 h. Samples were then dehydrated with anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40°C. The dried crude oils were stored at +4°C until use.

Fatty acids methyl ester preparation and gas chromatography (GC) analysis: Fatty acid methyl esters (FAMEs) were prepared by refluxing 0.5 g of oil samples with 25 mL of 0.5% sodium methylate solution for 20 min. After cooling, 50 mL of distilled water and 25 mL of *n*-hexane were added to the mixture. The organic phase that contains FAMEs was then recovered, washed and dried over anhydrous sodium sulfate. After filtration and evaporation of *n*-hexane, FAMEs were purified by flash chromatography over silica gel as stationary phase and chloroform as the mobile phase.

FAMEs were analyzed on a Chrompack CP 9002 gas chromatograph equipped with a split-splitless mode injection system, flame ionization detector (FID) and a DB23 capillary column (30 m x 0.32 mm i.d., 0.32 µm film thickness). Oven temperature was in isotherm mode (250°C). Injector and detector temperatures were set at 250°C. Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 1 µL. The fatty acids were identified by comparison of their retention times with those of pure standards.

Tocopherol analysis: Prior to HPLC analysis, 35 mg of seed oil was diluted with 1 mL *n*-hexane and 20 µL of the solution was injected. Tocopherols were analyzed by HPLC using an Agilent 1290 Infinity apparatus equipped with a Quaternary Pump Model 1260, an automatic liquid sample and a fluorimetric detector (FLD 1260). The detection was set at 295 nm for excitation wavelength and at 330 nm for emission wavelength. The separation column was a SI60 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, Lichrosorb, Merck KGaA Darmstadt, Germany). The mobile phase was *n*-hexane/isopropanol, 99/1, v/v, in isocratic mode, with a flow rate set at 1 mL/min, during 20 min. Column compartment was set at 25ºC. Commercial standard (α-Toc) and a mixt (α-Toc, β-Toc, γ-Toc and δ-Toc) were co-injected with samples for the identification of tocopherol isomers.

Statistical analysis: Student's test was used for the statistical comparisons. Differences were considered to be significant at $p<0.05$, $p<0.01$ or $p<0.001$. The dissimilarity dendrograms to compare *P.atlantica* fruit oil with various vegetable oils were made using XL Stat software.

References

[1] Benabderrahmane M, Benali M, Aouissat H, Jordan Buesso M-J. (**2009**) Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie*, *7*, 304-308.

[2] (a) Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (**2006**) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, ***97***, 654–660; (b) Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni A, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. (**2009**) Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, ***112***, 303–309.

[3] Gourine N, Bombarda I, Yousfi M, Emile M. Gaydou EM. (**2010**) Chemotypes of *Pistacia atlantica* leaf essential oils from Algeria. *Natural Product Communications*, ***5***, 115-120.

[4] Gourine N, Yousfi M, Bombarda I, Nadjemi B, Stocker P, Gaydou E-M. (**2010**) Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, ***31***, 203–208.

[5] Peksel A, Arisan I, Yanardag R. (**2013**) Radical scavenging and anti-acetylcholinesterase activities of aqueous extract of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) leaves. *Food Science and Biotechnology*, ***22***, 515-522.

[6] Yousfi M, Nedjmi B, Bellal R, Ben Bertal D, Pallad G. (**2002**) Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ***79***, 1049-1050.

[7] Yousfi M, Nadjemi B, Belal R, Bombarda I, Gaydoud E-M. (**2005**) Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* fruit growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ***82***, 93-96.

[8] Mosharrafa SAM, Kawashty SA, Saleh NAM. (**1999**) Flavonoids of *Pistacia atlantica* Desf. *Bulletin of the National Research Centre (Egypt)*, ***24***, 109–114.

[9] Rezaei PF, Fouladdel Sh, Hassani Sh, Yousefbeyk F, Ghaffari SM, Amin Gh, Azizi A. (**2012**) Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food and Chemical Toxicology*, ***50***, 1054–1059.

[10] Charef M, Yousfi M, Saidi M. (**2008**) Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ***85***, 921-924.

[11] Trabelsi H, Cherif OA, Sakouhi F, Villeneuve P, Renaud J, Barouh N, Boukhchina S, Mayer P. (**2012**) Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*, ***131***, 434-440.

[12] Kamal-Eldin A, Appelqvist L. (**1996**) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, ***31***, 671-701.

[13] Hussain N, Irshad F, Jabeen Z, Haider-Shamsi I, Li Z, Jiang L. (**2013**) Biosynthesis, structural, and functional attributes of tocopherols in planta; past, present, and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***61***, 6137-6149.

[14] Kamal-Eldin A, Görgen S, Pettersson J, Lampi AM. (**2000**) Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, ***881***, 217–227.

[15] Nielsen MM, Hansen A. (**2008**) Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chemistry*, ***85***, 248–251.

[16] Saber-Tehrani M, Givianrad MH, Aberoomand-Azar P, Waqif-Husain S, Jafari Mohammadi SA. (**2013**) Chemical composition of Iran's *Pistacia atlantica* cold-pressed oil. *Journal of Chemistry*, *Volume* ***2013***, 1-6.

[17] Matthäus B, Özcan MM. (**2006**) Quantification of fatty acids, sterols and tocopherols in Turpentine (*Pistacia terebenthus* Chia) growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***54***, 7667-7671.
[18] Karlenskind A. (**1992**) Manuel des corps gras. Tome 1 Technique et documentation. Lavoisier, Paris, France, 120-207.
[19] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, Alarcon-de-la-Lastra C. (**2014**) Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chemistry*, ***147***, 117-123.
[20] Wong RSY, Radhakrishnan AK. (**2012**) Tocotrienol research: past into present. *Nutrition Reviews*, ***70***, 483-490.
[21] Rezanka T. (**1999**) Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, ***398***, 253-261.
[22] Feeter DK. (**1974**) Determination of tocopherols, sterols, and steryl esters in vegetable oil distillates and residues. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ***51***, 184-187.
[23] Changbumrung S, Buavatana T, Migasena P. (**1980**) Alpha-tocopherol in vegetable oils. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, ***50***, 242-246.
[24] Giacometti J. (**2001**) Determination of aliphatic alcohols, squalene, alpha-tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst*, ***126***, 472-475.
[25] Schwartz H, Ollilainen V, Piironen V, Lampi A.M. (**2008**) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, ***21***, 152-161.

A Novel Ellagic Acid Derivative from *Desbordesia glaucescens*
Faustine L. DongmoMafodong, Apollinaire Tsopmo, Maurice D. Awouafack, Tchuenguem T. Roland, Jean P. Dzoyem and Pierre Tane **1709**

Proliferative Constituents from the Leaves of *Micromelum integerrimum*
Yuan-bin Hu, Jun-ying Sun, Tang-yun Yu, Jing-cheng Wang, Jin-shan He, Yue-lai Zhou and Xian-wen Li **1711**

Xylactam B, A New Isobenzofuranone from an Endophytic *Xylaria* sp.
Nelum P. K. G. Piyasena, Anja Schüffler and Hartmut Laatsch **1715**

Separation of Aeruginosin-865 from Cultivated Soil Cyanobacterium (*Nostoc* sp.) by Centrifugal Partition Chromatography \combined with Gel Permeation Chromatography
José Cheel, Mirjana Minceva, Petra Urajová, Rabya Aslam, Pavel Hrouzek and Jiří Kopecký **1719**

Effect of Maturation Degree on Composition of Fatty Acids and Tocopherols of Fruit Oil from *Pistacia atlantica* Growing Wild in Algeria
Hamid Guenane, Isabelle Bombarda, Mohamed Didi OuldElhadj and Mohamed Yousfi **1723**

Chemoenzymatic Total Synthesis of (*R*)-4-Dodecanolide and (*R*)-4-Octanolide
Chittamuru Sreelakshmi, Adari Bhaskar Rao, Mangamoori Lakshmi Narasu, Anugu Srinivas Reddy, Palakondu Janardhan Reddy and Basi V. SubbaReddy **1729**

Inspired by Nature: The Use of Plant-derived Substrate/Enzyme Combinations to Generate Antimicrobial Activity *in situ*
Ethiene Castellucci Estevam, Sharoon Griffin, Muhammad Jawad Nasim, Dariusz Zieliński, Justyna Aszyk, Magdalena Osowicka, Natalia Dawidowska, Rinaldi Idroes, Agnieszka Bartoszek and Claus Jacob **1733**

Effect of Supplementation with Wheat Bran Aqueous Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Technologies on the Sensory Properties and the Antioxidant Activity of Dry Pasta
Antonella Pasqualone, Laura Nunzia Delvecchio, Giuseppe Gambacorta, Barbara Laddomada, Valeria Urso, Agata Mazzaglia, Paolo Ruisi and Giuseppe Di Miceli **1739**

Development of SCAR Markers Based on Improved RAPD Amplification Fragments and Molecular Cloning for Authentication of Herbal Medicines *Angelica sinensis, Angelica acutiloba* and *Levisticum officinale*
Chun Zhang, Zhiqiang Mei, Jingliang Cheng, Yin He, Md. Asaduzzaman Khan, Peiyi Luo, Saber Imani and Junjiang Fu **1743**

Chemical Composition of *Blumea lacera* Essential Oil from Nepal. Biological Activities of the Essential Oil and (*Z*)-Lachnophyllum Ester
Prabodh Satyal, Bhuwan K. Chhetri, Noura S. Dosoky, Samon Shrestha, Ambika Poudel and William N. Setzer **1749**

Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Hyptis colombiana* from the Venezuelan Andes
Mayalin Flores, Luis Rojas, Rosa Aparicio, María Eugenia Lucena and Alfredo Usubillaga **1751**

Repellent and Anti-quorum Sensing Activity of Six Aromatic Plants Occurring in Colombia
Leonor Cervantes-Ceballos, Karina Caballero-Gallardo and Jesus Olivero-Verbel **1753**

Chemical Composition and Larvicidal Activity of Greek Myrtle Essential Oils against *Culex pipiens* biotype *molestus*
Aikaterini Koutsaviti, Irene Lignou, Ioannis Bazos, George Koliopoulos, Antonios Michaelakis, Athanassios Giatropoulos and Olga Tzakou **1759**

Chemical Composition Variability of the Herb Essential Oil in the Ontogenesis of *Artemisia campestris* subsp. *campestris*
Anna Lis, Martyna Kowal and Joanna Kończak **1763**

Accounts/Reviews

Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity
Rita de Cássia da Silveira e Sá, Luciana Nalone Andrade and Damião Pergentino de Sousa **1767**

The Interaction of Alpha-synuclein with Membranes and its Implication in Parkinson´s Disease: A Literature Review
Azucena Gonzalez-Horta **1775**

Herbal Supplements and Hepatotoxicity: A Short Review
Haszianaliza Haslan, Farihah Haji Suhaimi and Srijit Das **1779**

Vibrational Circular Dichroism: Recent Advances for the Assignment of the Absolute Configuration of Natural Products
Eleuterio Burgueño-Tapia and Pedro Joseph-Nathan **1785**

Natural Product Communications
2015
Volume 10, Number 10

Contents

Natural Products from Endophytes
(Guest Editors: John A. Johnson and Christopher A. Gray)

Original Paper

Antimycobacterial Natural Products from Endophytes of the Medicinal Plant *Aralia nudicaulis*
Haoxin Li, Brandon Doucet, Andrew J. Flewelling, Stéphanie Jean, Duncan Webster, Gilles A. Robichaud, John A. Johnson and Christopher A. Gray **1641**

Microsporols A–C from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora*
Xianfu Wu, Yadan Wang, Shuchun Liu, Xinzhong Liu and Liangdong Guo **1643**

Isolation of Phomopsolide A and 6(*E*)-Phomopsolide A as Antimycobacterial Natural Products from an Unidentified Endophyte of the Canadian Medicinal Plant *Heracleum maximum*
Trevor N. Clark, Katelyn T. Ellsworth, Stéphanie Jean, Duncan Webster, Gilles A. Robichaud, John A. Johnson and Christopher A. Gray **1647**

Pyrrolocin A, a 3-Decalinoyltetramic Acid with Selective Biological Activity, Isolated from Amazonian Cultures of the Novel Endophyte *Diaporthales* sp. E6927E
Eric V. Patridge, Alicia Darnell, Kaury Kucera, Gillian M. Phillips, Heidi R. Bokesch, Kirk R. Gustafson, Daniel J. Spakowicz, Linda Zhou, William M. Hungerford, Mark Plummer, Denton Hoyer, Alexandra Narváez-Trujillo, Andrew J. Phillips and Scott A. Strobel **1649**

Cytotoxic Cytochalasins and Other Metabolites from Xylariaceae sp. FL0390, a Fungal Endophyte of Spanish Moss
Ya-ming Xu, Bharat P. Bashyal, Mangping X. Liu, Patricia Espinosa-Artiles, Jana M. U'Ren, A. Elizabeth Arnold and A. A. Leslie Gunatilaka **1655**

Endophytic Fungus *Nigrospora oryzae* from a Medicinal plant *Coccinia grandis,* a High Yielding New Source of Phenazine-1-carboxamide
Dharushana Thanabalasingam, N. Savitri Kumar, Lalith Jayasinghe and Yoshinori Fujimoto **1659**

Polyketides from an Endophytic *Aspergillus fumigatus* Isolate Inhibit the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* and MRSA
Andrew J. Flewelling, Amanda I. Bishop, John A. Johnson and Christopher A. Gray **1661**

A 3-Vinyl Cephem Derivative, a Useful Intermediate in the Synthesis of Cepham Antibiotics, from *Aspergillus awamori* Associated with Banana Fruit
H.M.S.K.H. Bandara, N. Savitri Kumar, Lalith Jayasinghe, Hironori Masubuti and Yoshinori Fujimoto **1663**

Two New Cyclic Depsipeptides from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp.
Fang Lv, Georgios Daletos, Wenhan Lin and Peter Proksch **1667**

Accounts/Reviews

Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes of Conifers
Andrea A. Stierle and Donald B. Stierle **1671**

Original Paper

Anti-diabetic Effect of FriedelanTriterpenoids in Streptozotocin Induced Diabetic Rat
Amitava Mandal, Vaskar Das, Pranab Ghosh and Shilpi Ghosh **1683**

Colochirosides B_1, B_2, B_3 and C, Novel Sulfated Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Colochirus robustus* (Cucumariidae, Dendrochirotida)
Alexandra S. Silchenko, Anatoly I. Kalinovsky, Sergey A. Avilov, Pelageya V. Andryjaschenko, Pavel S. Dmitrenok, Vladimir I. Kalinin, Ekaterina A. Yurchenko and Igor Yu. Dolmatov **1687**

(+)-Chenabinol (Revised NMR Data) and Two New Alkaloids from *Berberis vulgaris* and their Biological Activity
Zdeněk Novák, Anna Hošťálková, Lubomír Opletal, Lucie Nováková, Martina Hrabinová, Jiří Kuneš and Lucie Cahlíková **1695**

The Influence of Cultivars and Phenological Phases on the Accumulation of Nevadensin and Salvigenin in Basil (*Ocimum basilicum*)
Botond Bernhardt, Jenő Bernáth, Attila Gere, Zoltán Kókai, Bonifác Komáromi, Szilvia Tavaszi-Sárosi, László Varga, László Sipos and Krisztina Szabó **1699**

Isoorientin, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 (COX-2) from the Tubers of *Pueraria tuberosa*
Manne Sumalatha, Rachakunta Munikishore, Aluru Rammohan, Duvvuru Gunasekar, Kotha Anil Kumar, Kakularam Kumar Reddy, Rajaram Azad, Pallu Reddanna and Bernard Bodo **1703**

Secondary Metabolites of *Alchemilla persica* Growing in Iran (East Azarbaijan)
Fariba Heshmati Afshar, Filippo Maggi, Sara Ferrari, Gregorio Peron and Stefano Dall'Acqua **1705**

Continued inside backcover