RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ KASDI MERBAH - OUARGLA

FACULTÉ DES MATHÉMATIQUES ET SCIENCES DE LA MATIÈRE

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre : Doc/ /2020

THÈSE

POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR EN SCIENCES

SPÉCIALITÉ : Chimie

OPTION : Chimie organique

PAR :

HARRAT Mohamed

Étude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles du *Pistacia lentiscus* L.

Soutenue devant le jury composé de :

M. SAÏDI Mokhtar	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	**Président**
M. HADJADJ Mohamed	Professeur	Université Kasdi Merbah- Ouargla	**Examinateur**
M. HADEF DERRADJI	MCA	Université Kasdi Merbah- Ouargla	**Examinateur**
M. BECHKI Lazhar	Professeur	Université de Ghardaïa	**Examinateur**
M. YOUSFI Mohamed	Professeur	Université Amar Télidji de Laghouat	**Directeur de thèse**
M. GOURINE Nadhir	Professeur	Université Amar Télidji de Laghouat	**Co-Directeur de thèse**

Année universitaire : 2019/2020

Dédicaces

Je dédie ce travail

À la mémoire de mon cher Père que Dieu le tout Puissant lui accorde sa sainte miséricorde.

À ma chère mère qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour et son soutien.

À ma très chère épouse qui reçoit à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

À Mes enfants pour la joie qu'ils nous donnent.

Je vous aime tous de tout mon cœur.

À ma famille, tout particulièrement à mes frères, mes sœurs pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leurs encouragements qu'ils m'ont apporté.

Et pour toute personne avec qui je partage un beau souvenir.

REMERCIMENTS

Je rends grâce à DIEU le tout Puissant de m'avoir donné la sante, la volonté, le courage et la force de mener ce travail à bout.

J'adresse ma profonde gratitude et ma profonde reconnaissance à

***M. Yousfi Mohamed**, professeur à l'Université Amar Télidji - Laghouat, de m'avoir accueilli dans son laboratoire des Sciences Fondamentales L.S.F à l'université de Laghouat, d'avoir accepté d'être rapporteur et membre du jury de ma thèse. Je le remercie très chaleureusement pour toute l'aide, les conseils et les expériences scientifiques qu'il m'a apportés.*

Je tiens à exprimer mes plus vives reconnaissances à mon frère collègue

***M. Gourine Nadhir**, professeur à l'Université Amar Télidji - Laghouat, qui a*

co-dirigé ce travail, avec qui j'ai travaillé tout au long de cette thèse. J'y ai pu profiter de ses connaissances scientifiques, de ses conseils éclairés et apprécier de sa constante disponibilité et sa grande qualité humaine.

*Je remercie Monsieur **SAIDI Mokhtar,** professeur à l'Université Kasdi Merbah Ouargla qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.*

*Je remercie également, Monsieur **HADJADJ Mohamed,** professeur à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, Monsieur **HADEF Derradji,** Docteur à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, et Monsieur **BECHKI Lazhar,** professeur à l'Université Ghardaïa, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes plus sincères remerciements vont aussi à **M. Benalia Mohamed,** Docteur en Chimie à l'Université Amar Télidji - Laghouat, qui m'a favorablement aidé par ses conseils et ses orientations très précieuses.*

*Un grand merci au, Monsieur **Bader Tayeb**, Docteur à l'Université Amar Télidji Laghouat pour avoir révisé la langue de la thèse*

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à mes collègues enseignants chercheurs au laboratoire de recherche L.S.F pour leurs soutiens permanant.

Mes pensées vont également à toute ma famille pour leur soutien et leur encouragement permanant.

Enfin, je remercie aussi mes amis pour leur soutien moral et leur encouragement pendant mes travaux de recherche, ainsi tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

الملخص

في سياق اكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر الطبيعية، اهتممنا في هذا العمل بدراسة التطور الموسمي وتنوع المركبات الدهنية والفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمستخلصات الدهون و الفينولات من أوراق الضرو.

أظهر تحديد الأحماض الدهنية بعض التباين الواضح في التركيبة اعتمادًا على تاريخ الجني . مجال الاختلاف بالنسبة للأحماض الدهنية المشبعة الأساسية المكتشفة هي : حمض الميريستيك (C14:0 = 2.94-16.61%) ، حمض البالمتيك (C16:0 =5.31-15.98%) ، حمض الكابريك (C10:0 = 0-13.88%)، حمض اللوريك (C12:0 = 0-8.09%) وحمض الأراشيديك(C20: 0 = 0-7.07%).من ناحية أخرى ، كانت الأحماض الدهنية الغير مشبعة الأساسية هي حمض ألفا لينولينيك (C18:3 = 5.04-48.92%) وهو معروف بفوائده الغذائية ، الصيدلانية والصحية المتعددة ، يليه حمض اللينوليك (C18:2 = 5.49-16.99%) وحمض الأوليك (C18:1 = 3.42-14.90%). تم الحصول على أعلى نسبة من C18: 3 في شهر جانفي. كما كشف النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الدهون التي تم تحديدها باستخدام اختبارين مختلفين (DPPH و β كاروتين) عن اختلاف كبير بين مواسم الجني وأظهرت النتائج أن النسب القصوى لـ: C18: 3 تعتمد على موسم الجني.

بالنسبة للتوكوفيرولات ، يبدو أن أعلى قيمة لـ δ-Toc يتم الحصول عليها في الصيف. بالنسبة إلى α,β-Toc، يبدو أن النسب المئوية مستقرة ، على الرغم من أنها تظهر تباينًا كبيرًا في تكوين النسب المئوية الخاصة بها. وأخيرًا ، أظهرت نتائج تقدير (معايرة) إجمالي الستيرولات أعلى متوسط قيمة في فصل الربيع.

أظهر المحتوى الإجمالي من الفينولات و الفلافونويدات بالإضافة الى التانات في أوراق الضرو حسب الترتيب الاختلافات التالية:(1430-2570 مغ/100غ EAG من الكسب) ، (140-360 مغ/100غ EQ من الكسب) و (520-1220 مغ/100غ EC من الكسب). يظهر النشاط المضاد للأكسدة من المستخلصات المختلفة التي تم اختبارها بواسطة الطرق الثلاث (FRAP,DPPH وABTS) نشاطها الهام مقارنةً بمضادات الأكسدة الاصطناعية التي يمكن اعتبارها مضادات أكسدة طبيعية جيدة تمنع تدهور بعض الأطعمة ومصدر غذائي غني بالمركبات النشطة حيويًا لاستغلالها في الأغذية والاستخدام الطبي و / أو للتطبيقات الصناعية.

الخلاصة الرئيسية لهذه الدراسة تبين الإمكانات الغذائية للدهون المستخلصة من أوراق نبات الضرو وتوفر معلومات قيمة عن التباين الموسمي لهذه المستقلبات ، والتي قد توفر فرصًا للاستغلال العقلاني للأغراض الطبية وفي الصناعات الغذائية. .

الكلمات المفتاحية:

الأوراق ، الضرو ، الأحماض الدهنية ، توكوفيرولات ، بوليفينولات ، نشاط مضاد للأكسدة.

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'évolution saisonnière et la variabilité des composés lipidiques, phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits lipidiques et phénoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

L'identification des acides gras a montré une variabilité claire de la composition en fonction de la date de cueillette. Les intervalles de variations des principaux acides gras saturés détectés étaient : l'acide myristique (C14:0 = 2,94-16,61%), l'acide palmitique (C16:0 = 5,31-15,98%), l'acide caprique (C10:0 = 0-13,88%), l'acide laurique (C12:0 = 0-8,09%) et l'acide arachidique (C20:0 = 0-7,07%). D'un autre côté, les principaux acides gras insaturés étaient l'acide α-linolénique (C18:3 = 5,04-48,92%) qui est connu pour ses multiples avantages diététiques, pharmaceutiques et cliniques, suivi par l'acide linoléique (C18:2 = 5,49- 16,99%) et d'acide oléique (C18:1 = 3,42-14,90%). Le contenu le plus élevé de C18:3 a été obtenu en Janvier. L'activité antioxydante des extraits lipidiques déterminée à l'aide de deux différents tests (DPPH et β-carotène) a révélé une variation significative au cours des différentes saisons. Les résultats ont montré que les pourcentages maximaux de C18:3 dépendaient de la saison de collecte.

Pour les tocophérols, il semble que la valeur la plus élevée de δ-Toc soit obtenue en été. Pour les isomères et α- et β-Toc, il semble que leurs pourcentages soient stables, bien qu'ils présentent une grande variabilité dans la composition de leurs pourcentages. Enfin, la quantification (dosage) des stérols totaux a présenté la valeur moyenne la plus élevée au printemps.

La teneur en polyphénols, flavonoïdes totaux et tanins des feuilles de *P. lentiscus* a présenté les variations respectives suivantes : (1430-2570 mg EAG/100g tourteaux), (140-360 mg EQ /100g tourteaux) et (520-1220 mg EC /100g tourteaux). L'activité antioxydante des différents extraits testés par les trois méthodes (DPPH, FRAP et ABTS) a montré que leur activité été plus importante en comparaison avec ceux des antioxydants synthétiques ; ce qui nous amène à dire qu'ils peuvent être considérés comme de bons antioxydants naturels pouvant ainsi empêché l'altération de certains aliments ; par ailleurs, ils peuvent constitués une source alimentaire potentielle riches en composés bioactifs à vertus alimentaire, médicinale et/ou à des applications industrielles.

Le principal résultat de cette étude illustre le potentiel nutritionnel des lipides des feuilles de *P. lentiscus* et fournit des informations précieuses sur la variabilité saisonnière de ces métabolites, ce qui peut offrir des opportunités d'exploitation rationnelle à des fins médicinales et dans l'industrie alimentaire.

Mots clés :

Feuilles, *Pistacia lentiscus*, acides gras, tocophérols, polyphénols, activité antioxydante.

Abstract

In the context of the discovery of new antioxidants from natural sources, we were interested in this work to study the seasonal evolution and the variability of lipid and phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant properties of lipid and phenolic extracts from the leaves of *Pistacia lentiscus* L.

The identification of the fatty acids showed some clear variability in the composition depending on the date of harvest. The ranges of variation of the main identified saturated fatty acids were: myristic acid (C14:0 = 2.94-16.61%), palmitic acid (C16:0 = 5.31-15.98%), capric acid (C10:0 = 0-13.88%), lauric acid (C12:0 = 0-8.09%) and arachidic acid (C20:0 = 0-7.07%). On the other hand, the main poly unsaturated fatty acids were α-linolenic acid (C18:3 = 5.04-48.92%) which is known for its multiple dietary, pharmaceutical and clinical benefits, followed by linoleic acid (C18:2 = 5.49- 16.99%) and oleic acid (C18:1 = 3.42-14.90%). The highest C18:3 content was obtained in January. The antioxidant activity of the lipid extracts determined by two different tests (DPPH and β-carotene) showed a significant variation in the different seasons. The results showed that the maximum percentages of C18:3 depended on the collection season.

For tocopherols, it appears that the highest value of δ-Toc is obtained in summer. For α- and β-Toc, it seems that their percentages were steady, although there is a high variability in the composition of their percentages. Finally, the quantification of total sterols showed the highest mean value in the spring.

The content of polyphenols, total flavonoids and tannins in the leaves of *P. lentiscus* exhibited the following respective variations: (1430-2570 mg EAG/100g meals), (140-360 mg EQ /100g meals) and (520-1220 mg EC /100g meals) respectively. The antioxidant activity of the different extracts tested by the three methods (DPPH, FRAP and ABTS) showed their important activity compared to those of synthetic antioxidants. Thus, could be considered as good natural antioxidants preventing spoilage of some foods and a potential food source rich in bioactive compounds for food, medicinal and/or industrial applications.

The main result of this study illustrates the nutritional potential of *P. lentiscus* leaf lipids and provides valuable information on the seasonal variability of these metabolites, which may offer opportunities for rational exploitation for medicinal purposes and in food industries.

Keywords:

Leaves, *Pistacia lentiscus*, fatty acids, tocopherols, polyphenols, antioxidant activity.

Liste d'abréviations *i*
Liste des tableaux *ii*
Liste des figures *iii*

INTRODUCTION GÉNÉRALE 02

CHAPITRE I
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. DESCRIPTION BOTANIQUE 06
I.1.1. Famille des Anacardiacées 06
I.1.2. Genre Pistachier 08
I.1.3. Espèce Pistachier lentisque 10
I.1.3.1. Utilisation traditionnelle et propriété pharmaceutique du *Pistacia lentiscus* 12
I.2. GÉNÉRALITÉ SUR LES LIPIDES 12
I.2.1. Définitions 13
I.2.2. Rôle des lipides 14
I.2.3. Acides gras 15
I.2.3.1. Acides gras saturés 15
I.2.3.2. Acides gras insaturés 16
I.2.4. Lipides simples 18
I.2.4.1. Glycérides 18
I.2.4.2.Cérides 19
I.2.4.3. Stérides 19
I.2.5. Lipides complexes 19
I.2.6. Lipides polyisopréniques 20
I.3. COMPOSÉS PHÉNOLIQUES (POLYPHÉNOLS) 20
I.3.1. Généralités 20
I.3.2. Différentes classes des polyphénols 21
I.3.2.1.Phénols simples et les acides phénoliques 20
I.3.2.1.1. Acides hydroxybenzoïques 21
I.3.2.2.2. Acides hydrox-cinnamiques 22
I.3.2.2. Stilbènes 23
I.3.2.3. Flavonoïdes 23
I.3.2.4. Tanins 23
I.3.3. Propriété thérapeutique des composés phénoliques 24
I.3.3.1. Contre les maladies cardiovasculaires 24
I.3.3.2. Activité anti-cancérigène 24
I.3.3.3. Activité anti-inflammatoire 25
I.4. RADICAUX LIBRES ET LES ANTIOXYDANTS 25
I.4.1. Stress oxydatif 25
I.4.2. Radicaux libres 25
I.4.2.1. Nature des radicaux libres 25
I.4.2.1.1. Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) 25
I.4.3.Antioxydants 27
I.4.3.1. Systèmes antioxydants 27
I.4.3.1.1. Antioxydants enzymatiques 27
I.4.3.1.2. Antioxydants non enzymatiques 28
I.4.3.2.Utilisation des antioxydants 29

CHAPITRE II
PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. PRODUITS CHIMIQUES ET INSTRUMENTS 31
II.2. CUEILLETTE DES FEUILLES DE *Pistacia lentiscus* 32
II.3. EXTRACTION DES LIPIDES 32
II.3.1. Préparation des esters méthyliques des acides gras EMAG 32
II.3.1.1. Analyse chromatographique des EMAG(s) 33
II.3.1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) des EMAG (s) 33
II.3.2. Analyse des tocophérols 34
II.3.2.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols 34
II.3.2.2. Dosage des tocophérols par CLHP 34
II.3.3. Dosage des stérols totaux 34
II.3.4. Evaluation de l'activité antioxydante 35
II.3.4.1. Test DPPH 35
II.3.4.2. Test de blanchissement du β-carotène 37
II.3.5. Analyse statistique 38
II.3.5.1. Analyse de variance ANOVA et corrélations 38
II.3.5.1.1. Classification ascendante hiérarchique CAH et analyse en composantes principales ACP 38
39
II.4. EXTRACTION & QUANTIFICATION DES POLYPHÉNOLS 40
II.4.1. Extraction des polyphénols 40
II.4.2. Dosage des phénols totaux 40
II.4.3. Dosage des flavonoïdes 41
II.4.4. Dosage des Tanins condensés 41
II.4.5. Activité antioxydante des extraits phénoliques 42
II.4.5.1. Test DPPH 42
II.4.5.2. Test FRAP 42
II.4.5.3. Test ABTS 44

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. QUANTIFICATION DES LIPIDES 46
III.1.1. Rendement de l'extraction 46
III.1.2. Composition en acides gras 47
III.1.3. Analyse des Tocophérols totaux 54
III.1.3.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols 54
III.1.3.2. Analyse des tocophérols individuels par CLHP 57
III.1.4. Dosage des stérols totaux 60
III.1.5. Evaluation de l'activité antioxydante 62
III.1.6. Analyse statistique des données expérimentales 70
III.1.6.1. Classification ascendante hiérarchique CAH 70
III.1.6.2. Analyse en composantes principales ACP 72
III.1.6.3. Étude de corrélations 75

III.2. QUANTIFICATION DES COMPOSES PHÉNOLIQUES 77
III.2.1. Quantification des composés phénoliques totaux 78
III.2.2. Dosage des flavonoïdes 81
III.2.3. Dosage des tanins condensés 82
III.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante 83

CONCLUSION GÉNÉRALE 93
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 97
ANNEXE 105
PUBLICATION ET COMMUNICATION 123

Liste des abréviations

AA	:	Activité antioxydante
ABTS	:	2,2'-azino-*bis*(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACP	:	Analyse en composantes principales
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AG	:	Acide gras
AGI	:	Acide gras insaturé
AGMI	:	Acide gras monoinsaturé
AGPI	:	Acide gras polyinsaturé
AGS	:	Acide gras saturé
CAH	:	Classification ascendante hiérarchique
CLHP	:	Chromatographie liquide à haute performance
CPG	:	Chromatographie en phase gazeuse.
$DPPH^{\bullet}$	:	Radical libre stable *1,1*-diphényl-*1,2* picryl hydrazyle
EAG	:	Equivalent d'acide gallique
EC	:	Equivalent de catéchine
EC_{50}	:	Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres (Efficiency concentration).
EMAG	:	Ester méthylique d'acide gras
EOR	:	Espèces oxygénées réactives
EQ	:	Equivalent de quercétine
FID	:	Détecteur d'ionisation à flamme (Flame Ionisation Detector)
FRAP	:	Capacité de réduction ferrique du plasma (Ferric Reducing Ability of Plasma)
GC-MS	:	Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (Gas chromatography–mass spectrometry)
GPx	:	Glutathion Peroxydase
I/S	:	Rapport des : Insaturés/saturés
IC_{50}	:	Concentration inhibitrice pour réduire 50% des radicaux libres (Inhibitory Concentration)
IUPAC	:	Union internationale de chimie pure et appliquée (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LDL	:	Liporotéines basse densité (Low Density Lipoproteins)
NOS	:	Oxyde nitrique synthase (Nitric oxide synthases)
PI	:	Pourcentage d'Inhibition
SOD	:	Superoxide Dismutase
TPTZ	:	Tripyridyltriazine

Liste des tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.01	Répartition géographique des principaux genres des Anacardiacées	07
Tableau I.02	Usage de la famille des Anacardiacées en médecine traditionnelle	08
Tableau I.03	Nomenclature de quelques acides gras saturés linéaires	16
Tableau I.04	Nomenclature de quelques acides gras insaturés linéaires	17
Tableau I.05	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées	29

Chapitre II : Partie expérimentale

Tableau II.01	Produits et les instruments	31

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.01	Composition relative en acides gras des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus*	48
Tableau III.02	Comparaison des pourcentages déterminés des acides gras avec ceux de la littérature	50
Tableau III.03	Valeurs des pourcentages des acides gras en fonction des mois de cueillette	53
Tableau III.04	Quantification des tocophérols et stérols totaux dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*	55
Tableau III.05	Pourcentage en tocophérols individuels dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*	57
Tableau III.06	Valeurs d'IC_{50} des différents extraits lipidiques dans deux tests d'activité (DPPH & β-carotène).	65
Tableau III.07	Matrice de corrélations (Coefficient de Pearson à P <0,05) entre l'activité antioxydante (Tests DPPH et β-carotène), C18:, isomères de tocophérols, TTC and TSC.	76
Tableau III.08	Teneur en extraits bruts et en composés phénoliques	77
Tableau III.09	Les valeurs de l'IC_{50} des polyphénols dans les trois tests	87

Liste des figures

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Figure I.01	Répartition géographique de la famille Anacardiaceae dans le monde	07
Figure I.02	Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* avec d'autres espèces en Algérie	09
Figure I.03	Photo d'un arbre de *Pstacia lentiscus* L.	10
Figure I.04	Photo des feuilles du *Pistacia lentiscus* L.	11
Figure I.05	Classification des lipides	14
Figure I.06	Structure chimique semi- développée de l'acide arachidonique (C20: 4ω6)	18
Figure I.07	Structure chimique des glycérides	19
Figure I.08	Structure chimique du noyau phénol	21
Figure I.09	Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques	22
Figure I.10	Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques	22
Figure I.11	Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes	23

Chapitre II : Partie expérimentale

Figure II.01	Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du DPPH	36
Figure II.02	Réduction du radical libre DPPH$^{\cdot}$	36
Figure II.03	Réaction FRAP et le complexe Fe^{3+}-TPTZ	42
Figure II.04	Courbe de réduction des ions ferriques	43

Chapitre III : Résultats et discussion

Figure III.01	Variation saisonnière du rendement des lipides	46
Figure III.02	Variations saisonnière des pourcentages des différentes catégories des acides gras	51
Figure III.03	Courbe d'étalonnage de la vitamine E (α-tocophérol)	54
Figure III.04	Variation des quantités en tocophérols totaux en fonction des mois de la cueillette	56
Figure III.05	Variations saisonnière des pourcentages relatifs des différents isomères du tocophérol	59
Figure III.06	Courbe d'étalonnage du cholestérol	61
Figure III.07	Variations saisonnière des quantités en stérol totaux en fonction des mois de la cueillette	62
Figure III.08	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH	63

Figure III.09	Courbes représentants la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du β-carotène	64
Figure III.10	Activité antioxydante des standards pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène).	66
Figure III.11	Courbes des variations des IC_{50} pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène).	68
Figure III.12	Dendogram de l'analyse de classification ascendante hiérarchique CAH obtenue en utilisant la méthode « ou technique » de Ward, avec une mesure de la distance de type euclidienne	71
Figure III.13	Représentation bidimensionnelle des premiers facteurs (composantes principales) de l'analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en acides gras et leurs activités antioxydantes	72
Figure III.14	Cercle de corrélation pour les deux premiers facteurs déterminés par analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en acides gras et leurs activités antioxydantes	73
Figure III.15	Représentation bidimensionnelle des deux premiers facteurs (composantes principales) de l'analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en tocophérols et leurs activités antioxydantes	74
Figure III.16	Cercle de corrélation pour les deux premiers facteurs déterminés par analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en tocophérols et leurs activités antioxydantes	75
Figure III.17	Variation saisonnière du rendement en polyphénols	78
Figure III.18	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	79
Figure III.19	Variation saisonnière des quantités en phénols totaux	80
Figure III.20	Courbe d'étalonnage de la quercétine	81
Figure III.21	Variation saisonnière des quantités en flavonoïdes totaux	82
Figure III.22	Courbe d'étalonnage de la catéchine	82
Figure III.23	Variation saisonnière des quantités en tanins totaux	83
Figure III.24	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du DPPH	84
Figure III.25	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du FRAP	85
Figure III.26	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test de l'ABTS	86

Figure III.27	Activité antioxydante de la Vitamine C	88
Figure III.28	Courbes des variations des IC_{50} pour trois tests d'activités (DPPH, FRAP & ABTS)	89

Annexes

Figure A1	Exemple des Chromatogrammes des EMAGs dans les lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*	107
Figure A2	Chromatogrammes des EMAGs standards	111
Figure A3	Chromatogrammes CLHP des tocophérols des lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*	112
Figure A4	Chromatogrammes CLHP des tocophérols standards	114
Figure A5	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH	115
Figure A6	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du β-carotène	117
Figure A7	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du DPPH	119
Figure A8	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du FRAP	121
Figure A9	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test de l'ABTS	123

Introduction générale

Introduction générale

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bioactifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité, on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

Plus de 120 composés provenant des plantes sont, aujourd'hui, utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel **(Famsworth et al, 1985; Cordell et Colvard, 2005)**.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques **(Ozenda, 1977)**. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques **(Ozenda, 1977)**. Ce qui a donnée à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Le Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), connu sous le nom « El darou », appartient à une espèce végétale des plus caractéristiques de l'Algérie. L'arbre pousse dans les régions du Nord d'Algérie. C'est un arbre connu depuis l'antiquité pour ses vertus médicinales. Ces feuilles possèdent plusieurs activités biologiques dont les plus importantes sont : anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, hépatoprotective et anti-diarrhéique. Encore plus, les feuilles du Pistachier lentisque sont encore utilisées dans le traitement de plusieurs maladies. En Algérie, cet arbre est extensivement utilisé par les populations rurales en médecine traditionnelle. Une étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations sur l'activité antioxydante des composés lipidiques. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur l'analyse quantitative et l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits de ces feuilles.

Les pratiques de la médecine traditionnelle de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et brûlures légères. La médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile grasse obtenue par pression des fruits de lentisque dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes **(Bensegueni, 2007)**. L'huile est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac ou les douleurs dorsales **(Bellakhdar, 1997)**.

Ces usages sont surtout répandus à l'est du pays (région d'El-Milia, Skikda, Guelma). L'huile est également très utilisée pour les mêmes indications en Tunisie. **(Yahya, 1992; Iserin, 2001; Baudoux, 2003 et Grosjean, 2007).**

L'étude présentée dans cette thèse est consacrée à la valorisation phytochimique des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Cette valorisation consiste à étudier les fractions lipidiques et phénoliques des feuilles de l'arbre afin de mettre en évidence leurs importances sur le plan nutritionnel et pharmaceutique et cela à travers la détermination des principaux constituants chimiques et l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits polaires et apolaires des feuilles.

Ce travail a été entrepris pour plusieurs raisons :

- Cet arbre est couramment rencontré dans tout le nord d'Algérie et même parfois dans l'Atlas Saharien. C'est un arbre souvent utilisé en médecine traditionnelle et notamment les fruits à des usages divers. D'ailleurs, l'huile des fruits est disponible dans les marchés locaux du pays.
- Aucune étude détaillée n'a été entreprise sur les lipides des feuilles de l'arbre, car tout ce que nous trouvons dans la littérature concerne les huiles essentielles des feuilles et les lipides des fruits. Donc, il nous a paru intéressant d'étudier les lipides et les phénols des feuilles de cet arbre à partir d'un nombre important d'échantillons et voir l'influence de la date de la cueillette (Saison) sur le contenu en lipides et phénols ainsi l'activité antioxydante des feuilles.
- Cet arbre fourni le long de l'année des quantités énormes de feuilles dont aucune informations scientifiques sont connues et disponibles.

Les études sur les lipides de cet arbre sont très restreintes et sont toutes récentes. En réalité, ces travaux publiés n'utilisent qu'un nombre très restreint d'échantillons, et ceci seulement pour quelques tests d'activités antioxydantes. Plus loin, l'effet d'autres paramètres tels que : la saison de collecte, le climat, la composition chimique, etc. sur l'activité antioxydante n'a pas été reporté. Le présent travail sera consacré à effectuer une recherche plus profonde à une échelle assez large. Le traitement des résultats de cette étude sera réalisé à l'aide des méthodes statistiques d'analyse des données (ACP, CAH).

L'objectif de notre travail consiste donc à étudier l'activité antioxydante des extraits (Polaires et apolaires) des feuilles du *Pistachier lentisque* et ceci en employant un nombre assez grand d'échantillons.

Ce travail est composé de deux volets, et est structuré comme suit :

Le premier volet se traduit par une synthèse bibliographique qui comporte une description botanique de la plante étudiée, des généralités sur les lipides, quelques définitions sur les différentes classes des composés phénoliques ainsi que les propriétés thérapeutiques de ces composés ; et se termine par quelques définitions sur les radicaux libres et les antioxydants.

Le deuxième volet consiste en une étude expérimentale, répartie en deux parties. La première partie englobe une présentation des techniques expérimentales d'analyses, alors que la deuxième partie traite la présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Enfin, la thèse se termine par une conclusion générale qui résume l'essentiel des résultats obtenus lors de ce travail et énonce par la suite des recommandations pour la suite de ce dernier.

À l'issue de cette étude, nous pourrions établir une carte d'identité pour les feuilles étudiées ce qui conduira à dégager les principaux caractères chimiotaxonomiques du *Pistacia lentiscus* et à définir les domaines de valorisation dans lesquels les lipides des feuilles pourront offrir les meilleurs résultats.

Enfin, cette espèce étant un arbre à vertu médicinale réputée dans toute l'Algérie et dans plusieurs pays du monde, la présente étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques et lipidiques pourrait justifier les propriétés thérapeutiques du *Pistacia lentiscus*.

Synthèse bibliographique

I.1. DESCRIPTION BOTANIQUE

I.1.1. Famille des Anacardiacées

La famille Anacardiaceae a été proposée pour la première fois par **Lindley en 1830**, la famille des Anacardiacées ou « Anacardiaceaes » sont des arbres, des arbustes (exceptionnellement plantes grimpantes), à canaux résinifères schizogénèse, à feuilles composées pennées ou trifoliolées, généralement alternées, dépourvues de glandes ponctiformes. Inflorescence en panicules. Fleurs actinomorphes, hétérochlamydées, parfois apétales, 5-mères, (hétérosexées) et/ou unisexuées, généralement hypogynes, diplostémones ou haplostémones (à filets souvent concrescents, à la base), apocarpes ou syncarpes. Disque intrastaminal. Gynécée isomère ou réduit à 3-1 carpelle, mais généralement 1-loculaire par avortement, à placentation axile, chaque carpelle étant 1-ovules apotropes 2 (-1)-tegminés **(Gaussen et al, 1982**).

La composition de cette famille en genres et espèces diffère selon les auteurs. D'après **Kokwaro (1986)** et **Guyot (1992)**, elle compte 60 genres et 600 espèces. Pour **Mabberley (1987)**, elle renfermerait 73 genres et 850 espèces et le genre le plus grand en nombre d'espèce est Rhus avec 100 espèces (Tableau I.01). **Pell (2004)** indique qu'elle renfermerait 82 genres et plus de 700 espèces. **Kokwaro (1986)** signale non seulement la présence des Anacardiacée en région tropicale mais aussi dans la région méditerranéenne, dans l'Est de l'Asie et en Amérique (Figure I.01)

Tableau I.01: Répartition géographique des principaux genres des Anacardiacées (**Mabberley, 1987).**

	Genre	Nombre d'espèces	Origine (région)
1	Anacardium	8	Amérique tropicale
2	Haematostaphis	2	Afrique tropicale – Ouest
3	Lannea	40	Régions tropicales, Indomalaisie
4	Mangifera	35	Régions tropicales, Indomalaisie
5	Ozoroa	40	Afrique tropicale
6	Pistacia	9	Région méditerranéenne
7	Pseudospondias	2	Afrique tropicale: Ouest et Centre
8	Rhus (incluant Toxicodendron)	200	Régions tempérées
9	Schinus	27	Amérique tropicale
10	Sclerocarya	4	Afrique tropicale australe
11	Sorindeia	50	Afrique tropicale et Madagascar
12	Spondias	10	Indomalaisie (au sud-est d'Asie), Amérique tropicale

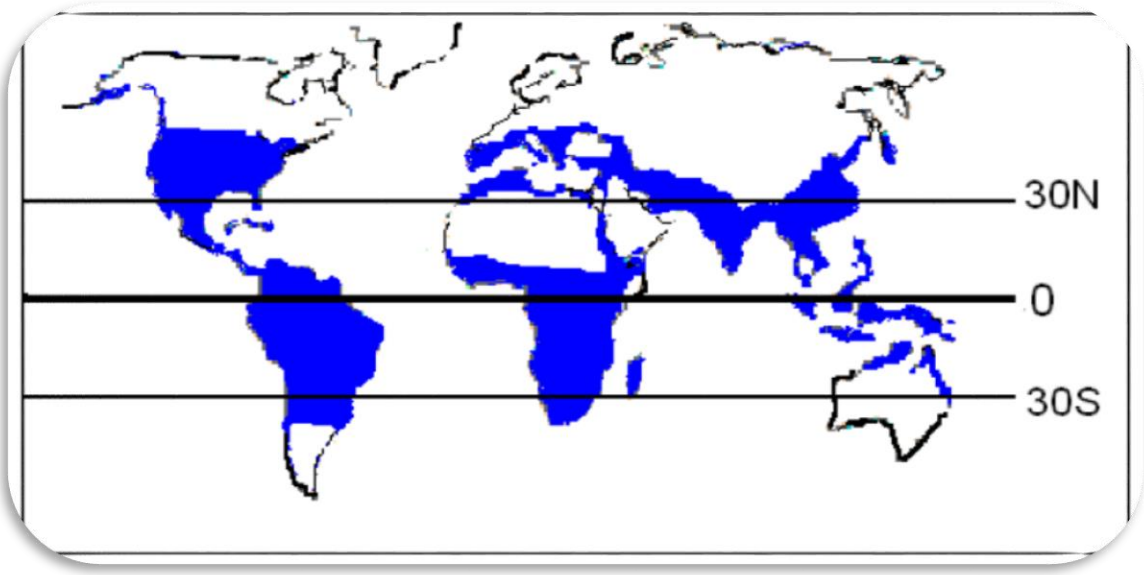


Figure I.01: Répartition géographique de la famille Anacardiaceae dans le monde.

Parmi les plantes de la famille des Anacardiacées couramment utilisées en médecines traditionnelles, on peut citer :

Tableau I.02 : Usage de la famille des Anacardiacées en médecines traditionnelles **(Le Houérou., 1976)**

Nom de la plante	Usage
***Pistacia lentiscus* L.**	Le traitement gastro-intestinal (acidité, brulures d'estomac, dyspepsies) Antiulcéreuse Antibactérienne Antiseptique
Pistacia atlantica	Anti-diarrheique Problémes bocc-gingivaux
Lannea acida	Trouble estomac Lotion pour les yeux Maux de dents
Rhus longipes	Avortement Laxatif (anti diarrhéique)
Rhus natalensis	Trouble d'estomac Gonorrhée Grippe Blessure Accouchement
Sclerocarya birrea	Douleur d'estomac Maladies de la peau Laxatif Douleur de l'accouchement

I.1.2. Genre Pistachier

Le genre botanique Pistacia (Les Pistachiers) regroupe 9 espèces d'arbustes appartenant à l'ordre des Sapindales et à la famille des Anacardiacées. D'origine asiatique ou méditerranéenne, les pistachiers sont des arbustes dioïques (fleurs mâles et femelles poussant sur des arbustes différents). Les fleurs d'une couleur plus ou moins marron, sont groupées en racèmes. Les fruits sont des drupes **(Bougherara, 2015)**.

Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistacia* sont :

• *Pistacia atlantica* - pistachier d'Atlas

• *Pistacia chinensis*

• *Pistacia lentiscus* L. - pistachier lentisque

• *Pistacia terebinthus* L. — pistachier térébinthe

• *Pistacia vera* L. - pistachier vrai (Qui donne la pistache)

• *Pistacia integerrima*

• *Pistacia palestina*

• *Pistacia khinjuk*

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia terebinthus, Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus* **(Quezel et Santa.,** :

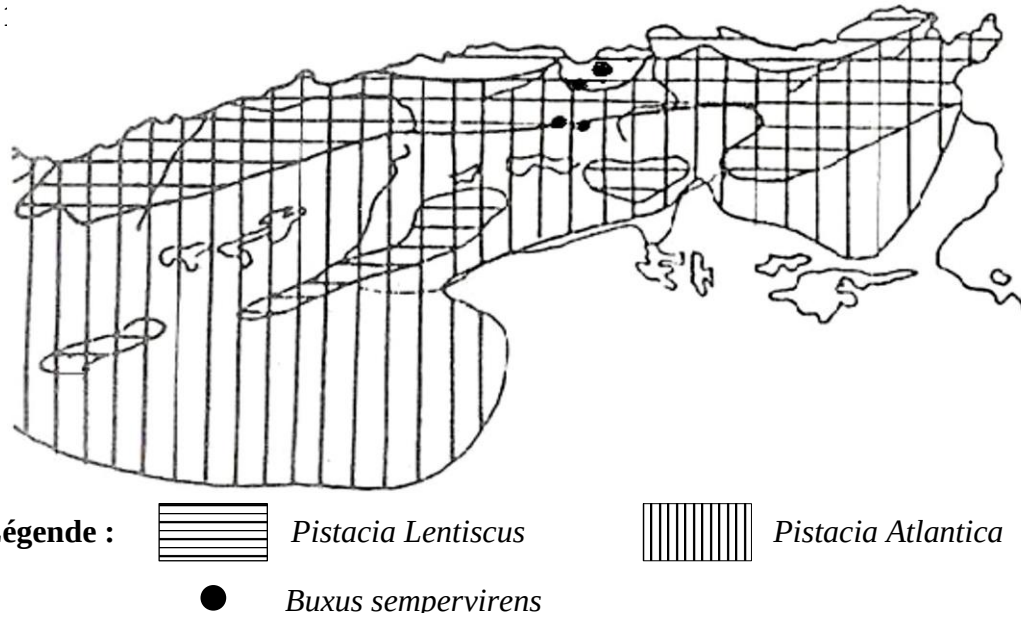


Figure I.02 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* avec d'autres espèces en Algérie **(Quezel et Santa, 1962)**.

I.1.3. Espèce Pistachier lentisque

Pistacia lentiscus (en arabe Darou), est en général un arbrisseau pouvant atteindre trois mètres (Figure I.03), c'est parfois aussi un arbuste ne dépassant pas six mètres, à odeur résineuse forte de la famille des Anacardiacées **(Coste, 1937)**. Elle est particulièrement représentative des milieux les plus chauds du climat méditerranéen que l'on retrouve en association avec l'oléastre (olivier sauvage), la salsepareille et le myrte dans un groupement végétal nommé "l'Oléolentisque", mais également dans les boisements clairs à Pin d'Alep ou d'autres formations de garrigues basses. En Algérie, on le retrouve sur tout type de sol, des zones subhumides et semi-arides, plus précisément dans le bassin de la Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège **(Bougherara, 20015)**.

Figure I.03 : Photo d'un arbre de *Pistacia lentiscus* L.

Selon **More et White (2005)** cette espèce est caractérisée par :

Branches : tortueuses et pressées, forment une masse serrée.

Feuilles : persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuse, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (Figure I.04).

Fleurs : unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe, et très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Les fleurs femelles sont vert jaunâtre et les fleurs males sont rouge foncé.

Fruit : est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme, d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité en automne.

Mastic : L'incision du tronc de cet arbuste fait écouler un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie.

Figure I.04 : Photo des feuilles du *Pistacia lentiscus* L.

I.1.3.1. Utilisation traditionnelle et propriété pharmaceutique du *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité **(Palevitch et Yaniv, 2000)**. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère **(Ouelmouhoub, 2005)**. La partie aérienne de *Pistacia lentiscus* est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques **(Scherrer et al, 2005)**.

Les feuilles sont pourvues d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato-protective, expectorante et stimulante **(Kordali et al, 2003)**. Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires **(Saïd et al, 2002)**.

La résine de *Pistacia lentiscus* a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus **(Assimopoulou et Papageorgiou, 2005)** et elle possède des activités antioxydantes et antimicrobiennes **(Magiatis et al, 1999 ; Kordali et al, 2003).**

L'écorce du *P.lentiscus* est largement utilisées contre l'hypertension dans certaines régions d'Espagne, les gens préparent la partie aérienne de la plante en décoction à 1% et prennent 150 ml, une fois par jour à jeun **(Villar et al, 1987).**

I.2. GÉNÉRALITÉ SUR LES LIPIDES

Les lipides, encore appelés matières grasses, corps gras, huiles ou graisses, des termes visiblement synonymes, « corps gras » vient de latin *Crassus* qui signifie épais, dense et gros, « lipide » est dérivé du mot grec *lipos* signifiant graisses et « huile » vient de mot latin *olea* (*elaca* ou olivier). Les lipides sont un ensemble hétérogène de composés dont les structures chimiques et les propriétés physicochimiques et physiologiques sont très différentes, contrairement aux autres familles de composés biogènes (protéines ou sucres), relativement homogènes d'un point de vue chimique (**Zakkad, 2017**).

Les molécules lipidiques sont importantes car elles possèdent l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes :

- Sources d'énergie et de vitamines.
- Constituants majeurs des membranes cellulaires.
- Vecteurs d'informations comme hormones ou messagers intra-cellulaires.

I.2.1. Définitions

Les lipides sont des molécules organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme l'alcool, le benzène et le chloroforme. Cette propriété est la conséquence d'une composition riche en chaines aliphatiques non hydroxylées. Les constituants lipidiques les plus simples et les plus fréquents sont les acides gras, souvent estérifiés à des alcools comme le glycérol formant des triglycérides et des phospholipides.

Les différentes classes de lipides ont des origines et des fonctions différentes au sein des organismes vivants. On peut distinguer les lipides de réserve qui ont des esters d'acide gras (les triglycérides, les esters de stérols et les cires), les lipides structuraux, et les lipides du métabolisme, issus de la synthèse et du catabolisme des autres classes de lipides (**Laghouiter, 2018).**

On classe les lipides en deux grandes catégories : les lipides à base d'acides gras et les lipides à base d'isoprène (lipides polyisopréniques) (Figure I.05).

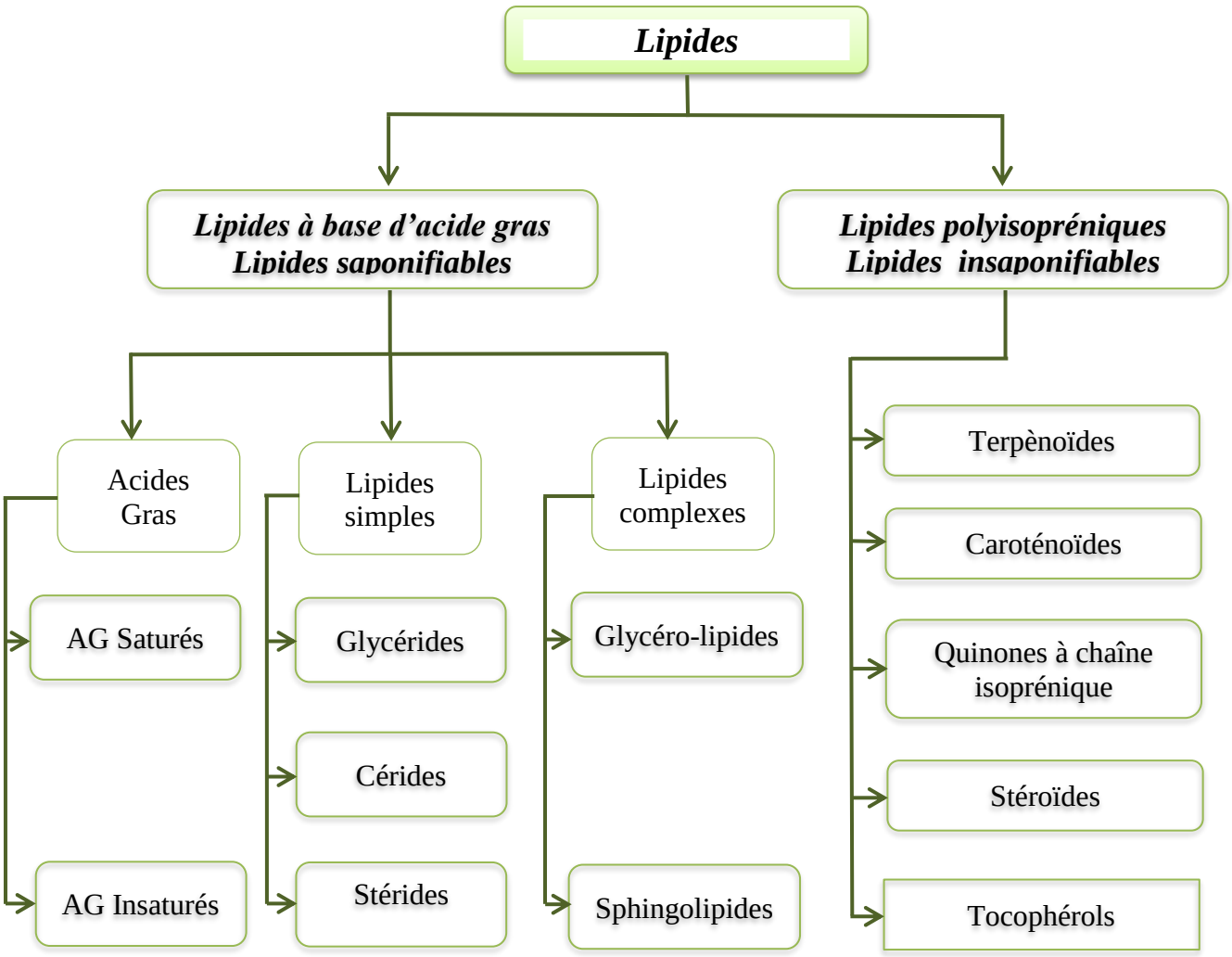


Figure I.05 : Classification des lipides.

I.2.2. Rôle des lipides

Dans l'organisme, les lipides ont 4 fonctions principales :

Réserve d'énergie : stocké sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux, les lipides constituent ainsi une réserve énergétique mobilisable (1 g de lipides donne environ 9,3 Kcal).

Un rôle structural : les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organelles. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité).

Un rôle de messager : les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra et extra-cellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation et la coagulation sanguine, etc.

Un rôle de transport de vitamines : les corps gras alimentaires véhiculent quatre vitamines liposolubles : A, D, E et K.

Chez les chameaux et les dromadaires, les lipides constituent une *réserve d'eau* pour ces animaux : la dégradation des lipides stockés sous forme de triglycérides dans les bosses de ces animaux amène à la formation de l'eau.

I.2.3. Acides gras

Les acides gras (AG) peuvent exister à l'état libre dans la nature. Ce sont les lipides les plus simples, ils sont des composés organiques à base de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont formés d'un monoacide aliphatique R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras) (**Zakkad, 2017**), soit saturés, soit insaturés.

I.2.3.1. Acides gras saturés

Un acide gras saturé est un acide gras totalement saturé en hydrogène : toutes les liaisons entre les carbones sont simples (pas de liaisons doubles). Les acides gras saturés sont généralement solides à température ambiante (sous forme de graisse) à l'exception des acides butyrique ($C_4H_8O_2$) et caproïque ($C_6H_{12}O_2$). On les trouve dans les aliments d'origine animale comme le beurre, le lait et le fromage. Les acides gras saturés ont pour formule chimique générale :

$$\mathbf{H_3C — [CH_2]_n — COOH}$$

Où n est un nombre entier égal ou supérieur à 2.

Chaque acide gras saturé possède en général deux noms : un nom commun qui rappelle souvent son origine (par exemple, l'acide caproïque qui se trouve dans le lait de chèvre, son nom est dérivé du mot latin « capra » qui veut dire chèvre) et un nom systématique décrivant sa structure (nombre de carbones, nombre d'insaturations, etc.) et issu de la nomenclature chimique (Tableau I.03).

À cela s'ajoute une nomenclature souvent utilisée en physiologie et en biochimie qui se base sur le nombre d'atomes de carbone et le nombre d'insaturations (par exemple l'acide gras Cx:0 où x indique le nombre d'atomes de carbone et 0 indique qu'il y a zéro double liaison carbone=carbone et par conséquent, l'acide gras est saturé).

Tableau I.03 : Nomenclature de quelques acides gras saturés linéaires.

Nom usuel	Nomenclature chimique (IUPAC)	Nomenclature physiologique	Formule chimique semi-développée
Acide butyrique	Acide butanoïque	C4:0	$H_3C-(CH_2)_2-COOH$
Acide valérique	Acide pentanoïque	C5:0	$H_3C-(CH_2)_3-COOH$
Acide caproïque	Acide hexanoïque	C6:0	$H_3C-(CH_2)_4-COOH$
Acide énanthique	Acide heptanoïque	C7:0	$H_3C-(CH_2)_5-COOH$
Acide caprylique	Acide octanoïque	C8:0	$H_3C-(CH_2)_6-COOH$
Acide pélargonique	Acide nonanoïque	C9:0	$H_3C-(CH_2)_7-COOH$
Acide caprique	Acide décanoïque	C10:0	$H_3C-(CH_2)_8-COOH$
Acide undécyclique	Acide undécanoïque	C11:0	$H_3C-(CH_2)_9-COOH$
Acide laurique	Acide dodécanoïque	C12:0	$H_3C-(CH_2)_{10}-COOH$
Acide tridécyclique	Acide tridécanoïque	C13:0	$H_3C-(CH_2)_{11}-COOH$
Acide myristique	Acide tétradécanoïque	C14:0	$H_3C-(CH_2)_{12}-COOH$
Acide pentadécyclique	Acide pentadécanoïque	C15:0	$H_3C-(CH_2)_{13}-COOH$
Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	C16:0	$H_3C-(CH_2)_{14}-COOH$
Acide margarique	Acide heptadécanoïque	C17:0	$H_3C-(CH_2)_{15}-COOH$
Acide stéarique	Acide octodécanoïque	C18:0	$H_3C-(CH_2)_{16}-COOH$

I.2.3.2. Acides gras insaturés

Un acide gras insaturé est un acide gras contenant une ou plusieurs insaturations (présence de doubles liaisons carbone=carbone). Il est monoinsaturé s'il contient une seule double liaison carbone=carbone et polyinsaturé s'il contient deux ou plusieurs doubles liaisons carbone=carbone. Les acides gras naturels sont généralement de configuration cis.

A température ordinaire, les acides gras insaturés sont liquides (huiles) qu'on trouve généralement dans les aliments d'origine végétale. Il est possible de transformer des huiles en graisses par hydrogénation de leurs doubles liaisons (ajout d'atomes d'hydrogène), ce qui correspond à une saturation des doubles liaisons. Cette opération est utilisée par exemple pour obtenir les margarines à partir des huiles végétales.

De la même manière que les acides gras saturés, les acides gras insaturés possèdent également un nom commun lié à leur origine et un nom systématique décrivant leur structure (Tableau I.04).

Tableau I.04 : Nomenclature de quelques acides gras insaturés linéaires.

	Nom usuel	**Abréviation utilisée en biochimie**	**Nomenclature chimique (IUPAC)**	**Nomenclature physiologique**
Acide gras mono-insaturés	Acide palmitoléique		Acide 7Z-hexadécènoïque	C16:1 w-7
	Acide oléique		Acide 9Z-octadécènoïque	C18:1 w-9
	Acide érucique		Acide 13Z-docosaènoïque	C22:1 w-9
	Acide nervonique		Acide 15Z-tétracosaènoïque	C24:1 w-9
Acide gras poly-insaturés	Acide linoléique	AL	Acide 9Z,12Z-octadécadiènoïque	C18:2 w-6
	Acide alpha-linolénique	ALA	Acide 9Z,12Z,15Z-octadécatriènoïque	C18:3 w-3
	Acide arachidonique		Acide 5Z,8Z,11Z,14Z-éicosatétraènoïque	C20:4 w-6
	Acide éicosapentaénoïque	EPA	Acide 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-éicosapentaènoïque	C20:5 w-3
	Acide docosahexanoïque	DHA	Acide 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaènoïque	C22:6 w-3

À cela s'ajoute une nomenclature souvent utilisée en physiologie et en biochimie qui se base sur le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturations et la position de la première double liaison C=C. Par exemple, l'acide gras **Cx:y *ω*-z** est constitué de **x** carbones, de **y** doubles liaisons C=C et dont la première est à la **z**^{ème} position en partant du côté opposé au groupe acide (Figure I.06).

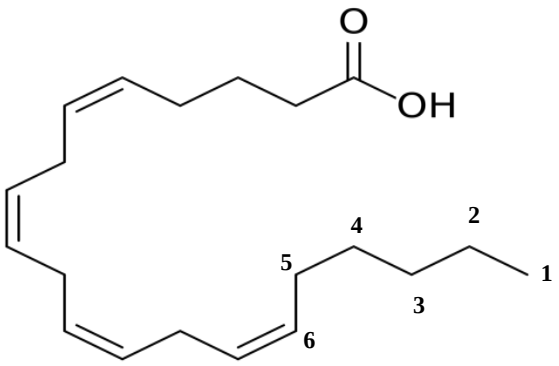


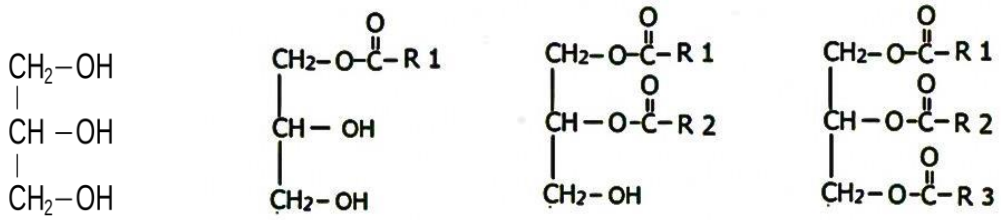
Figure I.06 : Structure chimique semi- développée de l'acide arachidonique (C20 : 4ω6)

I.2.4. Lipides simples

Les lipides simples ou homolipides sont les lipides qui ne contiennent que le carbone, l'hydrogène et l'oxygène. Ils sont souvent des esters d'un alcool et d'acides gras. Les lipides simples sont classés en trois groupes : les glycérides, les cérides et les stérides.

I.2.4.1. Glycérides

Les glycérides sont des lipides simples aussi appelés graisses. Ce sont des esters du glycérol et d'acides gras (un, deux ou trois acides gras). Selon le nombre d'acides gras combinés au glycérol, on distingue les monoglycérides, les diglycérides et les triglycérides. Les triglycérides sont les constituants principaux des graisses animales et des huiles végétales (plus de 95%). Les monoglycérides et les diglycérides sont beaucoup moins abondants que les triglycérides (Figure I.07). Dans l'organisme, les lipides sont stockés essentiellement sous forme de triglycérides.



Glycérol **Monoglycéride** **Diglycéride** **Triglycéride**

Figure I.07 : Structure chimique des glycérides.

I.2.4.2. Cérides

Les cérides sont également appelés cires. Ce sont des esters d'un alcool aliphatique primaire de longue chaîne, appelé alcool gras, et d'acides gras supérieurs à l'acide palmitique (16 atomes de carbones). Ils se trouvent aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. Chez les végétaux, ils sont représentés par une cuticule plus au moins imperméable à la surface des feuilles et des fruits et jouent un rôle protecteur.

I.2.4.3. Stérides

Les stérides sont des esters d'acides gras et de stérols. Les stérols sont des alcools tetracycliques rattachés au groupe des stéroïdes. Suivant l'origine des stérides, on distingue 3 groupes :

- **Fungistérols** : qui sont spécifiques aux champignons
- **Phytostérols** : constituants de la partie insaponifiable des végétaux.
- **Zoostérols** : présents dans les tissus animaux.

I.2.5. Lipides complexes

Les lipides complexes sont des lipides qui contiennent en plus du carbone, hydrogène et oxygène un ou plusieurs hétéroatomes (azote, phosphore, soufre). Suivant la nature de l'hétéroatome, on distingue : les lipides phosphorés, les lipides azotés et les lipides soufrés.

I.2.6. Lipides polyisopréniques

Les lipides polyisopréniques sont des lipides à base d'isoprène. Ce groupe des lipides est aussi appelé lipides insaponifiables et joue un rôle biologique fondamental (hormones et vitamines). Les lipides polyisopréniques sont divisés en Cinq catégories : les terpénoïdes, les caroténoïdes, les quinones à chaîne isoprénique , les stéroïdes et les tocophérols. Les carotènes (*pigment rouge-orangé*), les xanthophylles (*pigment jaune*) et la vitamine A font partie des caroténoïdes. La vitamine E, la vitamine K, les ubiquinones et les plastoquinones font partie des quinones à chaîne isoprénique. Les stéroïdes regroupent les stérols, les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D. Ces trois derniers sont des dérivés des stérols.

I.3. COMPOSÉS PHÉNOLIQUES (POLYPHÉNOLS)

I.3.1. Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. À l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées **(Mompon et al. 1998).** Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits **(Boizot et Charpentier., 2006)**.

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué **(Bruneton., 1993*)***.

Et aussi sont des substances ayant des propriétés antioxydantes très importantes, permettant de lutter contre la formation de radicaux libres en excès dans l'organisme (substances qui vont favoriser le vieillissement cellulaire), ils possèdent des propriétés bénéfiques pour la santé **(Kaliliet de Villier, 2011).**

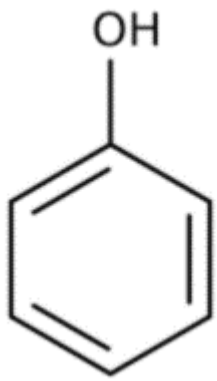


Figure I.08: Structure chimique du noyau phénol.

I.3.2. Différentes classes des polyphénols

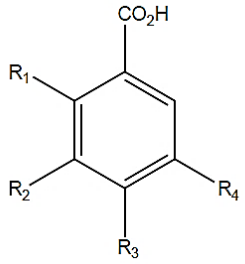
Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. En simplifiant, les polyphénols sont séparés en 4 grandes classes **(Crozier et al, 2006)**.

I.3.2.1.Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique **(Bruneton, 1993)**.

I.3.2.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïques et ont une formule de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou des glycosides. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique **(Bruneton, 1993)**.

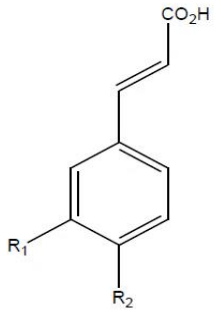


R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH	Acide *p*-hydroxybenzoïque
R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH	Acide protocaatéchique
R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH	Acide vanillique
R_1=H, R_2=R_3= R_4=OH	Acide gallique
R_1=OH, R_2=R_3= R_4=H	Acide salicylique

Figure I.09 : Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques.

I.3.2.2.2. Acides hydrox-cinnamiques

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérivé de celle de l'acide cinnamique. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (cis ou Z et trans ou E) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes trans sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes cis ne correspondent qu'à des artefactes d'extraction **(Macheix, 2005)**.

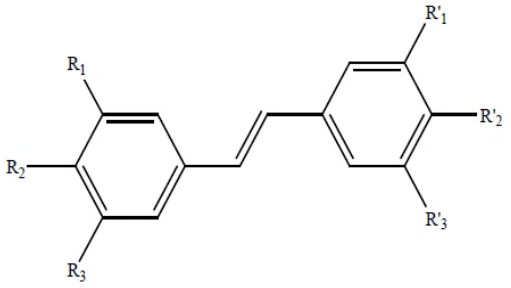


R_1=R_2=H	Acide cinnamique (non phénolique)
R_1=H, R_2=OH	Acide *p*-coumarique
R_1=R_2=OH	Acide caféique
R_1=OCH_3, R_2=OH	Acide férulique

Figure I.10: Quelques exemples des acides hydroxy-cinnamiques.

I.3.2.2. Stilbènes

Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (**Belkheiri, 2010)**. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques **(Jean-Denis, 2005; Crozier et al, 2006)**.



R_1=R_3= R'_2=OH, R_2=R'_1= R'_3=H	Resvératrol
R_1=R_3=OCH_3 , R2=R'_1=R'_3=H, R'_2=OH	ptérostilbène
R_1=glucose, R_2=R'_1=R'_3=H, R_3=R'_2=OH	picéide

Figure I.11 : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.

I.3.2.3. Flavonoïdes

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Les flavonoïdes identifiés jusqu'à maintenant sont de 4000 composés; ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV.

I.3.2.4. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandu dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique.

Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés **(Catier et Roux, 2007)**.

I.3.3. Propriété thérapeutique des composés phénoliques

En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques. Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants:

I.3.3.1. Contre les maladies cardiovasculaires

Consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaires **(Martin et Andriantsitohaina, 2002)**.

Les polyphénols pris lors d'un repas permettraient de lutter contre l'oxydation du mauvais cholestérol(LDL). Cela empêcheraient ainsi les phénomènes à l'origine de l'obstruction des artères.

I.3.3.2. Activité anti-cancérigène

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes **(Ames et al, 1995)**.

Récemment, une étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de plusieurs polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes sur les dommages causés à l'ADN des cellules hépatiques par divers composés hépatotoxiques et carcinogens (qui oxydent les bases, et cause de la rupture des deux brins d'ADN). La myricétine et la quercétine ont permis de diminuer la rupture des 2 brins d'ADN **(Delgado et al, 2004)**.

I.3.3.3. Activité anti-inflammatoire

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation. D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigenine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire **(Scalbert et al, 2005)**.

I.4.RADICAUX LIBRES ET LES ANTIOXYDANTS

I.4.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers **(Pincemail et al, 1999)**, ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense **(Morena et al, 2002)**.

I.4.2. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés **(Jacques et André, 2004)**, cette molécule est très instable et réagie rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre **(Martinez, 1995)**

I.4.2.1. Nature des radicaux libres

I.4.2.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau.

Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène. L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène **(Ichai et al, 2010)**.

- **Anion superoxyles**

La molécule d'oxygène, en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions **(Koechlin, 2006 ; Al-Mamun et al, 2007).**

$$O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$$

- **Radical hydroxyle**

Est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de $O_2^{\bullet -}$ et de métaux de transition sous la forme réduite, comme le présente la réaction de Haber-Weiss, ou par des voies qui ne font pas appel à l'anion superoxyde (réaction de Fenton) **(Lacolley, 2007).**

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot} \text{ (Réaction de Haber-Weiss)}$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^{\cdot} \text{ (Réaction de Fenton)}$$

- **Peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

C'est un oxydant faible, sa demie durée de vie se chiffre en heures. Le H_2O_2 est le résultat d'une dismutation spontanée ou enzymatique (superoxide dismutase "SOD") du radical superoxide **(Dacosta, 2003).**

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

Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) est également un agent oxydant très réactif ; c'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. S'il n'est pas rapidement détruit, il peut se décomposer et produire des radicaux hydroxyles qui s'attaquent aux macromolécules de la cellule **(Karp, 2010).**

- **Oxygène singulet $O_2^{\bullet}$**

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante**:**

$$O^{\bullet}–O^{\bullet} \longrightarrow {}^{1}O_2$$

I.4.3. Antioxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat **(Park et al, 2001)**. Et capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

I.4.3.1. Systèmes antioxydants

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en deux systèmes : enzymatiques et non enzymatiques.

I.4.3.1.1. Antioxydants enzymatiques

Représentés principalement par trois enzymes :

- Le superoxyde dismutase (SOD).
- La catalase.
- La glutathion peroxydase (GPx).

I.4.3.1.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piégeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules pro-oxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton **(Piquet et Hébuterne, 2007)**.

Ces agents piégeurs possèdent plusieurs avantages par rapport aux antioxydants enzymatiques, en particulier par leur petite taille qui leur permet de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre facilement leurs cibles. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

- **Vitamine E**

Le terme générique de vitamine E désigne en fait la famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l'α-tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma chez l'homme. L'α-tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet (O_2) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxyles ($ROO^{\bullet}$) pour former un radical tocophéryl.

- **Vitamine C**

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est présent le plus couramment sous forme d'ascorbate. Il est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piégeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles et de l'oxygène singulet **(Evans, 2000).** Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxyles aqueuses, le produit formé étant le radicale ascrbyle. En piégeant les radicaux peroxyles dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la péroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et lipoprotéines.

Pour la partie d'antioxydants non enzymatiques, le tableau suivant rassemble les principaux antioxydants non enzymatiques et leurs sources alimentaires associées (Tableau I.05) :

Tableau I.05: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, choux, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-carotène	Légumes et fruits orangés et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin

I.4.3.2.Utilisation des antioxydants

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps, en les abîmant et en accélérant le processus de vieillissement. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé stress oxydatif. L'initiation des phénomènes de réactions d'oxydations en chaîne dans l'organisme humain peut conduire à des pathologies comme l'athérosclérose, le cancer, l'infarctus, les allergies, les rhumatismes et d'autres.

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture.

Partie expérimentale

II.1. PRODUITS CHIMIQUES ET INSTRUMENTS

Les produits chimiques utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé.

Tableau II.01 : Produits et les instruments.

Produit	Marque	Instrument	Marque
Éther de pétrole (R-O-R)	ANALAR NORMAPUR	**Chauffe-ballon**	Wise Term
Acétone (C3H6O)	GPR RECTAPUR	**Rota-vapeur**	ASEM
Acétate d'éthyle ($CH_3COOCH_2CH_3$)	SIGMA-ALDRICH	**Spectrophotomètre UV-vis**	SHIMADZU
Folin-Ciocalteu	SIGMA-ALDRICH	**Etuve**	Memmert
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	SIGMA-ALDRICH	**Balance électrique**	KERN ABS
Méthanol. (CH_3-OH)	SIGMA-ALDRICH	**Vortex**	VELP
Éthanol (C_2H_6O)	SIGMA-ALDRICH	**moulin à café**	Moulinex
Acide ascorbique (vitamine C)	ANALAR NORMAPUR	**micropipette**	EASY
α-tocophérol (vitamine E)	SIGMA	**Réfrigérateur**	LG
Quercétine	SIGMA-ALDRICH	**Bain-marie**	Memmert
Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$)	MERCK	**Micropipette**	Socorex
DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)	ALADRICH		
Acide sulfurique (H_2SO_4)	SIGMA-ALDRICH		
Phosphate de sodium (Na_3PO_4)	SIGMA-ALDRICH		
Acide gallique	SIGMA-ALDRICH		
Sulfate de Sodium (Na_2SO_4)	BIOCHEM		

II.2. CUEILLETTE DES FEUILLES DE *Pistacia lentiscus*

Les échantillons des feuilles de *pistacia lentiscus* ont été récoltés de la région *Magtaa Kheira* (Wilaya de Tipaza) durant les premières semaines des mois Avril, Août, Octobre 2015 et Janvier 2016. Les feuilles sont séchées à l'ombre pendant un mois, puis conservées dans des sacs à papier.

II.3. EXTRACTION DES LIPIDES

Les feuilles ont été broyées à l'aide d'un moulin à café puis tamisées. L'extraction des lipides a été réalisée en utilisant le dispositif de Soxhlet de capacité 1 L. Les masses des échantillons des feuilles ont été comprises entre 300 et 400 g, le solvant utilisé été l'éther de pétrole 40-60°C. L'extraction a été arrêtée après l'épuisement des lipides (disparition de la couleur). Après filtration, le solvant a été évaporé sous pression réduite à 40°C.

La chlorophylle a été éliminée par le charbon actif (Poudre) en utilisant une quantité de ce dernier équivalente à 1/5 de la masse de l'extrait brut. Le mélange est mis en suspension avec 200 mL de chloroforme à reflux pendant 1 h. Après filtration et évaporation du chloroforme nous obtenons des extraits lipidiques dont le rendement est déterminé par la relation suivante :

$$\text{lipides\%} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la prise d'essai}} \times 100$$

II.3.1. Préparation des esters méthyliques des acides gras (EMAG)

Une quantité de 200 mg des lipides a été saponifiée à reflux pendant 20 minutes avec 10 mL d'hydroxyde de potassium de concentration 1 N ; l'estérification est réalisée pendant 10 minutes en ajoutant par le haut du réfrigérant 5 mL de trifluorure de bore méthanolique BF_3 à 10 %. Après refroidissement, un volume de 20 mL d'eau distillée a été ajouté, les EMAG ont été extraits à l'aide d'une ampoule à décanter par une extraction liquide-liquide en utilisant le chloroforme comme solvant (3x30 mL). Les EMAG ont été neutralisés par lavage avec l'eau plusieurs fois.

Les traces d'eau ont été chassées par l'ajout d'une quantité nécessaire de sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C. Les EMAG ont été récupérés par 2 mL de chloroforme puis mis à l'étuve de 37°C jusqu'à évaporation du solvant. Les EMAG ont été conservés au frais à une température +4°C jusqu'à leurs analyses.

II.3.1.1. Analyse chromatographique des EMAG(s)

L'analyse des EMAG a été faite par un chromatographe en phase gazeuse (modèle CP-Varian 3800) équipé d'un détecteur FID et une colonne capillaire DBWax (diamètre interne 60 mx 0,32 mm, épaisseur du film de 0,25 µm). 2 µL de l'échantillon dilué dans le pentane a été injecté en mode d'injection Split. La température du four est programmée de quatre différents paliers. La température a débuté à 40°C, maintenue pendant 0,5 min, puis a augmenté à un taux de 25°C/ min à 195°C, puis augmentée à une vitesse de 3°C / min à 205°C, puis augmentée avec une vitesse de 8°C/min jusqu'à 230°C, puis augmentée avec une vitesse de 20°C/min à 260°C et maintenue pendant 5 min.

La température de l'injecteur est réglée à 250°C et celle du détecteur 260°C, le débit de l'hélium (gaz vecteur) est de 1 mL/min. Les EMAG ont été identifiés en comparant les temps de rétention des pics avec ceux des étalons purs achetés chez Sigma et analysés sous les mêmes conditions. Les résultats d'acides gras dans la fraction lipidique ont été exprimés en pourcentage de la surface totale des aires des pics identifiés.

II.3.1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) des EMAG (s)

L'analyse GC-MS a été effectuée sur un appareil AGILENT 6890 GC/CMSD 5973 équipé d'une colonne capillaire UB-Wax (30 mx 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film de 0,25 µm) et un détecteur quadripolaire avec un potentiel d'ionisation fixé à 70 eV. L'hélium est le gaz vecteur à un débit de 1 mL/min. Les températures d'injecteur et du détecteur de la ligne de transfert ont été fixées à 250°C et 220°C, respectivement. La température de la colonne est programmée que celle de la chromatographie en phase gazeuse. Un volume de 1 µL des échantillons dilués dans le pentane ont été injectés manuellement en utilisant un mode splitless.

II.3.2. Analyse des Tocophérols

II.3.2.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Les quantités des tocophérols totaux dans les extraits lipidiques ont été déterminées par colorimétrie en utilisant la méthode connue celle d'Emmerie-Engel **(Emmerie et Engel, 1939).** Dans cette méthode, 1 mL d'une solution éthanolique de lipide a été mélangé avec 1 mL d'une solution éthanolique 0,4% d'orthophénantroline et 0,5 mL d'une solution éthanolique 0,12% de trichlorureferrque $FeCl_3$. Le mélange est maintenu à l'obscurité pendant 5 minutes. Les absorbances ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 510 nm. Les quantités des tocophérols totaux ont été calculées à l'aide d'une courbe d'étalonnage de l'alpha tocophérols (vitamine E) commercial traité de la même façon que celle des extraits lipidiques. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en alpha-tocophérols par gramme de lipides.

II.3.2.2. Dosage des tocophérols par CLHP

Nous avons effectué l'analyse par CLHP en utilisant un appareil de type Waters muni d'une colonne polaire classique de silice, l'élution des tocophérols a été faite en mode isocratique en utilisant le mélange des solvants hexane/isopropanol (99/1 : v/v). Une quantité de 20 µL d'extrait brut dilué dans le pentane. La détection est faite par fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et une longueur d'onde d'émission de 330 nm. Les différents isomères des tocophérols ont été identifiés par comparaison à des tocophérols étalons (standards) (α-, β-et δ- tocophérols). Les résultats sont exprimés en pourcentages à l'aide des calculs des aires des pics de chaque isomère.

II.3.3. Dosage des stérols totaux

Il s'agit d'une absorption spectrophotométrique selon le test de Liebermann-Burchard **(Naudet et Hautfenne, 1986 ; Barreto, 2005)**, basé sur une réaction colorée spécifique des 3 β-hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm. Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 mL d'anhydride acétique et 10 mL d'acide sulfurique concentré et 30 mL d'acide acétique.

À partir d'une solution choloroformique du cholestérol commercial de concentration 1 g/L, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de la concentration. On prend 1 mL de chaque solution et on ajoute 2 mL du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 min. en mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe d'étalonnage. Les échantillons sont traités de la même manière et la teneur en stérol sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en cholestérol/g de l'extrait brut.

II.3.4. Évaluation de l'activité antioxydante

Avant d'entamer l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons procédé tout d'abord à éliminer les cires des extraits lipidiques, car nous avons constaté lors des manipulations la formation des solutions troubles et des précipités qui faussent la lecture des absorbances et par conséquent les résultats relatifs aux valeurs des activités antioxydante. Les cires ont été éliminées par glaçage des extraits lipidiques et cela en dissolvant la quantité totale des lipides dans l'éthanol absolu et la conserver au réfrigérateur à+4°C pendant 24 h. Les cires se précipitent et sont éliminées par filtration L'éthanol est évaporé, on obtient les lipides bruts sans cires.

II.3.4.1. Test DPPH

Le *1,1*-diphényl-*1,2*-picrylhydrazyle (DPPH$^{\bullet}$) est un radical stable et présente une absorption spécifique à 517 nm qui lui confère une couleur violette. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH·de coloration violette pour le stabiliser en DPPH-H de coloration jaune-verte **(Chevalley, 2000).**La réduction du radical libre DPPH ·par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par la présence des extraits lipidiques (Figure II.01).

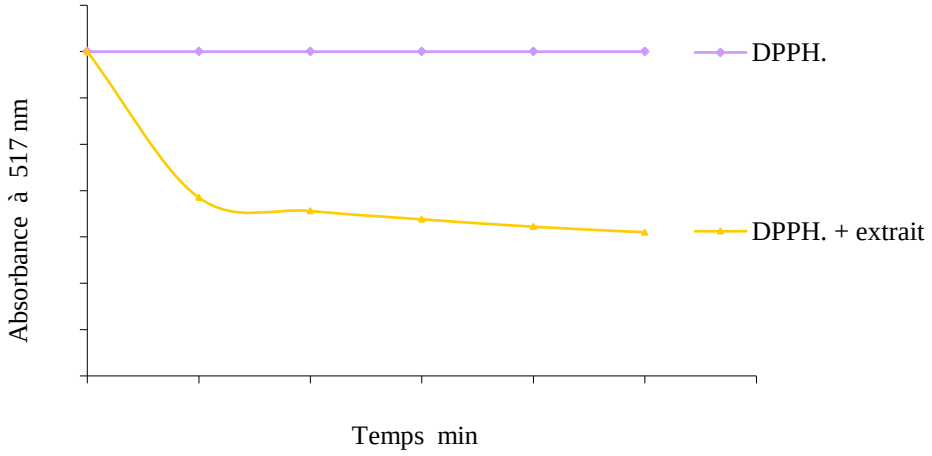


Figure II.01 : Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans le test du DPPH.

Le DPPH• est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (FigureII.02). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors, d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de différentes substances de nos extraits. Il est donc prévu à fournir un lien avec les réactions ayant lieu dans un système d'oxydation, tel que l'auto-oxydation d'un lipide ou de toute autre substance insaturée.

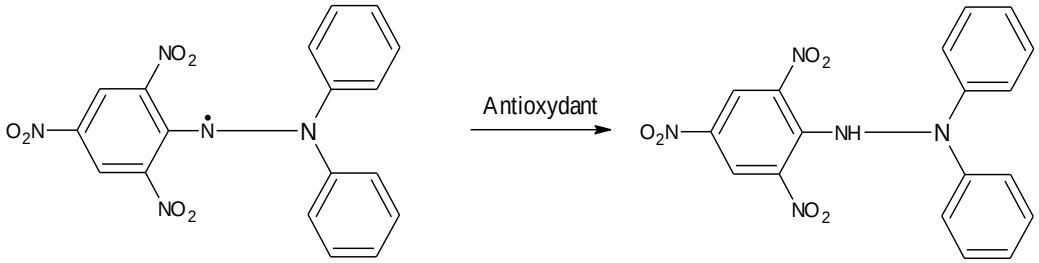


Figure II.02 : Réduction du radical libre DPPH•.

Dans le test du DPPH, le mécanisme principal d'action des composés phénoliques est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H au DPPH• qui se transforme en une molécule stable DPPH-H. La capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH). Pour réaliser ce test, 1 mL de chaque extrait dilué dans l'éthanol est additionné à 1 mL d'une solution de DPPH• (250 µM) préparée dans l'éthanol.

Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc. Nous avons également, testé la vitamine C et la vitamine E comme des antioxydants commerciaux pris comme antioxydants de référence.

L'activité anti-radicalaire de nos extraits est exprimée en EC_{50} qui est définie comme étant la concentration en (mg/mL) de l'extrait capable d'inhiber 50 % des radicaux libres selon la relation suivante :

$$PI\% = \left(\frac{A_t - A_{ech}}{A_t}\right) \times 100$$

A_t : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A_{ech} : absorbance en présence d'extrait.

II.3.4.2.Test de blanchissement du β-carotène

Le protocole expérimental a été basé sur les travaux de **Marco (1968), Miller (1971) et Silvia et al. (1984)** avec quelques modifications. Un volume de 5 mL de solution de *β*-carotène dans le dichlorométhane (0,1 mg/mL) a été additionné à 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 80 contenus dans un ballon rond. Le dichlorométhane a été complètement éliminé à 40°C sous vide, puis on ajoute lentement 50 mL d'eau distillée et on agite vigoureusement. 40 µL de différentes dilutions de lipide préparées dans l'éthanol ont été ajoutées à 1 mL d'émulsion β-carotène/acide linoléique. Un control a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant les extraits par l'éthanol. L'absorbance des solutions a été mesurée à 490 nm avant et après 2 h d'incubation dans un bain-marie à 50°C. L'activité antioxydante (AA%) en pourcentage a été calculée à l'aide de la formule suivante:

$$AA\% = \left(\frac{A_{E(120)} - A_{C(120)}}{A_{C(0)} - A_{C(120)}}\right) \times 100$$

Où : $A_{E(120)}$ est l'absorbance de la solution en présence de lipide à t = 120 min

$A_{c(120)}$ est l'absorbance du control à t = 120 min

$A_{c(0)}$ est l'absorbance du control à t = 0 min

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en EC_{50} qui est défini comme étant la concentration en (mg/mL) de l'extrait capable d'inhiber 50 % d'émulsion β-carotène/acide linoléique. Nous avons, également testé la vitamine E comme antioxydant commercial de référence.

II.3.5. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées avec trois réplicas (répétitions). Le résultat de chaque paramètre déterminé a été exprimé statistiquement comme suit : moyenne ± déviation standard (sur la base de trois expériences « ou répétitions » indépendantes).

L'analyse statistique des données a été effectuée en utilisant le logiciel XLSTAT version 2016.02.27444.

II.3.5.1. Analyse de variance ANOVA et corrélations

Les données brutes obtenues ont été analysées par la méthode d'analyse de variance (ANOVA) combinée en postérieur par la procédure post-test « post-hoc » à tests multiples de Tukey (HSD : abréviation de Honestly Significant Difference). Des valeurs de *P* inférieures à 5% (P <0,05) ont été considérées comme significatives. Le test des comparaisons multiples de Tukey, dit test HSD a pour but de distinguer parmi les échantillons s'il y en a qui diffèrent significativement des autres. Dans le cas où le test de Fisher a conduit à rejeter l'hypothèse que les échantillons ne diffèrent pas significativement, on cherche à savoir quels échantillons se distinguent des autres. Pour cela, le test HSD envisage le test des échantillons deux par deux et les corrélations entre les différents paramètres ont été déterminées en utilisant le coefficient de *Pearson* à un niveau de signification P <0,05.

II.3.5.1.1. Classification ascendante hiérarchique (CAH) et analyse en composantes principales (ACP)

La classification ascendante hiérarchique (CAH) « Agglomerative Hierarchical Clustering AHC » est une méthode de classification automatique utilisée en analyse des données ; son but est de répartir les individus dans un certain nombre de classes. La classification ascendante hiérarchique est dite ascendante car elle part d'une situation où tous

les individus sont seuls dans une classe, puis sont rassemblés en classes de plus en plus grandes. Le qualificatif hiérarchique vient du fait qu'elle produit une hiérarchie.

La méthode suppose qu'on dispose d'une mesure de dissimilarité entre les individus ; dans le cas de points situés dans un espace euclidien, on peut utiliser la distance comme mesure de dissimilarité.

L'analyse CAH a été réalisée à l'aide du regroupement hiérarchique agglomératif en utilisant la méthode « ou technique » de Ward, avec une mesure de la distance de type euclidien. Le calcul a été effectué à la base d'un ensemble d'individus composé de 19 échantillons d'acides gras AG (différentes plantes de la région de Zéralda réparties sur quatre mois de collecte). Le nombre total de variables adoptées était de 9 (représentant simplement les principaux composants d'AG identifiés chez tous les individus investigués, ou encore, les paramètres les plus influents qui pourraient faire une différence, c'est-à-dire certains composés minoritaires d'AG).

Pour l'analyse ACP elle a été réalisée avec les mêmes nombres d'individus et de variables que ceux mentionnés plus haut pour l'analyse CAH.

II.4. EXTRACTION & QUANTIFICATION DES POLYPHÉNOLS

II.4.1. Extraction des polyphénols

Pour l'extraction des composés phénoliques, nous avons adopté la méthode couramment employée **(Hertog et Hollman, 1992 ; Djeridane et al, 2006)**.

Une quantité de 5 g de feuilles délipidées est macérée à température ambiante dans 100 mL d'un mélange hydro-alcoolique méthanol/eau (80/20 : V/V) pendant 24 heures. L'extrait est filtré puis le résidu est repris pour une deuxième fois avec un volume de 50 mL du même mélange hydro-alcoolique pendant 24 heures à température ambiante. On obtient donc l'extrait hydro-alcoolique brut. Après élimination du méthanol, la phase aqueuse restée est ensuite soumise à une triple extraction liquide-liquide avec un même volume d'acétate d'éthyle. L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à sec, après séchage par le sulfate de sodium anhydride. La teneur en extrait brut a été calculée par rapport à 100g de feuilles délipidés par la relation :

$$\text{extrait phénolique brut} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la prise d'essai}} \times 100$$

Le résidu est repris dans 4 mL de méthanol pur et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

II.4.2. Dosage des phénols totaux

Le protocole utilisé dans notre laboratoire est basé sur celui décrit par **Vermerris et Nicholson (2006)**, en y apportant quelques légères modifications (Pourcentage de Na_2CO.

Un volume de 100 µL de chaque solution est introduite à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais suivi de l'addition de 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et de 2 mL de carbonate de sodium Na_2CO_3 (5% m/v) sont ajoutés après 2 minutes. Les solutions sont secouées immédiatement, puis maintenues à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de chaque solution est déterminée à 760 nm contre un blanc dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601.

Pour calculer les quantités des composés phénoliques dans les extraits, une courbe étalonnage d'acide gallique ayant des concentrations comprises entre 0.03 et 0.30 g/L. a été tracée. Les valeurs des quantités en composés phénoliques sont exprimées en g équivalent d'acide gallique par 100 g de feuille (g EAG/100 g feuille).

II.4.3. Dosage des flavonoïdes

Dans cette étape, nous avons utilisé le protocole adapté par Lamaison et Carnat **(Djeridane et al, 2006)**, utilisant le réactif de tri chlorure d'aluminium.

Dans ce test, le trichlorure d'aluminium forme un complexe stable avec les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe de coloration jaune absorbe à une longueur d'onde maximale de 409 nm.

Un volume de 1 mL de chaque solution diluée est mélangé avec 1 mL d'une solution aqueuse de tri chlorure d'aluminium à (2% m/v). Par la suite, les solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 20 min. L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 409 nm contre un blanc.

Les teneurs en flavonoïdes des extraits ainsi préparées ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine choisie comme étalon, elles sont exprimées en g équivalent de quercétine par 100 g de feuille (g EQ/100 g feuille).

II.4.4. Dosage des tanins condensés

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide, il est spécifique des flavones3-ols **(Price et al, 1978)**.

On prend 200 µL d'extraits et mélangés avec 1 mL d'un mélange vanilline/acide chlorhydrique (1%/8% : V/V) dans des tubes à essais, les tubes sont placés dans un bain marie pendant 20 min à 30°C, la lecture de l'absorbance a été faite à 500 nm. Différentes concentrations préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage. Les teneurs en tanins sont exprimées en g équivalent de catéchine par 100 g de feuille (g EC/100g feuille).

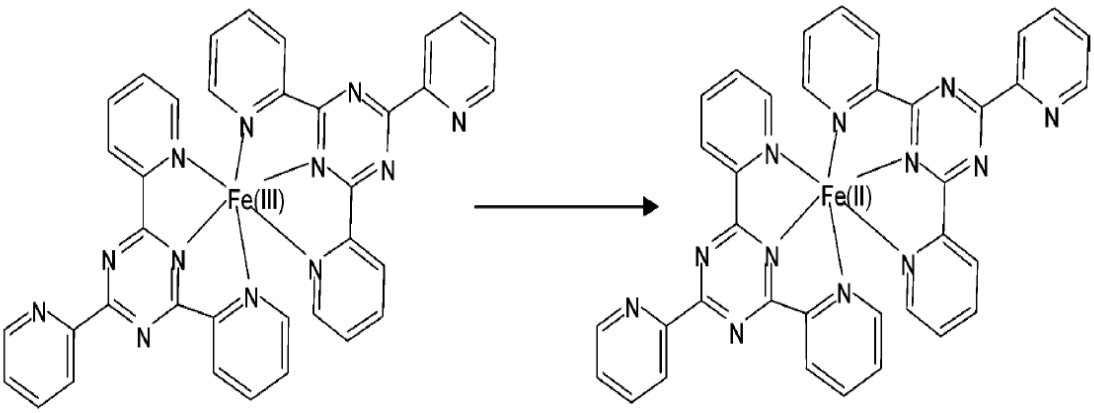
II.4.5. Activité antioxydante des extraits phénoliques

II.4.5.1. Test DPPH

Le test a été effectué avec le même protocole que celui employé pour les lipides, sauf que pour les extraits phénoliques les dilutions ainsi que la solution du DPPH ont été préparées dans le Méthanol. Le calcul et l'expression des résultats ont été faits de la même façon.

II.4.5.2. Test FRAP

Ce test est basé sur la réduction du complexe Fe^{3+}-TPTZ (tripyridyltriazine) en sa forme ferreuse (Fe^{2+}-TPTZ) par l'extrait antioxydant à un pH acide (Figure II.03). Ceci engendre l'apparition d'une couleur bleue avec une absorbance maximale à λ = 593nm. **(Benzie et Strain, 1996)**.



Fe^{3+}-TPTZ + reducing antioxidant ⟶ Fe^{2+}-TPTZ (intense blue at 595 nm)

Figure II.03 : Réaction FRAP et le complexe Fe^{3+}-TPTZ **(Prior et al, 2005).**

Un volume de 1 mL du réactif FRAP fraîchement préparé (10 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 3,6) et mélangé avec 1 mL d'une solution de TPTZ (10 mM préparés dans une solution HCl 40 mM) et 1 mL d'une solution $FeCl_3$ (20m M)) a été ajouté à 50 µL de l'extrait à différentes concentrations. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 593 nm contre le blanc après 7 minutes à la température ambiante.

L'inhibition de FRAP est calculée par la relation suivante:

$$PI\% = \left(\frac{A_e}{A_0}\right) \times 100$$

où :

A_e : est l'absorbance des extraits d'échantillon

A_0 : est l'absorbance de 100% de réduction des ions ferriques dans 1 mL de réactif FRAP en présence de la vitamine C antioxydant pris comme référence (Figure II.04).

Les résultats sont exprimés en EC_{50} (concentration fournissant 50% d'inhibition).

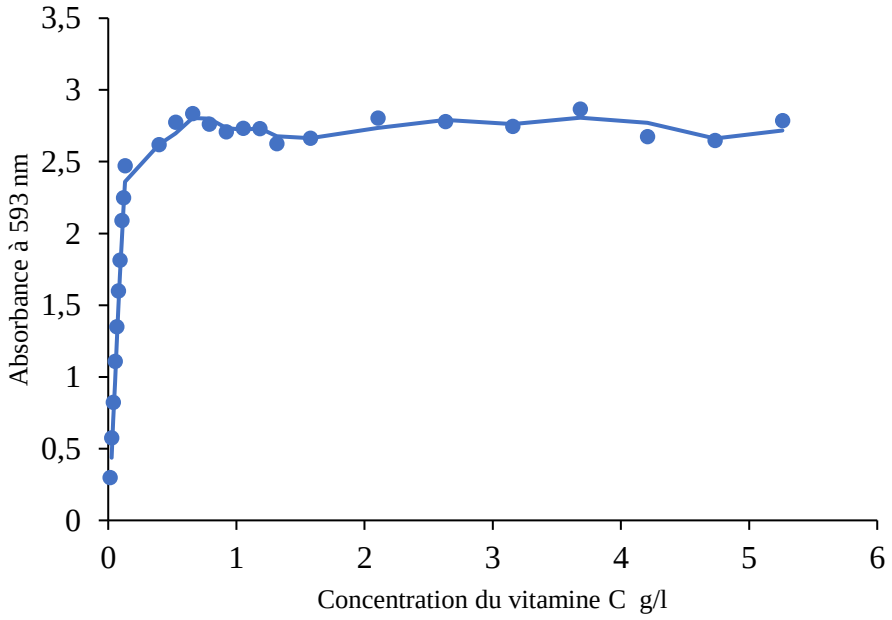


Figure II.04 : Courbe de réduction des ions ferriques.

II.4.5.3. Test ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ de coloration vert-bleu en le transformant en ABTS incolore, en présence de l'antioxydant (extraits phénoliques).

Le radical préformé [2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] ou $ABTS^{\bullet+}$ est généré en présence de la peroxydase ; préparée dans une solution tampon pH= 7, la réaction est initiée avec l'ajout de la solution de peroxyde d'hydrogène.

En présence d'un antioxydant (extraits phénoliques), le passage du radical $ABTS^{\bullet+}$ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert-bleu intense qui peut être suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 415 nm **(Chen et al, 2004)**.

Pour pouvoir générer le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$, nous avons préparé trois solutions différentes constituées d'une solution aqueuse d'ABTS (20 mM), une solution aqueuse de H_2O_2 (10 mM) et une solution de la peroxydase (préparée dans un tampon phosphate pH=7) de concentration massique (0,2 mg/mL).

Le mélange des trois solutions avec un rapport (10 : 1 : 1) présente une coloration vert-bleue correspondant à la formation du radical cationique $ABTS^{\bullet+}$.

À 100 µL de chaque dilution de l'extrait, 1 mL de la solution verdâtre d'$ABTS^{\bullet+}$ est ajouté, le mélange est ensuite agité puis incubé pendant 5 min à l'obscurité. La mesure de l'absorbance du milieu réactionnel est faite dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 601 à 415 nm contre un blanc. L'expression générale des résultats a été faite selon le même mode que celui décrit pour le test DPPH.

Résultats et discussion

III.1. QUANTIFICATION DES LIPIDES

III.1.1. Rendement de l'extraction

Les valeurs maximums, minimums et moyennes des rendements de l'extraction des lipides des 19 échantillons des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont représentées dans la Figure III.1 Les valeurs de ces rendements en fonction des saisons des cueillettes varient dans le même sens (même profil) qu'elle soit pour les valeurs maximales, minimales ou moyennes. D'après la figure III.01, on remarque que la teneur en lipides atteint sa valeur maximale (1,94-4,12%) au mois de janvier où les fruits de *Pistacia lentiscus* sont matures. Par contre la teneur minimale en lipides (1,33-3,37%) est enregistrée dans le mois d'août.

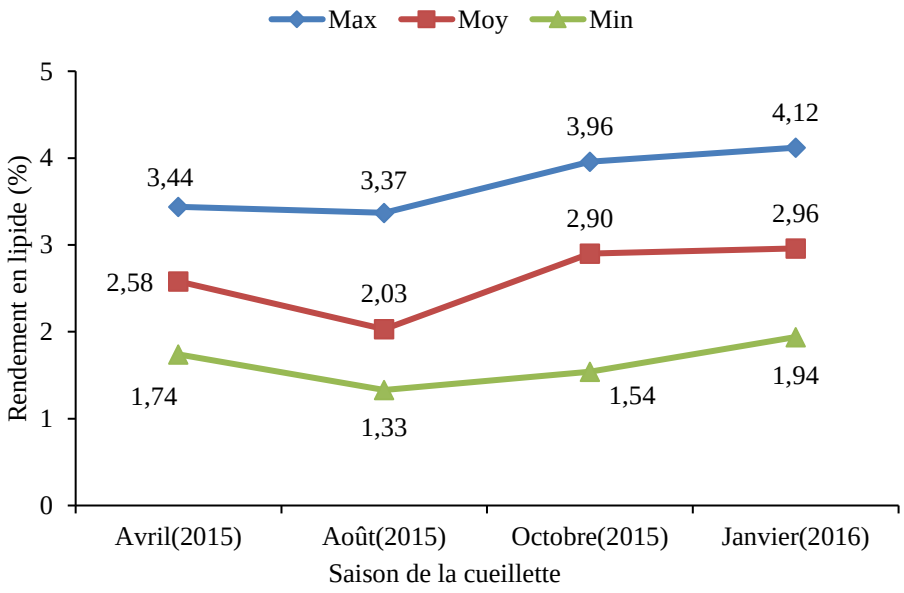


Figure III.01: Variation saisonnière du rendement des lipides.

Les valeurs des rendements montrent que l'accumulation des lipides dans les feuilles de *Pistacia lentiscus* dépend de la saison de la cueillette des feuilles. Il faut noter que c'est la première fois qu'une étude a été entreprise visant à suivre la variation de la teneur en lipides en fonction du stade phonologique de la plante. Si on compare les résultats obtenus relatifs aux rendements en lipides par rapport aux plantes riches (fruits et graines oléagineuses), on peut conclure que les feuilles de *Pistacia lentiscus* sont pauvres en lipides, ce qui prouve que les feuilles ne seront pas considérées comme sources alimentaires en lipides.

Par contre les lipides de cette plante peuvent être utilisés à des applications pharmaceutiques et cosmétiques à condition que ces lipides contiennent des molécules bioactives comme les tocophérols et les acides gras insaturés connus par leurs activités biologiques. Ces hypothèses peuvent être confirmées dans la suite de cette étude.

III.1.2. Composition en acides gras

Les Résultats de l'analyse des EMAG par chromatographie FID et couplée à la masse des 19 échantillons collectés durant chaque saison sont regroupés dans le tableau III.01. Les acides gras identifiés dans les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont ceux rencontrés habituellement dans les lipides du règne végétal. Ces acides gras contiennent dans leurs structures des nombres impairs et pairs d'atomes de carbone. La majorité des extraits lipidiques renferment des acides gras saturés et insaturés d'atomes de carbone de C_{10} à C_{24}.

D'après ces résultats, on remarque que la composition en acides gras varie beaucoup selon la saison de cueillette. Dans tous les échantillons, les acides gras saturés majoritaires détectés sont : le myristique dont son pourcentage varie entre 2,94 % en octobre et 16,61% en avril, suivi l'acide palmitique de où son pourcentage est compris entre 5,31% dans le mois de janvier et 15,88% dans le mois d'avril, l'acide décanoique vient en troisième position avec des pourcentage 1,71 % en août et 13,88 % en janvier et en dernier l'acide stéarique qui a enregistré les pourcentages 0,87 % en janvier et 8,09 en août. D'un autre coté les acides gras insaturés majoritaires sont représentés par les acides oléique, linoléique et linolénique. La première position est prise par l'acide linolénique avec des pourcentages qui varient de 5,04% au mois d'août et 48,92 % en janvier, suivi par l'acide linoléique dont sa teneur est comprise entre 5,40% au mois d'aout et 14,73 % pour le mois de janvier, l'acide oléique se classe en dernière position avec 3,42 % dans le mois de janvier et 12,77% en aout. D'autres acides gras insaturés sont aussi présents dans les extraits lipidiques des feuilles de *Pistacia lentiscus* avec des faibles pourcentages qui ne dépassent pas les valeurs, ces acides gras sont les acides dérivés de l'arachidique (C20:1, C20:2, C20:3 et C20:5) et l'acide gras Docosadienoic (C22:2). A la lumière des résultats du tableau, on constate que la somme des acides gras saturés varie de 21,96% en janvier à 45,57% pour le mois d'avril, par contre les acides gras monoinsaturés représentent un total entre 3,66% en janvier et 20,32% pour le mois d'avril, en ce qui concerne les acides gras polyinsaturés leur somme s'échelonnent entre 18,54% en aout et 65,27 % en janvier.

Tableau III.01: Composition relative en acides gras des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus*

	Avril (2015)					Août (2015)					Octobre (2015)				Janvier (2016)				
Échantillons	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**
Acides gras																			
C10:0	7,29	4,79	2,74	-	9,49	7,37	8,25	10,18	1,71	9,58	5,12	10,56	9,57	3,85	2,49	11,74	13,88	3,18	2,57
C11:0	2,32	-	3,34	-	-	3,13	4,76	5,28	1,94	2,6	1,06	2,26	3,24	-	0,8	1,64	2,86	-	-
C12:0	1,65	-	4,45	3,75	-	3,09	3,49	8,09	3,15	2,29	1,25	4,61	2,8	-	0,87	2,42	2,16	-	-
C13:0	1,69	-	1,39	3,05	2,45	2,15	-	1,83	-	2	-	1,62	-	-	0,94	1,32	-	-	1,62
C14:0	8,67	9,57	9,32	16,61	7,42	10,11	8,78	3,58	5,54	8,69	5,72	2,94	4,36	10,07	6,43	8,19	7,38	4,71	9,12
C14:1w5	-	-	1,34	-	2,27	-	-	1,43	-	-	1,08	0,75	-	1,71	-	-	1,77	-	-
C15:0	-	-	1,93	2,91	-	-	-	1,23	-	-	-	-	-	2,08	0,73	1,32	1,54	-	1,35
C15:1w5cis	-	-	1,55	2,57	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	15,98	14,55	11,85	13,56	11,93	9,46	10,73	7,83	10,8	8,12	9,96	7,02	10,11	8,56	7,49	8,05	6,9	5,31	9,03
C16:1w9	1,74	2,53	-	2,74	3,38	-	-	-	-	1,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:0	-	-	-	-	2,19	-	-	-	1,51	-	-	-	-	-	0,54	-	-	-	-
C17:1w7cis	1,43	2,89	-	-	-	-	-	-	2,46	1,89	-	-	-	1,42	-	-	-	-	-
C18:0	2,8	4,17	2,8	3,14	3,13	1,79	2,59	1,36	2,61	1,66	1,98	1,76	2,03	2,92	0,88	1,53	1,79	-	-
C18:1w9	10,34	14,9	8,02	10,15	11,59	9,48	12,74	7,18	12,77	8,97	9,9	8,11	9,35	8,79	3,66	4,11	4,66	3,42	4,85
C18:2w6	9,52	13,92	9,47	9,15	5,49	7,74	11,35	6,5	10,24	9	11,06	9,38	12,72	10,82	14,73	11,25	10,94	12,4	16,99
C18:3w3	9,14	16,73	11,8	7,93	5,04	16,94	28,29	16,92	18,6	18,27	38,25	14,71	22,82	20,04	48,92	27,71	25,07	20,9	33,94
C20:0	1,58	-	2,11	2,55	2,27	1,6	3,41	1,19	1,82	-	1,19	1,04	1,85	1,94	0,79	1,36	2,07	7,07	1,96
C20:1w9	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	1,21	-	-	-	-	1,35	2,19	6,56	-
C20:2	3,46	-	1,39	-	2,71	3,45	-	1,55	-	2,76	-	1,15	-	3,56	0,74	1,61	1,47	4,9	1,92
C20:3w6	-	-	-	-	2,85	1,97	-	-	1,53	2,32	-	-	-	1,58	-	-	1,52	3,27	1,72
C20:3w3	-	2,84	-	-	-	-	-	-	2,14	-	-	1,06	-	-	-	-	-	-	-
C20:5w3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83	-	-	-	1,55	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	2,41	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	-	-	-	-	-
C22:2	2,02	-	2,57	2,94	2,45	1,77	-	-	2,19	-	1,24	1,49	-	2,21	0,88	1,3	1,56	3,34	1,46
C23:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,73	-
C24:0	-	-	-	-	2,93	3,89	-	1,79	-	-	-	1,97	-	3,28	-	-	-	-	-
Total	**79,63**	**86,89**	**76,07**	**81,05**	**77,07**	**80,05**	**94,39**	**74,15**	**80,81**	**81,63**	**89,02**	**69,29**	**78,85**	**82,25**	**90,89**	**86,45**	**87,76**	**77,79**	**86,53**
AGS (%)	**41,98**	**33,08**	**39,93**	**45,57**	**44,22**	**42,59**	**42,01**	**42,36**	**29,08**	**34,94**	**26,28**	**33,78**	**33,96**	**35,40**	**21,96**	**37,57**	**38,58**	**23,00**	**25,65**
AGMI (%)	**13,51**	**20,32**	**10,91**	**15,46**	**17,24**	**9,48**	**12,74**	**8,61**	**17,03**	**14,34**	**12,19**	**8,86**	**9,35**	**11,92**	**3,66**	**5,46**	**8,62**	**9,98**	**4,85**
AGPI(%)	**24,14**	**33,49**	**25,23**	**20,02**	**18,54**	**31,87**	**39,64**	**24,97**	**34,70**	**32,35**	**50,55**	**28,62**	**35,54**	**38,21**	**65,27**	**43,42**	**40,56**	**44,81**	**56,03**
Total AGI (%)	**37,65**	**53,81**	**36,14**	**35,48**	**35,78**	**41,35**	**52,38**	**33,58**	**51,73**	**46,69**	**62,74**	**37,48**	**44,89**	**50,13**	**68,93**	**48,88**	**49,18**	**54,79**	**60,88**
I/S (%)	**0,90**	**1,63**	**0,91**	**0,78**	**0,81**	**0,97**	**1,25**	**0,79**	**1,78**	**1,34**	**2,39**	**1,11**	**1,32**	**1,42**	**3,14**	**1,30**	**1,27**	**2,38**	**2,37**
Lipides (%)	**1,83**	**1,74**	**3,32**	**3,44**	**1,88**	**1,33**	**1,90**	**1,68**	**3,37**	**2,67**	**2,80**	**1,54**	**3,96**	**3,53**	**2,76**	**1,94**	**2,50**	**4,12**	**3,49**
Cires (%)	**60,64**	**57,89**	**54,50**	**9,47**	**45,39**	**62,33**	**66,75**	**11,53**	**68,09**	**68,96**	**60,66**	**51,07**	**23,03**	**66,17**	**54,08**	**59,85**	**59,92**	**52,39**	**66,63**

Une remarque importante qui attire l'attention est que le quotient AGIS/AGS pour les lipides des échantillons des deux mois de janvier et octobre est supérieur à 1 (il varie de 1,1 à 3,14), ce qui indique que ces échantillons sont riches en acides gras insaturés. Par contre la majorité des lipides des échantillons des deux autres mois se comporte contrairement où le quotient AGIS/AGS est inférieur à 1 (il varie de 0,78 à 0,97), indiquant que les acides gras saturés sont majoritaires dans ces échantillons.

D'une façon générale, l'ordre de croissance des pourcentages en acides gras est AGPI>AGS>AGMI pour les échantillons collectés en hivers et automne, cet ordre est relativement inversé AGS>AGPI>AGMI pour les échantillons du printemps et l'été.

Les valeurs de AGI/AGS pour les lipides de janvier et octobre sont supérieures à 1, ce qui donne aux lipides une bonne prévention à l'oxydation. Rappelons que les AGMI ont une grande importance en raison de leurs implications nutritionnelles et de leur effet sur la stabilité oxydative des lipides.

Ces résultats suggèrent que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* riches en acides gras insaturés pourraient servir de source potentielle pour la santé. Selon la littérature, il a été reconnu que les AGMI peuvent abaisser le taux de cholestérol dans le sang, moduler la fonction immunitaire, diminue la susceptibilité à l'oxydation des LDL et améliore la fluidité des HDL (**Villa et al, 2002)**.

Un régime alimentaire enrichi en AGPI peut également être important pour la structure et la fonction de nombreuses protéines y compris les récepteurs, les enzymes et les molécules de transport actives (**Yaqoob, 2002)**.

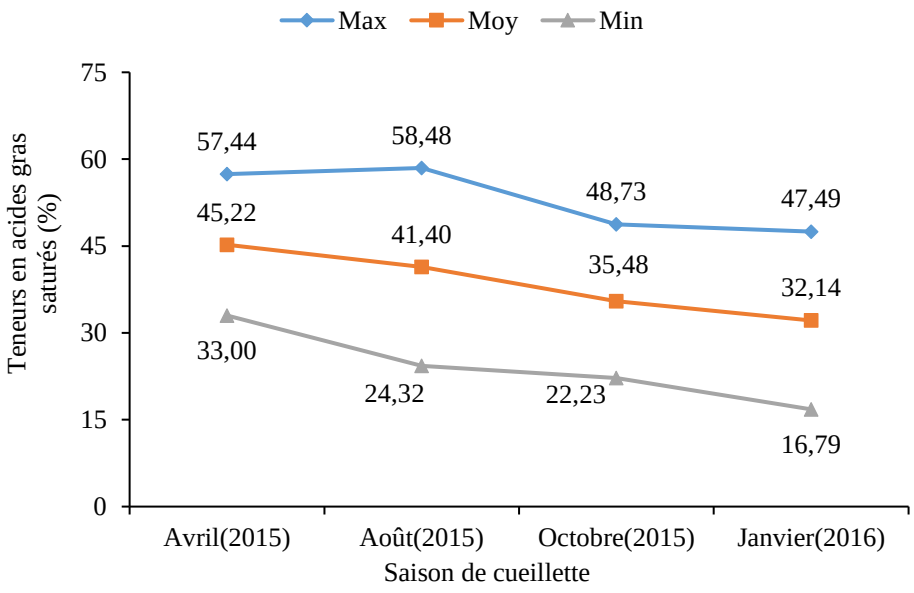
Afin de comparer les résultats relatifs à la composition en acides gras de nos échantillons avec d'autres études sur les feuilles de la même plante, une publication a été trouvée celle du **Diamantoglou et al en 1979**. La comparaison des résultats obtenus de notre étude avec ceux de la publication ont révélé des similitudes mais de nombreuses différences (Tableau III.02). Commençant par les similitudes, nos échantillons présentent des gammes comparables avec celles de la publication pour les acides gras C14:0, C18:0 et C18:2. En ce qui concerne les différences, il y a beaucoup de di-similarités trouvées. L'acide gras C16: 1 qui n'a pas été détecté dans la plus part de nos échantillons notamment ceux de l'hiver et l'automne et qui est présent comme composé mineur dans les échantillons de la littérature.

Les valeurs des pourcentages de C16:0 et C18:1 dans nos échantillons sont plus faibles que celles de la publication considérée. Enfin, la variation des teneurs de C18:3 dans nos échantillons présentent un intervalle plus large (5,04-48,92%). C'est le premier rapport qui montre la présence de C18:3 avec un pourcentage pouvant atteindre 48,92%.

Tableau III.02 : Comparaison des pourcentages déterminés des acides gras avec ceux de la littérature.

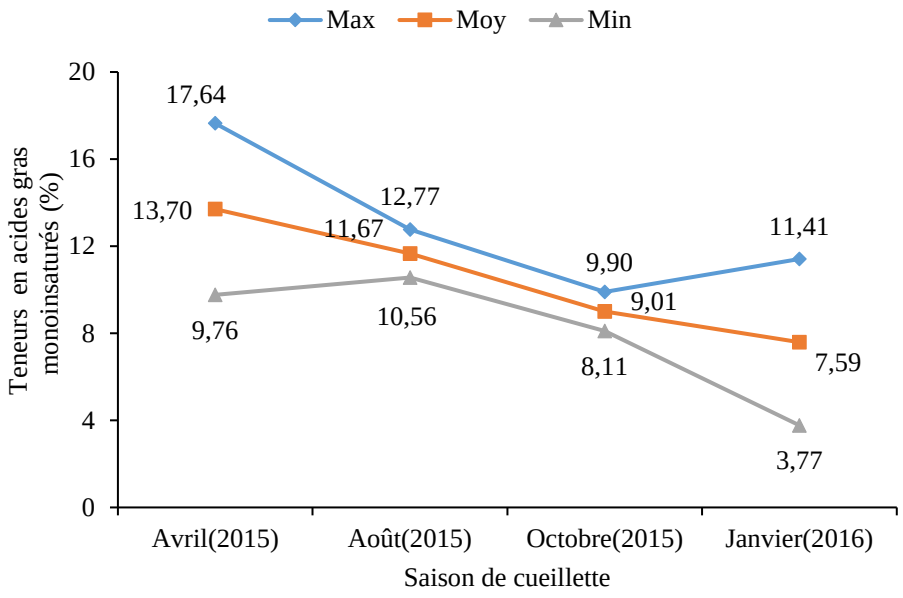
	Acides gras	Algérie (enquête en cours)	Allemagne (littérature)
Ressemblances	**C18:0**	tr-4,17%	1,4-2,5%
	C18:2	6,50-16,99%	10,3-21,2%
	C18:1	3,42-14,9%	8,2-22,7%
Différences	**C14:0**	2,94-16,61%	5,0-7,8%
	C16:0	5,31-15,98%	17,2-22,4%
	C16:1	tr-3,38%	0,8-1,9%
	C18:3	5,04-48,92%	33,7-40,4%
	C15:0	tr-2,91%	Non reporté
	C10:0	tr-13,88%	Non reporté
	C11:0	tr-5,28%	Non reporté
	C12:0	tr-8,09%	Non reporté
	C13:0	tr-3,05%	Non reporté
	C14:1	tr-2,27%	Non reporté
	C15:0	tr-2,91%	Non reporté
	C17:0	tr-2,19%	Non reporté
	C20:0	tr-7,07%	Non reporté
	C20:1	tr-6,56%	Non reporté
	C20:2	tr-4,90%	Non reporté
	C20:3	tr-3,27%	Non reporté
	C20:5	tr-1,55%	Non reporté
	C22:2	tr-3,34%	Non reporté
	C23:0	tr-2,73%	Non reporté

Pour mieux comprendre les variations des teneurs en acides gras individuels et en catégories, nous avons dressé le Tableau III.03 qui englobe les valeurs minimales, maximales et moyennes des pourcentages des acides gras. A partir des valeurs des moyennes, nous avons étudié les variations des pourcentages des différentes catégories des acides gras en fonction de la saison de cueillette. D'après la Figure III.02, nous remarquons que les pourcentages en acides gras varient d'une façon ordonnée en fonction de la saison. Pour les acides saturés et monoinsaturés, les pourcentages en ces acides décroisent du mois d'avril jusqu'au mois de janvier (Figures III.02-a et b), une tendance inversée est remarquée par rapport aux acides gras polyinsaturés (Figure III.02-c), dont le taux des acides polyinsaturés atteint son maximum en hiver. Ce résultat est en accord avec la remarque de BERTRAN qui a montré que les acides insaturés d'une façon générale atteignent leur maximum en hiver et leur minimum en été (l'effet de température et l'enzyme désaturase qui inhibe la formation des doubles liaisons C = C en été).

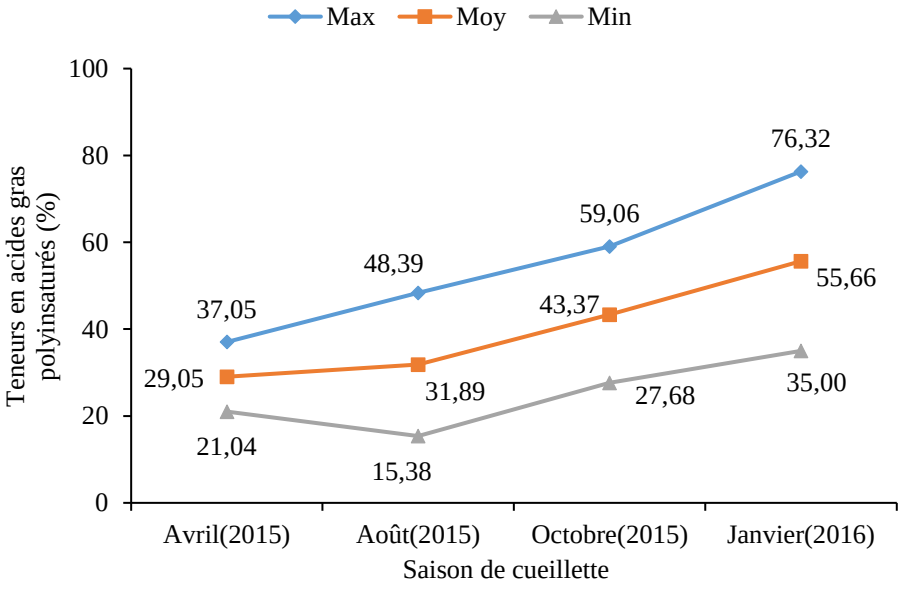


(a) Acides gras saturés

Figure III.02 : Variations saisonnières des pourcentages des différentes catégories des acides gras.



(b) Acides gras monoinsaturés



(c) Acides gras polyinsaturés

Figure III.02 (suite) : Variations saisonnières des pourcentages des différentes catégories des acides gras.

Tableau III.03: Valeurs des pourcentages des acides gras en fonction des mois de cueillette.

Acides gras	Avril (2015)			Aout (2015)			Octobre (2015)			Janvier (2016)		
	Min	**Max**	**Moy**	**Min**	**Max**	**Moy**	**Min**	**Max**	**Moy**	**Min**	**Max**	**Moy**
C10:0	2,74	7,29	5,02	1,71	10,18	5,95	3,85	10,56	7,21	2,49	13,88	8,19
C11:0	2,32	3,34	2,83	1,94	5,29	3,61	1,06	3,24	2,15	0,80	2,86	1,83
C12:0	1,65	4,45	3,05	3,09	8,09	5,59	1,25	4,61	2,93	0,87	2,42	1,65
C13:0	1,39	3,05	2,22	1,83	2,45	2,14	1,62	2,00	1,81	0,94	1,32	1,13
C14:0	8,67	16,61	12,64	3,58	10,11	6,85	2,94	10,07	6,51	4,71	9,12	6,92
C16:0	11,85	15,98	13,92	7,83	11,93	9,88	7,02	10,11	8,57	5,31	9,03	7,17
C16:1w9	1,74	2,74	2,24	3,38	-	3,38	-	-	-	-	-	-
C18:0	2,80	4,17	3,49	1,36	3,13	2,25	1,66	2,92	2,29	0,88	1,79	1,34
C18:1w9	8,02	14,90	11,46	7,18	12,77	9,98	8,11	9,90	9,01	2,42	4,85	3,64
C18:2w6	9,15	13,92	11,54	5,49	11,35	8,42	9,00	12,72	10,86	10,94	16,99	13,97
C18:3w3	7,93	16,73	12,33	5,04	28,29	16,67	14,71	38,25	26,48	20,92	48,92	34,92
C20:0	1,58	2,55	2,07	1,19	3,41	2,30	1,04	1,94	1,49	0,79	7,07	3,93
C20:1w9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,35	6,56	3,96
C20:2	1,39	3,46	2,43	1,55	3,45	2,50	1,15	3,56	2,36	0,74	4,90	2,82
C20:3w6	-	-	-	1,53	2,85	2,19	1,58	2,32	1,95	1,52	3,27	2,40
C22:2	2,57	2,94	2,76	1,77	2,45	2,11	1,24	2,21	1,73	0,88	2,24	1,56
C24:0	-	-	-	1,79	3,89	2,84	1,79	3,28	2,54	-	-	-
AGS (%)	**33,00**	**57,44**	**45,22**	**24,32**	**58,48**	**41,40**	**22,23**	**48,73**	**35,48**	**16,79**	**47,49**	**32,14**
AGMI (%)	**9,76**	**17,64**	**13,70**	**10,56**	**12,77**	**13,36**	**8,11**	**9,90**	**9,01**	**3,77**	**11,41**	**7,59**
AGPI(%)	**21,04**	**37,05**	**29,05**	**15,38**	**48,39**	**31,89**	**27,68**	**59,06**	**43,37**	**35,00**	**76,32**	**55,66**
Total AGI (%)	**30,80**	**54,69**	**42,75**	**25,94**	**61,16**	**45,24**	**35,79**	**68,96**	**52,38**	**38,77**	**87,73**	**63,25**
I/S (%)	**0,93**	**0,95**	**0,95**	**1,07**	**1,05**	**1,09**	**1,61**	**1,42**	**1,48**	**2,31**	**1,85**	**1,97**
Lipides (%)	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**	**2,76**
Cires (%)	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**	**54,08**

III.1.3. Analyse des tocophérols totaux

III.1.3.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Les tocophérols sont des constituants importants dans les lipides des végétaux car ils sont doués par des activités biologiques. L'analyse et l'identification des tocophérols totaux et individuels nous permettent de connaître l'importance et l'évaluation des lipides de nos échantillons. Dans la littérature, il a été toujours relié les tocophérols, l'activité antioxydante et la composition en acides gras insaturés.

Les quantités des tocophérols totaux ont été calculées à l'aide de la courbe d'étalonnage de la vitamine E commerciale (Figure III.03), elles sont exprimées en mg équivalent de la vitamine E par gramme de lipides (mg équi Vit. E/g).

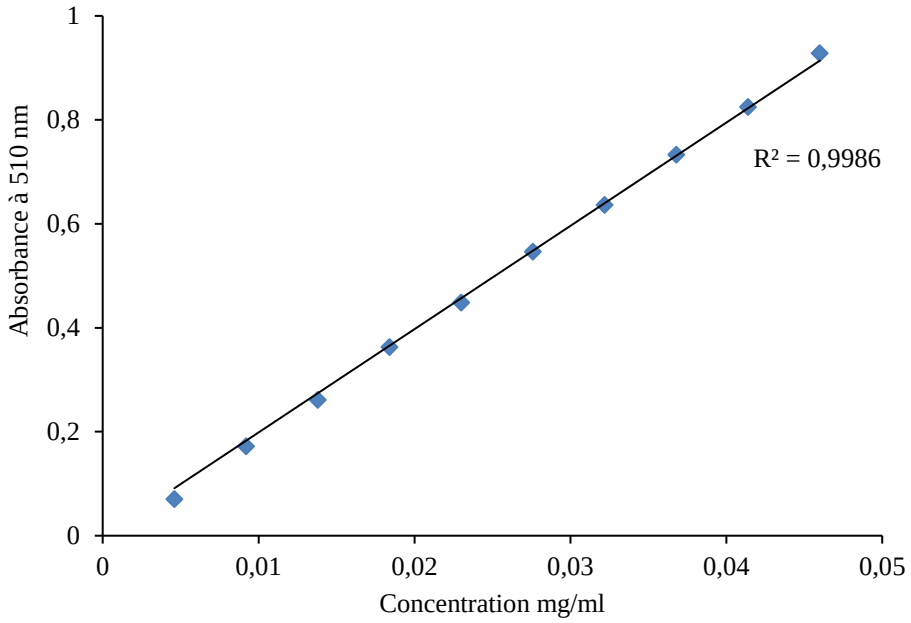


Figure III.03 : Courbe d'étalonnage de la vitamine E (α-Tocophérol).

Les résultats relatifs aux quantités des tocophérols totaux des 19 échantillons récoltés du mois d'avril au mois de janvier sont regroupés dans le tableau III.04. À la lumière de ces résultats, on remarque que la majorité des échantillons ont enregistré des quantités en tocophérols totaux entre 1,75 et 5,36 mg en équivalent vitamine E/g de lipides à l'exception de deux échantillons l'un du mois d'aout et l'autre du mois d'avril qui ont présenté des valeurs plus élevées égales à 9,50 mg/g et 32,97 mg/g respectivement.

Ces différences peuvent êtres dues soit au genre de l'arbre mâle ou femelle qui n'a pas été pris en considération durant les cueillettes, l'origine génétique des deux arbres, la taille des feuilles et enfin des maladies qu'ont subis les deux arbres.

Tableau III.04 : Quantification des tocophérols et stérols totaux dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Échantillons/mois		mg Tocophérol /g lipides	mg Stérol / g lipides
Avril	**1**	32,97 ± 0,57	202,74 ± 7,81
	2	3,30 ± 0,15	245,01 ± 0,47
	3	4,05 ± 0,25	263,85 ± 20,75
	4	4,18 ± 0,15	295,00 ± 6,72
Août	**5**	9,49 ± 0,17	281,84 ± 4,77
	6	4,49 ± 0,04	200,17 ± 6,67
	7	2,09 ± 0,14	200,47 ± 3,92
	8	1,75 ± 0,26	228,83 ± 1,72
	9	4,26 ± 0,16	232,77 ± 13,62
Octobre	**10**	4,37 ± 0,21	188,47 ± 6,07
	11	3,87 ± 0,09	171,13 ± 9,33
	12	1,94 ± 0,07	203,66 ± 2,86
	13	3,03 ± 0,19	177,33 ± 4,13
	14	5,36 ± 0,21	147,70 ± 2,04
Janvier	**15**	4,54 ± 0,32	149,97 ± 3,87
	16	4,61 ± 0,19	175,61 ± 11,88
	17	3,20 ± 0,16	171,84 ± 9,55
	18	3,70 ± 0,10	167,40 ± 7,48
	19	3,15 ± 0,10	143,37 ± 6,83

Si nous comparons les résultats obtenus par ceux de la littérature, on constate que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont riches en tocophérols totaux par rapport aux fruits de *Pistacia atlantica* (0,34–0,51 mg/g) de notre pays **(Guenane, 2017)**, *Pistacia terebinthus* (0,39-0,51 mg/g) de la Turquie **(Matthäus et Özcan, 2006)** et aux graines de *Cucurbita pepo* (0,10-0,22 mg/g) **(Benalia et al, 2015)**. De même, les lipides étudiés sont très riches en tocophérols par rapport aux huiles alimentaires des graines oléagineuses comme l'olive, tournesol, arachide, sésame et le palme **(Naudet, 1992)**. Nos résultats nous permettent de conclure que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* étudiés sont une source prometteuse en tocophérols totaux, ce qui leurs confèrent des activités antioxydantes certaines.

Pour mieux comprendre la variation des tocophérols totaux en fonction de la saison de la cueillette et leurs relations avec les acides gras individuels et catégories, nous avons éliminé les valeurs exceptionnelles des tocophérols totaux (échantillons 1 et 5), on a tracé la courbe reliant la variation des valeurs maximales, minimales et moyennes des quantités en tocophérols exprimées en mg/g en fonction des mois de la cueillette. D'après la figure III.04, il est clair que la quantité des tocophérols totaux atteint une valeur maximale au mois de janvier pour tous les échantillons, résultats déjà obtenu pour les acides gras polyinsaturés (Figure III.02-c) et montre que la quantité en tocophérols totaux varie proportionnellement avec le taux des acides gras polyinsaturés à l'exception des valeurs minimales et moyennes des quantités en tocophérols totaux du mois d'aout.

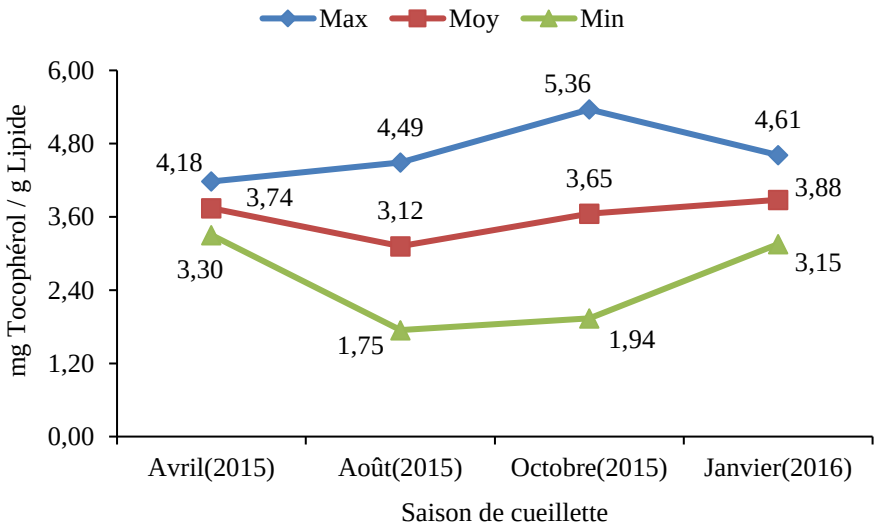


Figure III.04 : Variation des quantités en tocophérols totaux en fonction des mois de la cueillette.

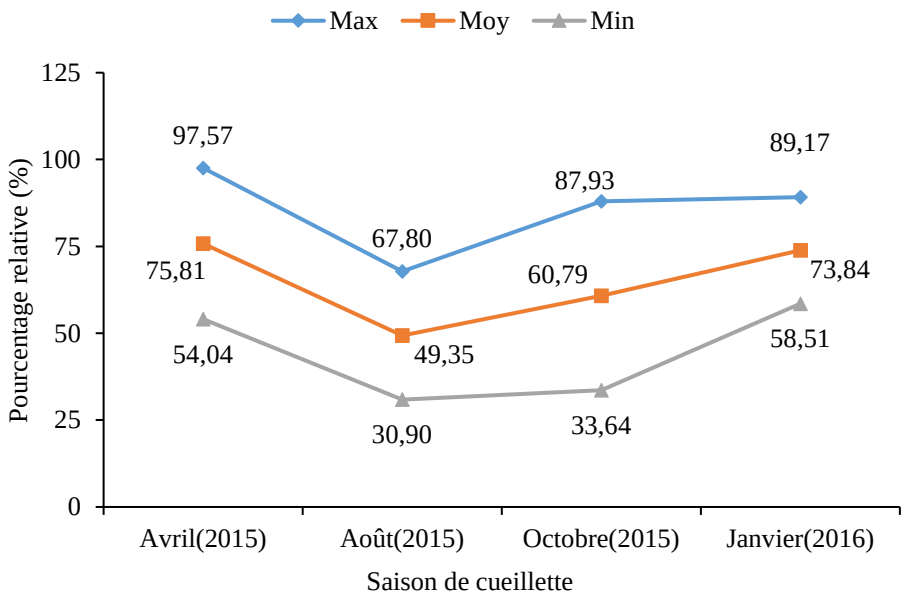
III.1.3.2. Analyse des tocophérols individuels par CLHP

Nous avons analysé les tocophérols individuels contenus dans les lipides de 19 échantillons des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Les différents isomères ont été identifiés par comparaison des temps de rétentions des étalons commercials injectés dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats regroupés dans le Tableau III.05, ils sont exprimés par des pourcentages des aires des pics de chaque isomère.

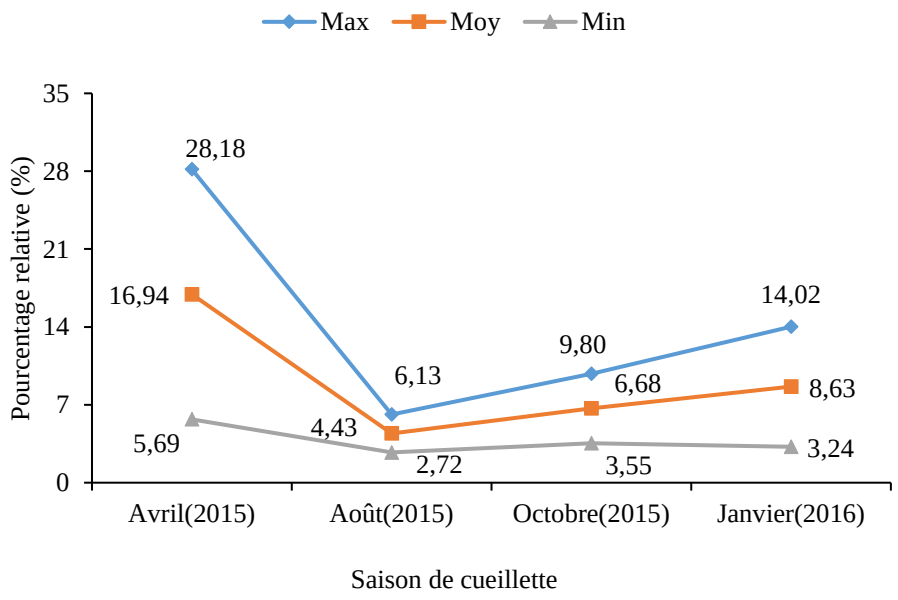
Tableau III.05 : Pourcentages en tocophérols individuels dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Échantillons/mois		α_c	β_c	δ_c
Avril	**1**	97,57	nd	2,43
	2	69,20	5,69	25,11
	3	66,52	13,93	19,55
	4	54,04	28,18	17,79
Août	**5**	65,28	2,72	32,00
	6	67,80	nd	32,20
	7	43,09	6,13	50,78
	8	30,97	3,86	65,17
	9	49,98	nd	50,02
Octobre	**10**	36,02	9,80	54,19
	11	54,86	7,08	38,06
	12	33,64	5,12	61,23
	13	44,96	6,59	48,44
	14	87,93	3,55	8,52
Janvier	**15**	75,99	3,90	20,10
	16	89,17	3,24	7,59
	17	79,06	4,34	16,60
	18	77,97	4,35	17,68
	19	58,51	14,02	27,47

D'après les valeurs des pourcentages relatifs des différents isomères des tocophérols, nous remarquons que le taux des tocophérols individuels varie en fonction de la saison de cueillette (Figure III.05).

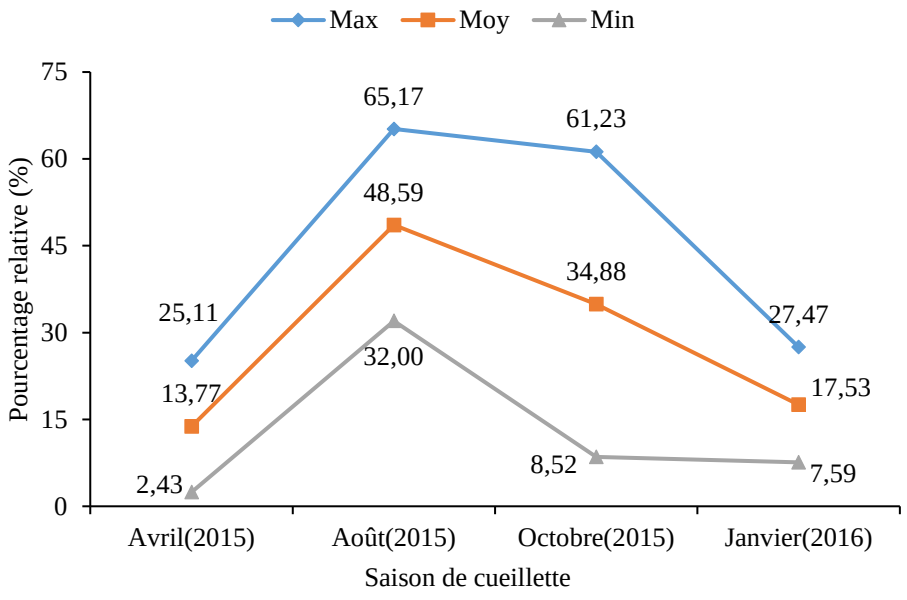


(a) α-tocophérol



(b) β-tocophérol

Figure III.05 : Variation saisonnière des pourcentages relatifs des différents isomères du tocophérol.



(c) δ-tocophérol

Figure III.05 (suite) : Variation saisonnière des pourcentages relatifs des différents isomères du tocophérol.

Pour les isomères α- et β- tocophérols, les pourcentages atteignent leurs maximums au mois d'avril avec des valeurs 97,37 % et 28,18 % respectivement, et leurs minimums 30,90% et 2,72 % respectivement dans le mois d'aout. En revanche, l'isomère δ-tocophérol se comporte autrement car le taux le plus élevé est enregistré au mois d'aout avec une valeur égale 65,17% et un taux plus faible au mois d'avril avec une valeur égale à 2,43%. D'une façon générale, nous constatons que l'α-tocophérols est l'isomère le plus abondant dans tous les échantillons quelle que soit la saison de cueillette ce qui confère aux lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* des propriétés antioxydantes certaines et qui sera vérifié par la suite. Cette constatation est prouvée par la concordance des courbes reliant le taux des tocophérols totaux (figure III.04) et le pourcentage de l'isomère α-tocophérol (Figure III.05-a) en fonction de la saison de la cueillette.

Il faut noter qu'au cours de l'analyse des tocophérols des 19 échantillons des lipides des feuilles par CLHP, que le seul échantillon 1 du mois d'avril a subi une dilution pour avoir un profil chromatographique dont les pics des isomères sont bien séparés.

Cette dilution prouve que cet échantillon est le plus riche en tocophérols totaux et particulièrement en α-tocophérols.

Ces résultats montrent que la quantité en tocophérols totaux dans cet échantillon n'est pas erronée et que l'explication de cette valeur exceptionnelle peut être due au genre de l'arbre, ces différences peuvent êtres dues soit au genre de l'arbre mâle ou femelle qui n'a pas été pris en considération durant les cueillettes, l'origine génétique des deux arbres, la taille des feuilles et enfin des maladies qu'ont subis les deux arbres.

À notre connaissance, c'est pour la première fois que l'analyse des tocophérols des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* a été entreprise. Pour cela, nous avons comparé nos résultats avec ceux qui sont disponibles dans la littérature. Les résultats montrent que les nôtre sont en accords avec ceux des lipides des noyaux du palmier dattier (**Laghouiter, 2018**) où il a trouvé que l'α-tocophérols est l'isomère le plus dominant dans les neufs cultivars des noyaux du palmier dattier provenant de la région de Ain-Salah, par contre les travaux de **Benalia** et **Guenane** ont montré des résultats où les isomères β- et γ-tocophérols sont les plus abondants dans les huiles des graines de *Cucurbita pepo* et les fruits de *Pistacia atlantica*, respectivement **(Benalia et al, 2015 ; Guenane, 2017)**.

III.1.4. Dosage des stérols totaux

Récemment, les industries des cosmétiques, des médicaments et des aliments se sont intéressées aux ressources renouvelables riches en composés liés aux lipides tels que les phytostérols qui sont une partie importante de l'insaponifiable des huiles végétales. L'analyse des stérols fournit des informations riches sur la qualité et l'identité des lipides, et pour la détection des mélanges non reconnus par leur profil d'acides gras **(Trabelsi et al, 2012)**.

Les quantités des stérols totaux ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage du cholestérol commercial (Figure III.06). Les résultats sont mentionnés et exprimés en milligramme équivalent de cholestérol par gramme de lipide (mg Eq Ch/g lipides) (Tableau III.04).

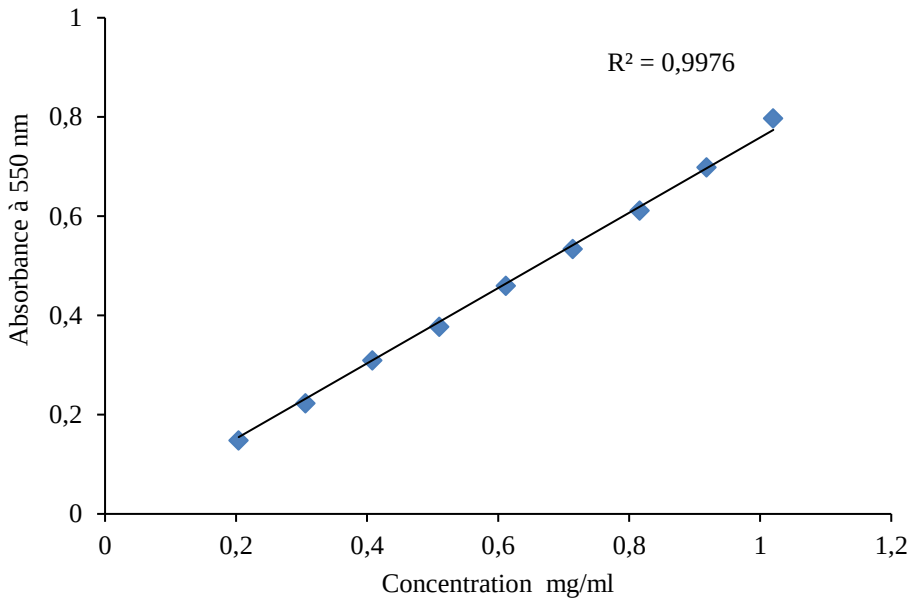


Figure III.06 : Courbe d'étalonnage du cholestérol.

D'après ces résultats, nous constatons que la quantité des stérols totaux varie de 143,37 mg/g pour le mois de janvier et 295,00 mg/g pour le mois d'avril. Si nous comparons les valeurs des quantités obtenues avec celles de la littérature, nous remarquons que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont très riches par rapport aux lipides des graines de *Cucurbita pepo* (2,13-11,60 mg/g) **(Benalia et al, 2015)**, et les noyaux du palmier dattier (4,70-8,44 mg/g) **(Laghouiter, 2018)**, l'huile d'olive (~1,50 mg/g) (**Salvador et al, 2001)** et l'huile de palme (1,05 mg/g). Toutefois, ces résultats montrent que les lipides étudiés sont une source importante en stérols composés mineurs dans les constituants des lipides. Ces composés mineurs sont très importants pour les propriétés fonctionnelles des huiles (résistance à l'oxydation, goût, arôme et couleur), mais pourraient également avoir de nombreux avantages pour la santé. Les stérols des huiles végétales abaissent les taux de cholestérol total et de cholestérol LDL chez les humains **(Tapiero et al, 2003)**. Ces résultats peuvent conduire à l'utilisation des lipides étudiés en tant que nouvel agent thérapeutique pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

Les résultats montrent l'existence d'une variation de la quantité des stérols totaux des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* en fonction de la saison de la cueillette. Pour montrer cette variation, nous avons tracé des courbes des variations des quantités minimales, maximales et moyennes en stérols totaux en fonction du mois de la cueillette (Figure III.07).

Ces tracés ont les mêmes allures pour les valeurs minimales, maximales et moyennes des quantités en stérols totaux et montrent que la quantité en stérols totaux diminue du printemps à l'hiver.

Une remarque importante à tirer est que la variation de la quantité en stérols totaux et la variation des teneurs en acides gras saturés et monoinsaturés en fonction de la saison de la cueillette varient dans le même sens ; par contre, elle varie en sens opposé avec la teneur en tocophérols totaux et les pourcentages en acides gras polyinsaturés. De bonnes corrélations positives des valeurs moyennes des quantités en stérols totaux et en acides gras saturés (C14:0, C16:0 et C18:0) et monoinsarurés (C18:1) ont été trouvées, les valeurs des coefficients de corrélations sont égales à : 0,63 ; 0,85 ; 0,78 et 0 ,84 respectivement.

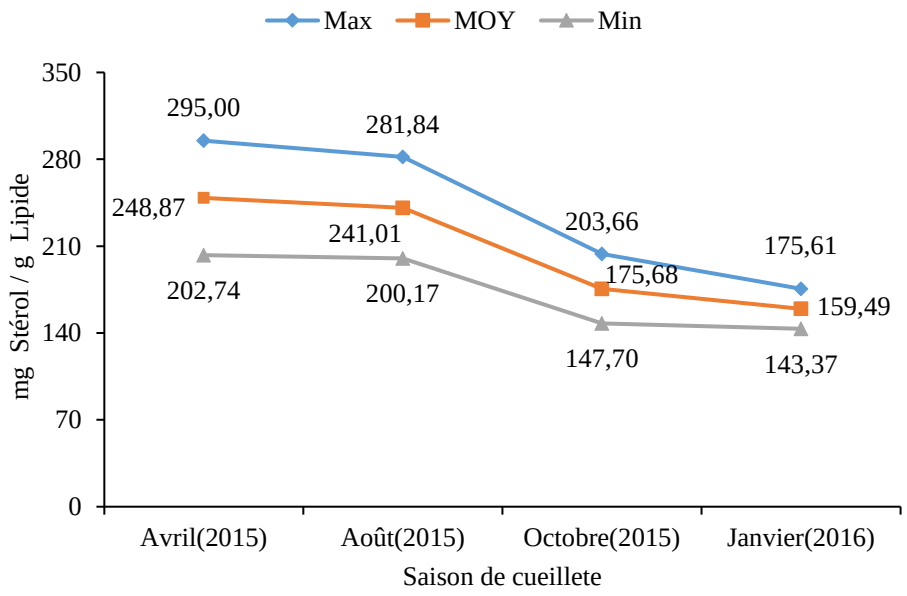


Figure III.07 : Variation saisonnière des quantités en stérols totaux en fonction des mois de la cueillette.

III.1.5. Évaluation de l'activité antioxydante

Pour estimer la capacité antioxydante, nous avons réalisé deux tests à savoir : le test du DPPH et le test du *β*-carotène. A notre connaissance, aucun travail n'a été fait pour évaluer l'activité antioxydante des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* et notamment pour un nombre important d'échantillons.

La capacité antioxydante des lipides étudiés a été exprimée par un coefficient IC_{50}, qui est défini comme la concentration en mg/mL de l'extrait pour inhiber 50% du radical. Les valeurs d'IC_{50} sont déterminées à partir des courbes du pouvoir d'inhibition PI % en fonction de la concentration de l'extrait (voir Figure III.08, Figure III.09 et annexe).

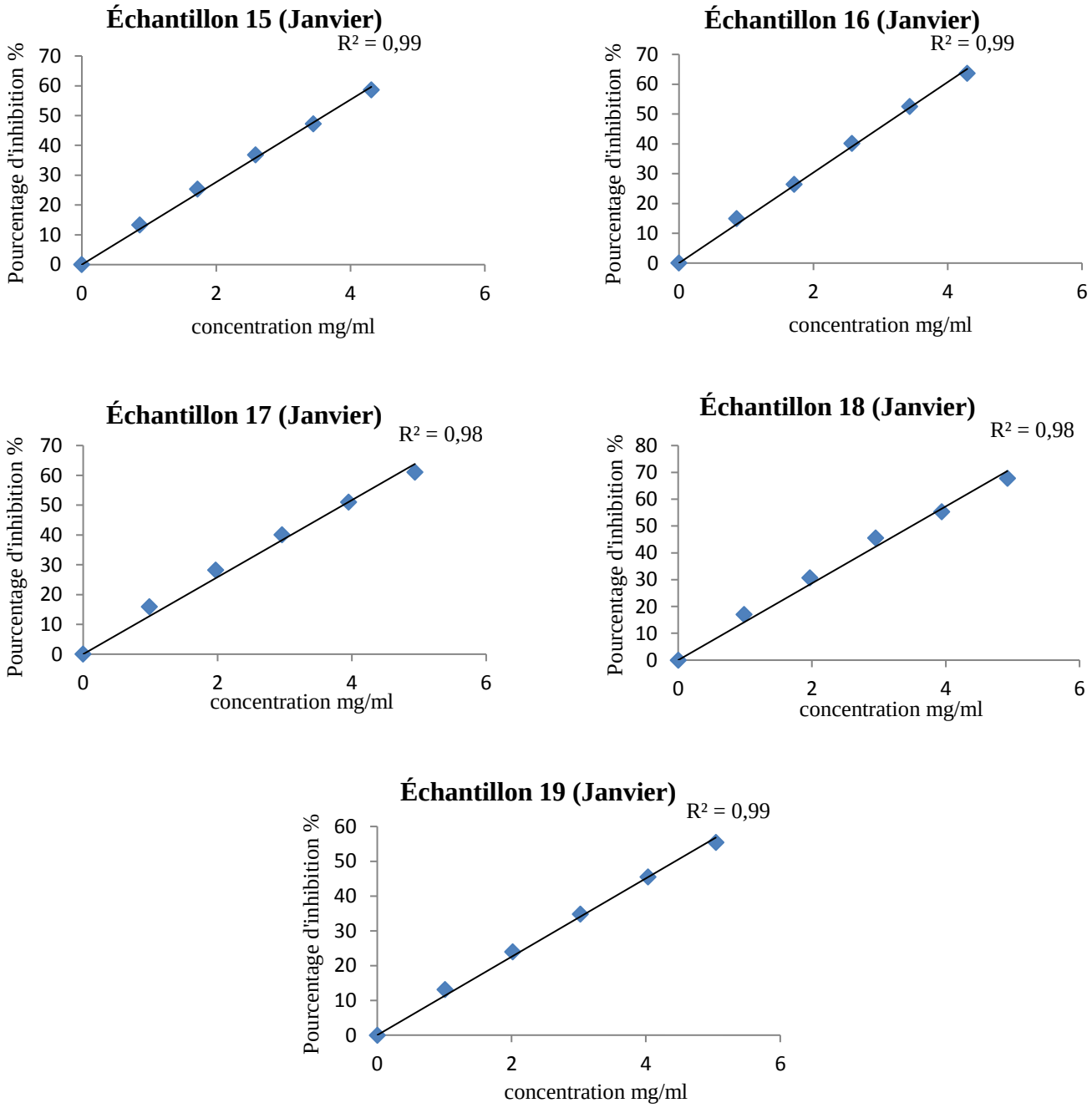
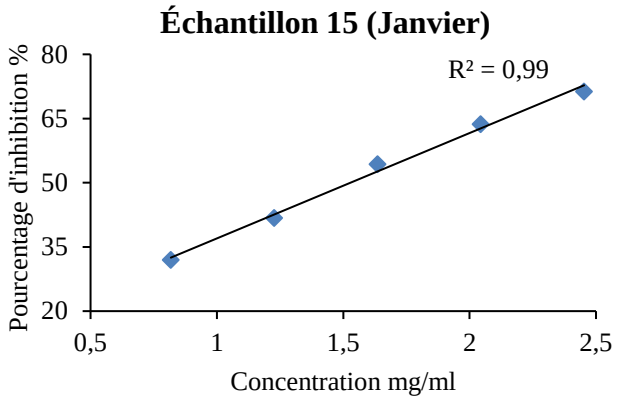
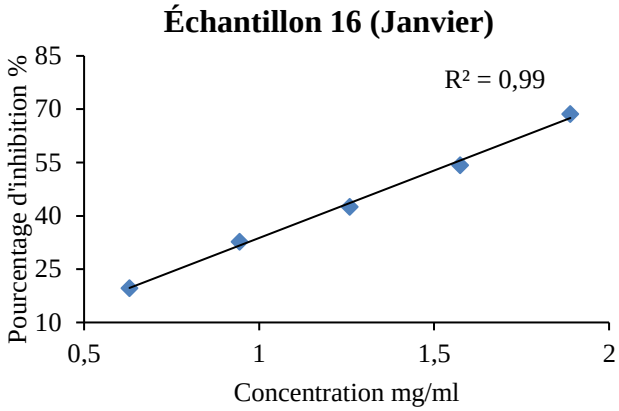
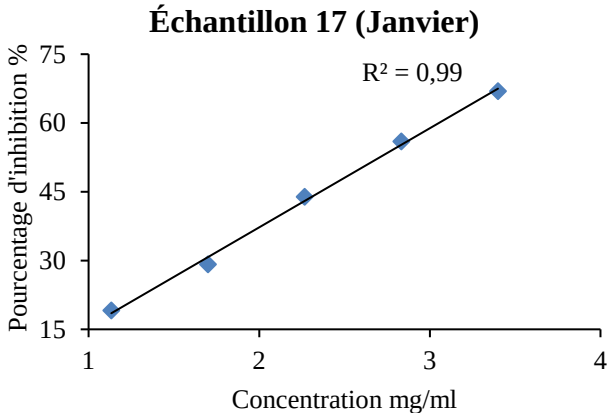
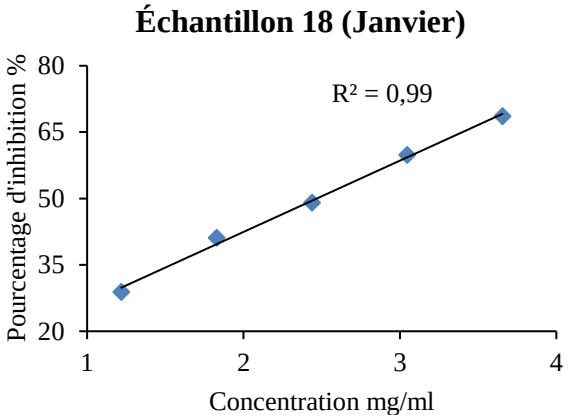


Figure III.08 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques pour le test du DPPH.









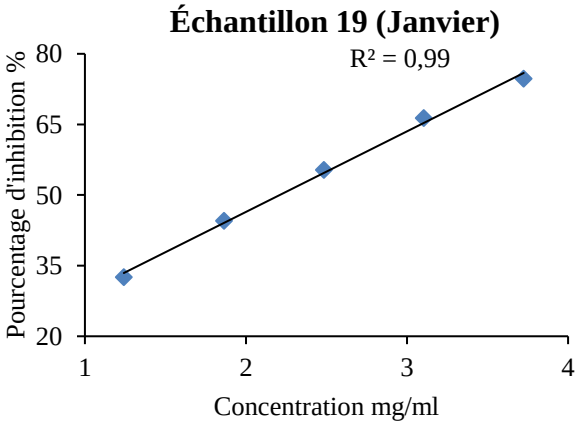


Figure III.09 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques pour le test du β-carotène.

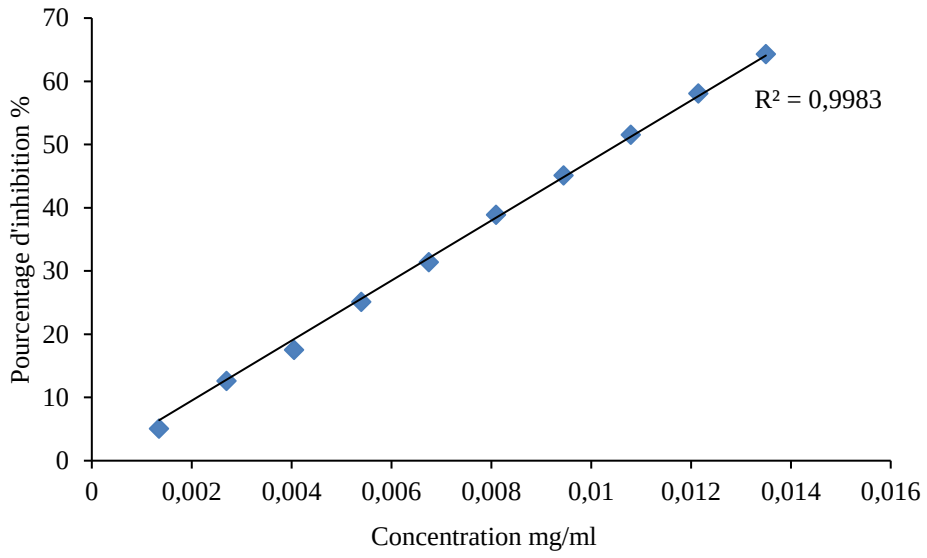
Rappelons que plus la valeur d'IC_{50} est petite plus l'activité antioxydante est grande. Les valeurs d'IC_{50} pour les deux tests sont consignées dans le Tableau III.06.

Tableau III.06 : Valeurs d'IC_{50} des différents extraits lipidiques pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène**)**.

Échantillons/mois		IC_{50} (mg/mL) DPPH	IC_{50} (mg/mL) *β*-carotène
Avril	**1**	0,37 ± 0,001	0,16 ± 0,003
	2	4,38 ± 0,23	2,63 ± 0,08
	3	3,16 ± 0,07	3,37 ± 0,22
	4	3,88 ± 0,00	2,97 ± 0,10
Août	**5**	3,72 ± 0,05	1,23 ± 0,04
	6	4,91 ± 0,26	1,11 ± 0,06
	7	6,11 ± 0,08	2,83 ± 0,01
	8	6,85 ± 0,12	2,85 ± 0,02
	9	2,31 ± 0,01	2,08 ± 0,01
Octobre	**10**	2,61 ± 0,05	2,25 ± 0,11
	11	3,33 ± 0,13	2,67 ± 0,06
	12	7,28 ± 0,36	3,22 ± 0,51
	13	4,37 ± 0,17	2,02 ± 0,07
	14	2,44 ± 0,07	1,63 ± 0,03
Janvier	**15**	3,62 ± 0,18	1,53 ± 0,04
	16	3,30 ± 0,11	1,43 ± 0,04
	17	3,87 ± 0,23	2,59 ± 0,07
	18	3,49 ± 0,21	2,47 ± 0,04
	19	4,44 ± 0,02	2,21 ± 0,02
Vitamine C		0,0057 ± 0.0011	
Vitamine E		0,0105 ± 0.0064	0,0021 ± 0,0001

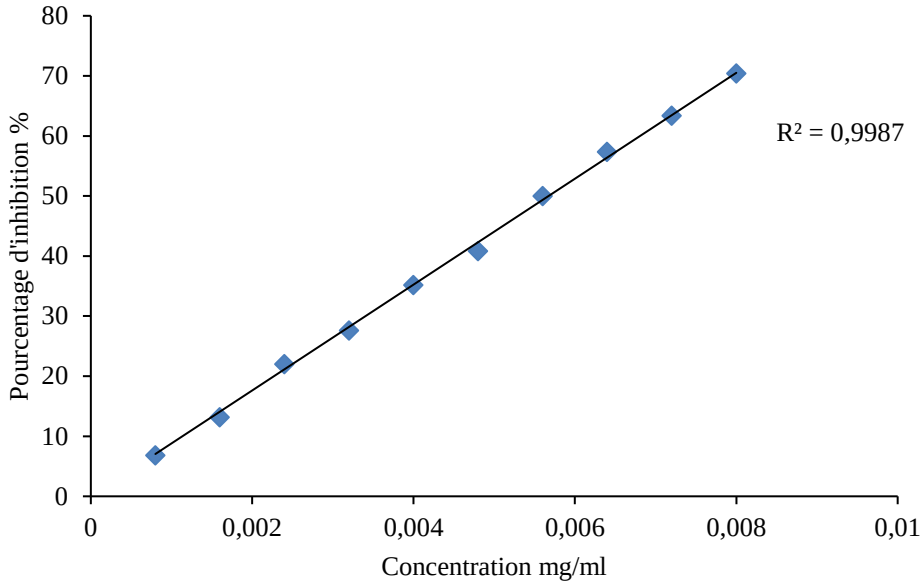
Pour les deux tests, nous remarquons que l'activité antioxydante varie en fonction de la saison de cueillette. Dans le test DPPH, les valeurs d'IC_{50} varient de 0,37 mg/mL pour le mois d'avril à 7,28 mg/mL en octobre, en ce qui concerne le test du *β*-carotène, la plus faible et la plus grande valeur d'IC_{50} sont enregistrées au mois d'avril avec des valeurs qui s'échelonnent entre 0,16 mg/mL et 3,37 mg/mL.

Afin de connaitre la capacité antioxydante de nos extraits par rapport aux antioxydants de synthèse utilisés en industrie, nous avons comparé les valeurs d'IC_{50} de nos extraits par rapport à la vitamine E et la vitamine C (Figure III.10). L'extrait lipidique le plus actif est 65 fois moins efficace pour neutraliser le radical DPPH que la vitamine C, d'autre part la vitamine E est 35 et 76 fois plus puissante que l'extrait le plus actif pour les tests DPPH et *β*-carotène respectivement.

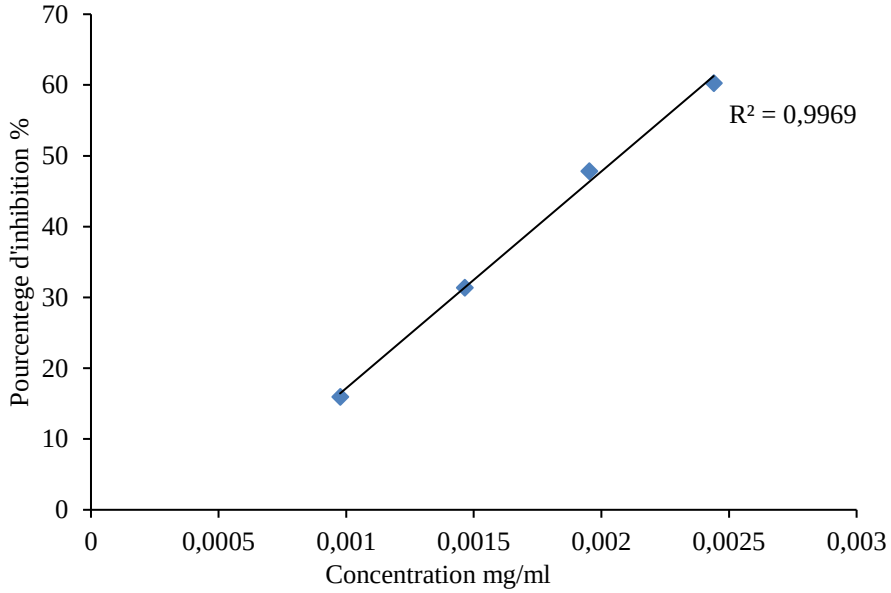


(a) Vitamine E dans le test du DPPH

Figure III.10 : Activité antioxydante des standards pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène**)**.



(b) Vitamine C dans le test du DPPH

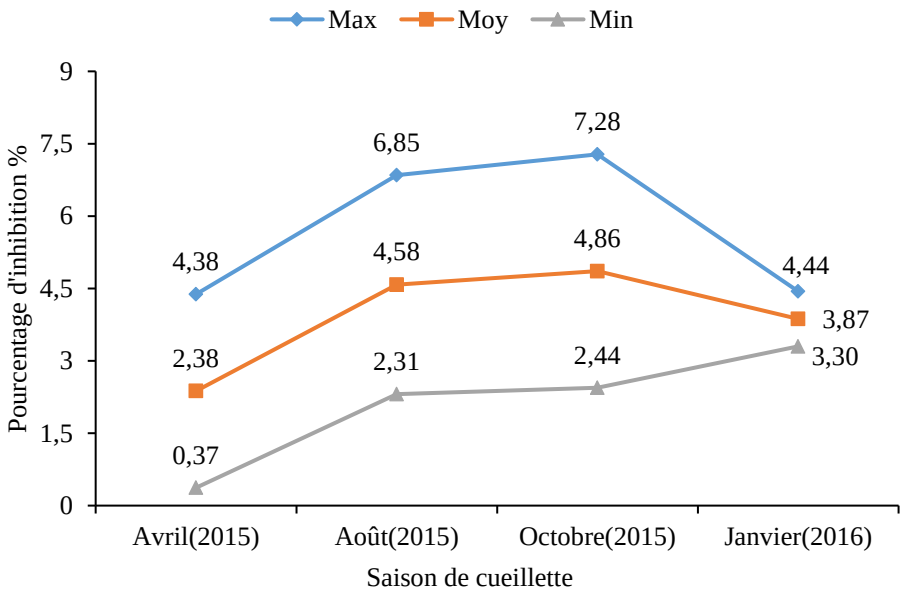


(c) Vitamine E dans le test β-carotène

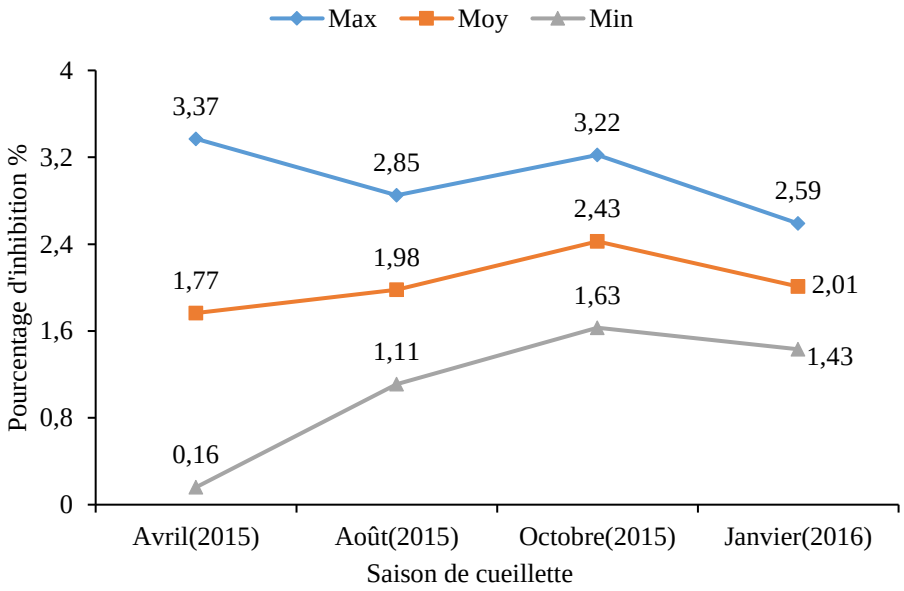
Figure III.10 (suite) : Activité antioxydante des standards pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène**)**.

Un coefficient de corrélation de l'ordre 0,56 a été trouvé entre toutes les valeurs d'IC_{50} pour les deux tests, ce qui nous permet de dire que 56% des valeurs d'IC_{50} des 19 échantillons varient dans le même sens.

Pour confirmer ce résultat, nous avons tracé les courbes des variations des valeurs minimales, maximales et moyennes des IC_{50} pour les deux tests en fonction des mois de la cueillette (Figure III.11). D'après les courbes, nous remarquons que les valeurs moyennes d'IC_{50} varient dans le même sens pour les deux tests et cela est confirmé par un coefficient de corrélation égale à 0,81. Par contre, toutes les valeurs d'IC_{50} varient dans le même sens seulement entre les deux mois d'août et octobre.



(a) Test DPPH



(b) Test β-carotène

Figure III.11 : Courbes des variations des IC_{50} pour deux tests d'activités (DPPH & *β*-carotène**)**.

Comme les tocophérols sont connus par leur activité antioxydante, nous avons essayé de chercher des corrélations entre les quantités des tocophérols totaux et les pourcentages des tocophérols individuels et l'activité antioxydante déterminées par les deux tests. Des corrélations négatives ont été trouvées entre les tocophérols totaux et les valeurs d'IC_{50}, les coefficients de corrélations trouvés sont : -0,70 et -0,63 pour le β-carotène et le DPPH respectivement. Pour les tocophérols individuels, les corrélations existantes sont celles avec les valeurs d'IC_{50} et l'α-tocophérol seulement, les coefficients de corrélations calculées sont : -0,60 et -0,65 pour le β-carotène et le DPPH respectivement. Les corrélations sont améliorées pour le test DPPH en utilisant les valeurs moyennes des quantités en tocophérols totaux, des pourcentages en α-tocophérol et les valeurs d'IC_{50}, les coefficients de corrélations ainsi trouvées sont : -0,93 et -0,76 pour les tocophérols totaux et l'α-tocophérol respectivement. Ces résultats montrent que l'isomère α- tocophérol est responsable de l'activité antioxydante des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Cette confirmation est appuyée par les résultats précédents consignés dans les tableaux III.04, III.05 et III.06 relatifs aux quantités des tocophérols totaux, les pourcentages des tocophérols individuels et les valeurs d'IC_{50} où nous avons signalé une anomalie qui nous apparue sur la valeur de la quantité en tocophérols totaux de l'échantillon 1 du mois d'avril (32,97 mg/g) qui était dix fois plus grande que toutes les autres valeurs (18 échantillons).

Cette anomalie est levée après la détermination du pourcentage en α- tocophérol de l'échantillon concerné (97,57% valeur trouvée après dilution) et le calcul des valeurs d'IC_{50} (0,37 mg/mL et 0,16 mg/mL pour les tests DPPH et le β-carotène) qui montrent que l'activité antioxydante déterminée pour cet échantillon est dix fois plus puissante que les autres.

A notre connaissance, aucune étude antérieure n'a été entreprise sur l'évaluation de l'activité antioxydante des lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Pour cela, nous avons essayé de faire une comparaison de nos résultats avec d'autres lipides végétaux. Les données disponibles relatives aux tests DPPH sont celles des travaux de Benalia sur les lipides des graines de *Cucurbita pepo* **(Benalia et al, 2015)**, Guenane sur les lipides des fruits de *Pistacia atlantica* **(Guenane, 2017)** et Laghouiter sur les lipides des noyaux de palmier dattier (**Laghouiter, 2018**). Si nous comparons nos résultats avec ces travaux, nous constatons que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont plus actifs et puissants que les lipides des graines de *Cucurbita pepo* (17,9-38,7 mg/mL), les lipides des fruits de *Pistacia atlantica* (18,36-36,28 mg/mL) et les lipides des noyaux de palmier dattier (46,81-77,58 mg/mL).

En ce qui concerne le test du β-carotène, aucun travail n'a été publié sur les lipides. Nous avons choisi de faire une comparaison avec des extraits d'huiles essentielles. Beaucoup de travaux ont été publiés sur l'activité antioxydante des huiles essentielles par ce test. Les travaux les plus récents réalisés dans notre laboratoire sont ceux de **Benabed** et **Boukhalkhal** sur les huiles essentielles de quelques espèces de la famille des *Lamiacea* et sur *l'Artemisia campestris* respectivement. Après la comparaison de nos valeurs d'IC_{50} avec celles des travaux cités, nous pouvons dire que les lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont moins actifs que l'espèce *Thymus vulgaris* (0,788- 1,511 mg/mL) et plus puissants que l'espèce *Saccocalyx satureoides* (2,194- 3,094 mg/mL), par contre les huiles essentielles d'*Artemisia campestris* sont plus actives (0,09-0,79 mg/mL) comparativement aux lipides des feuilles de *Pistacia lentiscus*.

III.1.6. Analyse statistique des données expérimentales

III.1.6.1. Classification ascendante hiérarchique (CAH)

Pour une meilleure compréhension des similitudes et/ou des différences entre les échantillons étudiés en termes de composition en acides gras AG, une analyse a été réalisée à l'aide de la méthode de classification ascendante hiérarchique (CAH). Le résultat de la CAH schématisé dans le dendrogramme de la figure III.12 a montré l'existence de quatre agglomérats « clusters » clairement distingués (agglomérat 1: 11,15 et 19), (agglomérat 2: 1,3,4 et 5), (agglomérat 3: 7,13,16,17 et 18) et (agglomérat 4: 2,6,8,9,10,12 et 14). Ce qui indique une dissimilarité existante entre les échantillons étudiés (confirme l'existence d'une certaine variabilité de la composition chimique). La décomposition de la variance pour la classification optimale était de 35,03% au sein des classes et de 64,97% inter- classes. Les différents agglomérats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de distinction claire entre les différentes saisons pour la classification obtenue, ce qui confirment l'hypothèse de variabilité et la biodiversité des compositions pour les AG dans cette partie de la plante.

L'agglomérat 1 était caractérisé par la valeur moyenne la plus élevée de C18:3 (40,37 ± 7,71%), puis cette valeur moyenne a diminué dans l'ordre suivant: agglomérat-2> agglomérat-4> agglomérat-3, avec des valeurs moyennes respectives de 24,96 ± 3,15 %, 17,46 ± 1,70% et 8,48 ± 2,80%.

Une tendance similaire a été observée pour C18:3, mais dans ce cas, les différences des valeurs moyennes en pourcentage entre les classes été assez étroites: 14,26 ± 2,99%, 11,73 ± 0,77%, 9,66 ± 2,38% et 8,41 ± 1,95%, pour les agglomérats 1, 2, 4 et 3, respectivement.

Alternativement, les deux paires d'agglomérat 1 & 2 et 3 & 4 présentent des valeurs moyennes similaires de C18:1. Pour l'agglomérat 1 et 2, les valeurs étés respectivement de 6,14 ± 3,31% et 6,86 ± 4,03%. La valeur moyenne en pourcentage de C18:1 est un peu plus élevée pour les agglomérats 3 et 4: 10,03 ± 1,48% et 10,03 ± 2,77%, respectivement. Pour C16:0 et C14:0, les trois clusters 1,2 et 4 présentent des pourcentages similaires (C16:0 = 8,22-9,48%, C14:0 = 6,68-7,21%) qui étés un peu plus bas que ceux enregistrés pour l'agglomérat 3 (C16 :0 = 13,33 ± 1,93%, C14 :0 = 10,51 ± 4,15%). Enfin, l'agglomérat 3 se distingue par son pourcentage plus élevé de C10:0 (9,32 ± 4,05%) par rapport au reste des agglomérats (3,39 ± 1,50%, 4,88 ± 4,30% et 6,86 ± 3,47% pour les agglomérats 1,2 & 4, respectivement).

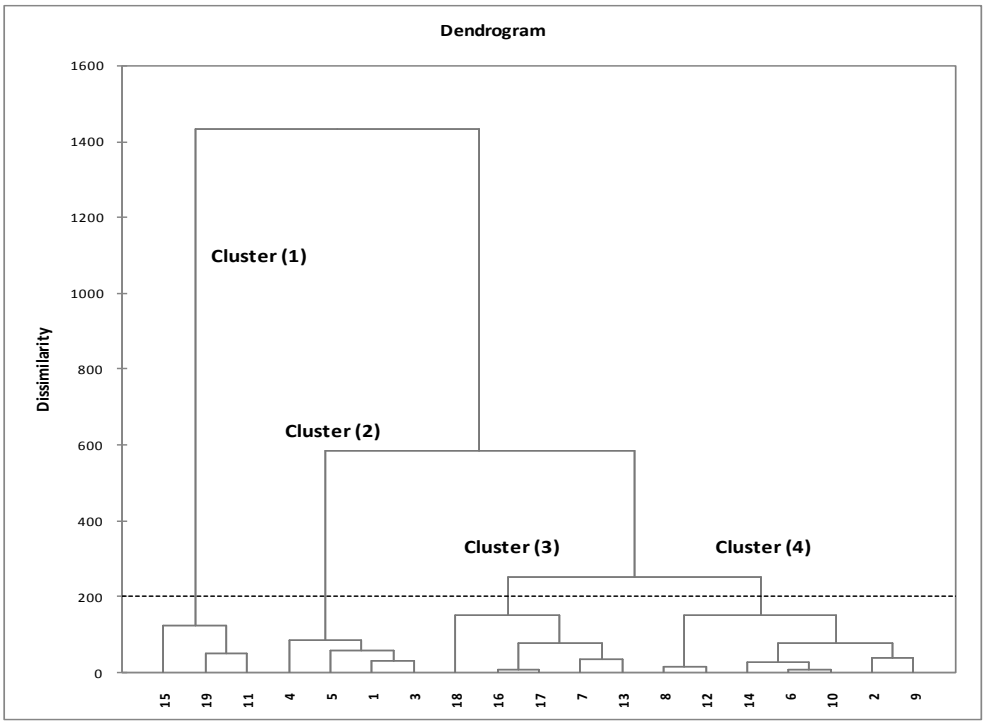


Figure III.12 : Dendogram de l'analyse de classification ascendante hiérarchique (CAH) obtenue en utilisant la méthode « ou technique » de Ward, avec une mesure de la distance de type euclidienne

III.1.6.2. Analyse en composantes principales (ACP)

Afin de déterminer en plus de détails les similitudes ou les différences existantes entre les deux agglomérats et les échantillons, la méthode d'analyse des composantes principales ACP a été réalisée pour essayer d'identifier les constituants chimiques les plus influents qui peuvent distinguer ou regrouper les échantillons étudiés. En plus, les relations qui peuvent relier les différentes activités à ceux des différents acides gras ont été aussi prises en considération.

L'occurrence des deux agglomérats principaux déjà établie précédemment avec la CAH a été également confirmée par les résultats de l'ACP (Figure III.13). Les principaux facteurs (composantes principales) pour les axes principaux F1 et F2 (représentant 48,81% de l'information totale) sont indiqués dans la figure III.14. L'axe F1 qui représente 28,62% de l'information totale est fortement et positivement corrélé avec C16:0 (86,6%), C18:1 (77,6%). Ce même axe est corrélé négativement avec C20:1 (-68,0%), C18:3 (-66,5%) et C18:2 (-50,9%). L'axe F2 qui représente 20,19% de l'information totale est fortement corrélé positivement avec C12:0 (80,5%) et C10:0 (62,6%). Ce même axe est moyennement et négativement corrélé avec C18:2 (-58,6%). A l'opposé de l'axe F1, l'axe F2 permet de bien séparer l'activité antioxydante du test DPPH de celui du test de β-carotène.

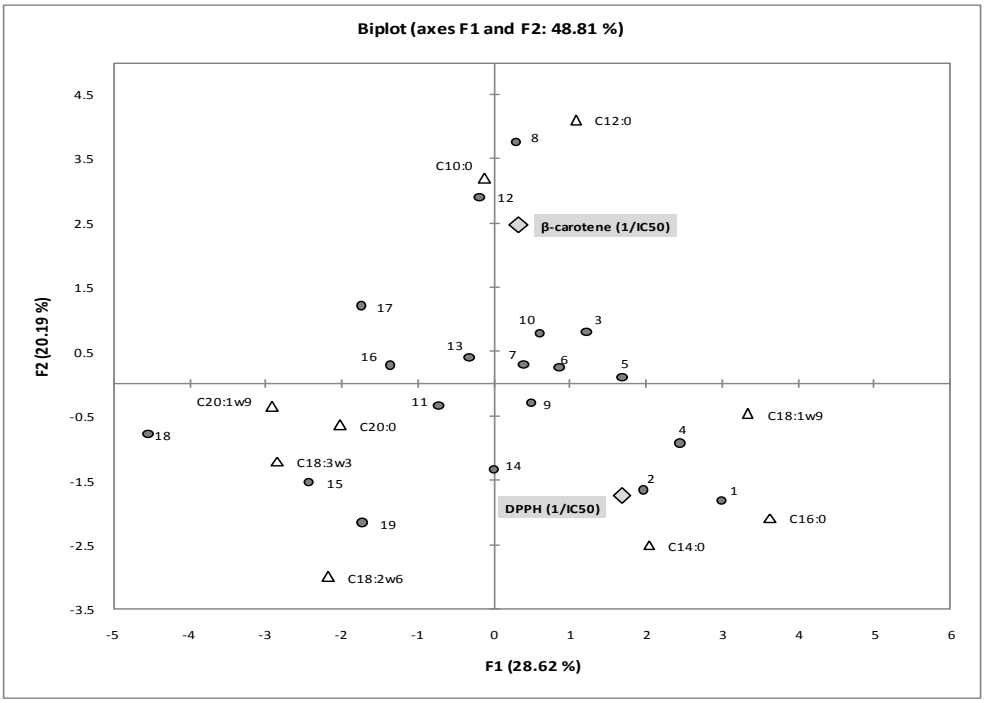


Figure III.13 : Représentation bidimensionnelle des premiers facteurs (composantes principales) de l'analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en acides gras et leurs activités antioxydantes.

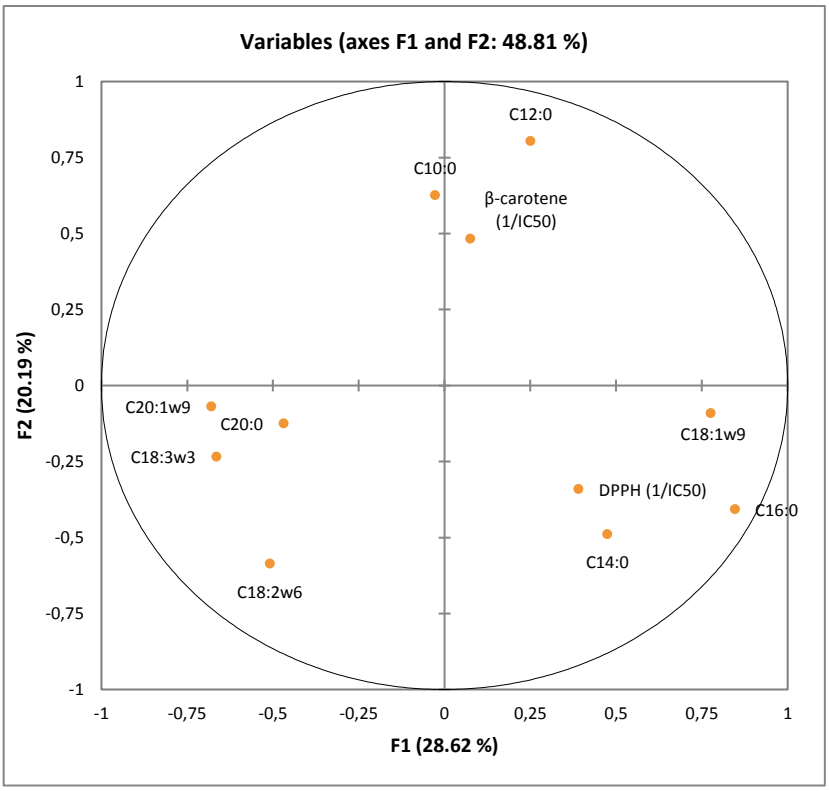


Figure III.14 : Cercle de corrélation pour les deux premiers facteurs déterminés par analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en acides gras et leurs activités antioxydantes.

Le pouvoir antiradicalaire ($1/IC_{50}$) est fortement corrélé à une teneur plus élevée en C16:0, C14:0, C18:2 et C18:3. Par contre, un pouvoir inhibiteur plus important mesuré par le test *β*-carotène est fortement corrélé à une composition plus importante en C10:0 et C12:0. Pour le cas particulier de l'acide gras monosaturé C18:1, il semble qu'une teneur plus élevée en ce composé corrélé avec une forte activité pour les deux tests DPPH et β-carotène.

Dans le cas où l'on s'intéresse à la relation entre les différents isoforms des tocophérols avec ceux des activités antioxydantes, une autre analyse a été menée (Figure III.15). Les principaux facteurs (composantes principales) pour les deux premiers axes F1 et F2 (représentant 81,65% de l'information totale) sont indiqués dans la figure III.16. L'axe F1 qui représente 57,48% de l'information totale est fortement et positivement corrélé avec *β*-carotène (83,0%) et δ-Toc (80,3%). Ce même axe est corrélé fortement et négativement avec α-Toc (-91,7%) et DPPH ($1/IC_{50}$). L'axe F2 qui représente 24,18% de l'information totale est fortement corrélé positivement avec β-Toc (82,3%), Ce même axe est moyennement et négativement corrélé avec Toc (-57,1%). L'activité au terme du test β-carotène est corrélée avec une teneur plus élevée en β-Toc et δ-Toc. A l'opposé, le pouvoir inhibiteur des radicaux libres DPPH est favorisé par une teneur plus importante en α-Toc.

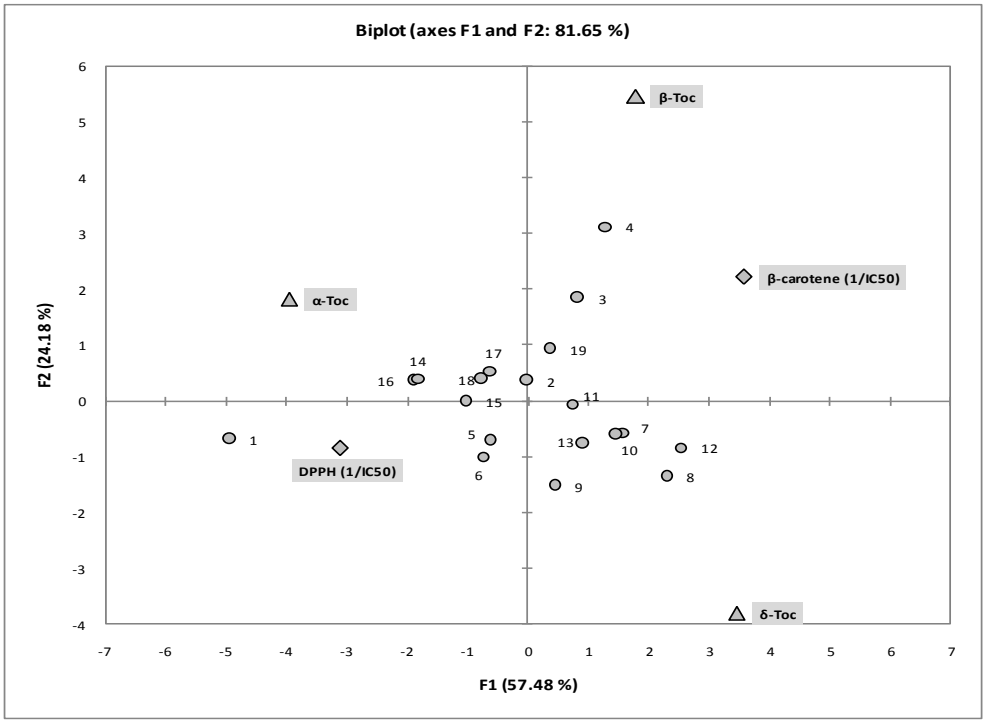


Figure III.15 : Représentation bidimensionnelle des deux premiers facteurs (composantes principales) de l'analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en tocophérols et leurs activités antioxydantes.

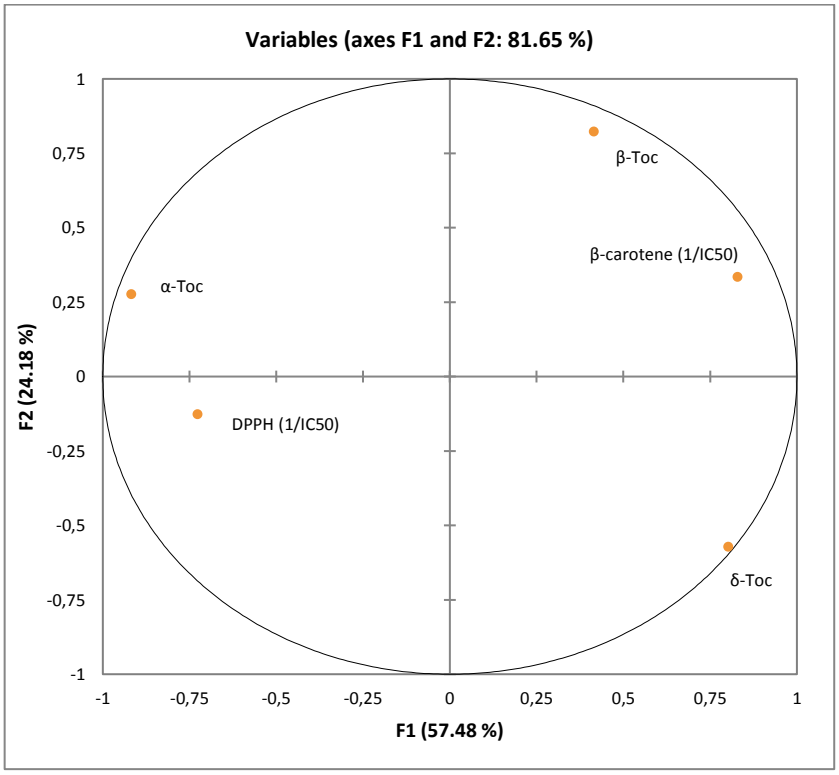


Figure III.16 : Cercle de corrélation pour les deux premiers facteurs déterminés par analyse en composantes principales ACP. Relations entre individus et leurs compositions en tocophérols et leurs activités antioxydantes.

III.1.6.3. Étude de corrélations

Afin de déterminer les éventuelles corrélations existantes entre les variables suivantes: activités antioxydantes (deux tests), tocophérols totaux, stérols totaux, compositions de C18:1,2,3 et isoformes de tocophérol (α, β, δ-Toc), une corrélation matricielle basée sur la détermination du coefficient de Pearson (P <0,05) a été déterminée à l'aide du logiciel XLSTAT. Les résultats ont été rassemblés dans le tableau III.07. Aucune corrélation significative n'a été obtenue entre les tests DPPH et β-carotène. Une corrélation négative et assez moyenne (significative) a été trouvée entre l'α-tocophérol et les tests DPPH (-51,7%) et β-carotène (-51,6%). Le β-tocophérol présente une corrélation moyenne mais positive avec le β-carotène (52,3%). Même cas observé pour le δ-tocophérol avec dosage DPPH (54,7%). De plus, les deux isoformes α-tocophérol et δ-tocophérol été négativement et fortement corrélées (-94,2%). De plus, la teneur en tocophérols totaux a été corrélée à un degré moyen mais négatif avec le β-carotène (-60,1%) et le DPPH (-54,7%). Pour les stérols totaux, la teneur présentent une bonne corrélation négative avec C18:3 (-73,8%) et une corrélation négative moyenne avec C18:2 (-59,5%). Inversement, la teneur en stérols totaux a également montré une corrélation moyenne mais positive avec C18: 1 (57,3%). Enfin, C18:3 et C18:2 été mutuellement corrélés avec un bon coefficient (68,7%).

Tableau III.07 : Matrice de corrélations (coefficient de Pearson à P <0,05) entre l'activité antioxydante (tests DPPH et β-carotène), C18:, isomères de tocopherols, TTC and TSC.

	DPPH (IC_{50})	β-carontène (AA_{50})	α-Toc (%)	β-Toc (%)	δ-Toc (%)	TTC (mg /g lipides)	TSC (mg/g lipides)	C18:1w9 (%)	C18:2w6 (%)	C18:3w3 (%)
DPPH (IC_{50})	**1**	0,372	**-0,517**	-0,038	**0,547**	-0,201	0,094	0,041	-0,145	-0,063
β-carontène (AA_{50})		**1**	**-0,516**	**0,523**	0,352	-0,368	0,282	0,081	0,038	-0,107
α-Toc (%)			**1**	-0,263	**-0,942**	**0,518**	-0,242	-0,274	0,211	0,057
β-Toc (%)				**1**	-0,075	-0,257	0,357	-0,020	0,129	-0,120
δ-Toc (%)					**1**	-0,446	0,127	0,290	-0,263	-0,017
TTC (mg /g lipides)						**1**	0,067	0,155	-0,179	-0,322
TSC (mg/g lipides)							**1**	**0,573**	**-0,595**	**-0,738**
C18:1w9 (%)								**1**	-0,296	**-0,457**
C18:2w6 (%)									**1**	**0,687**
C18:3w3 (%)										**1**

TTC: Teneur en tocopherols totaux ; TSC: Teneur en stérols totaux ; Toc: tocopherol.

Valeurs en gras sont différentes de 0 avec un niveau de signification de α=0.05.

III.2. QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les valeurs des rendements en extraits bruts de 19 échantillons des feuilles de *Pistacia lentiscus* récoltées dans des mois différents sont regroupées dans le tableau III.08. D'après ces valeurs, on remarque que les rendements varient en fonction de la saison de cueillette, elles s'échelonnent entre 2,70% pour le mois d'octobre et 5,80% pour le mois d'aout.

Tableau III.08 : Teneur en extraits bruts et en composés phénoliques.

Échantillons/mois		Rendement (%)	Polyphénols totaux g/100g	Flavonoïdes g/100g	Tanins g/100g
Avril	**1**	3,71	1,91 ± 0,16	0,23 ± 0,005	1,09 ± 0,002
	2	4,59	1,81 ± 0,17	0,14 ± 0,006	0,59 ± 0,006
	3	3,68	1,76 ± 0,12	0,21 ± 0,002	0,95 ± 0,007
	4	4,72	1,89 ± 0,13	0,25 ± 0,004	1,02 ± 0,004
Août	**5**	3,76	2,03 ± 0,16	0,27 ± 0,006	0,61 ± 0,013
	6	4,05	1,83 ± 0,14	0,20 ± 0,012	0,81 ± 0,006
	7	3,16	1,65 ± 0,25	0,27 ± 0,008	0,83 ± 0,007
	8	3,51	2,00 ± 0,38	0,33 ± 0,007	0,91 ± 0,004
	9	5,80	2,57 ± 0,28	0,36 ± 0,004	1,04 ± 0,013
Octobre	**10**	2,70	1,43 ± 0,11	0,18 ± 0,003	0,52 ± 0,180
	11	3,11	1,51 ± 0,18	0,18 ± 0,005	0,84 ± 0,180
	12	3,34	1,85 ± 0,20	0,22 ± 0,003	1,09 ± 0,220
	13	4,36	2,08 ± 0,078	0,19 ± 0,008	1,22 ± 0,190
	14	3,43	1,74 ± 0,146	0,34 ± 0,002	1,20 ± 0,340
Janvier	**15**	2,85	1,57 ± 0,101	0,15 ± 0,002	0,91 ± 0,003
	16	3,09	1,71 ± 0,102	0,23 ± 0,004	0,76 ± 0,032
	17	4,00	2,11 ± 0,018	0,28 ± 0,006	0,85 ± 0,006
	18	3,59	1,89 ± 0,111	0,30 ± 0,004	1,10 ± 0,069
	19	3,80	1,87 ± 0,047	0,21 ± 0,002	0,86 ± 0,008

La variation des valeurs maximums, minimums et moyennes des rendements en polyphénols de l'extraction des feuilles de *Pistacia lentiscus* en fonction de la saison de cueillette sont représentées dans la Figure III.17. On remarque que le rendement moyen en extraits bruts atteint une valeur maximale 4,48% au mois d'août; par contre, la valeur minimale en extraits bruts est égale 3,43% et est enregistrée dans le mois de janvier. Ce résultat est tout à fait le contraire que celui trouvé pour le rendement en lipides où le rendement maximal a été enregistré dans le mois de janvier. Donc, l'accumulation des composés phénoliques dans les feuilles de *Pistacia lentiscus* est faite en plein été.

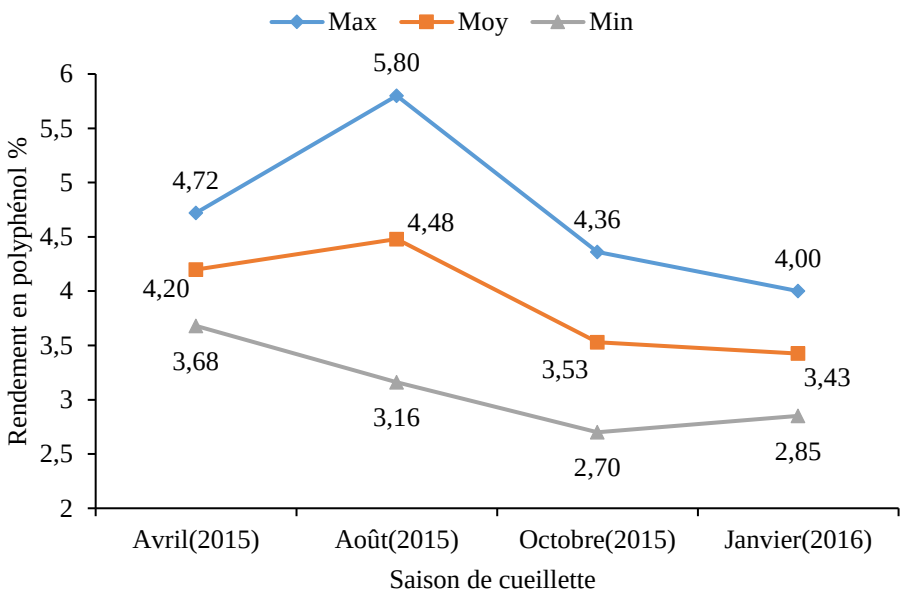


Figure III.17 : Variation saisonnière du rendement en polyphénols.

III.2.1. Quantification des composés phénoliques totaux

Les différents extraits de la fraction acétate d'éthyle obtenus par extraction liquide-liquide ont été analysés quantitativement par spectrophotométrie visible pour déterminer la quantité en phénols totaux. Les valeurs sont calculées à l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure III.18) et elles sont exprimées en équivalent de ce composé par 100 grammes de matière végétale. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.08.

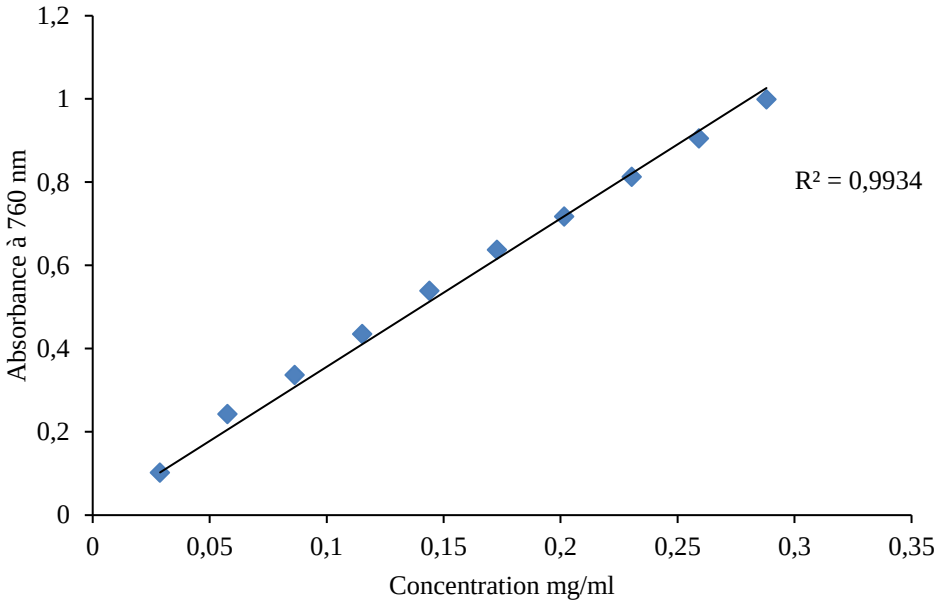


Figure III.18 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les valeurs maximales, minimales et moyennes des quantités en phénols totaux sont représentées dans la figure III.19. Une première remarque à tirer à partir des valeurs des rendements en extraits bruts et des quantités en phénols totaux est que pour tous les échantillons, la masse des extraits bruts est supérieure à celle de la quantité en phénols totaux, ce qui montre que les extraits bruts d'acétate d'éthyle contiennent d'autres composés que les phénols. À titre d'exemple, la valeur moyenne maximale en phénols totaux (2,11 g/100 g) est 2 fois inférieure que celle de l'extrait brut (4,48 g/100 g). La deuxième remarque montre que la quantité en phénols totaux varie en fonction de la saison des cueillettes, elle atteint sa valeur maximale au mois d'aout (2,57g/100 g) et sa valeur minimale (1,43 g/100 g) dans le mois octobre. Toutefois, le rendement en extraits bruts et en phénols totaux varie dans le même sens et l'accumulation des composés phénoliques totaux atteint sa valeur maximale en été inversement aux lipides.

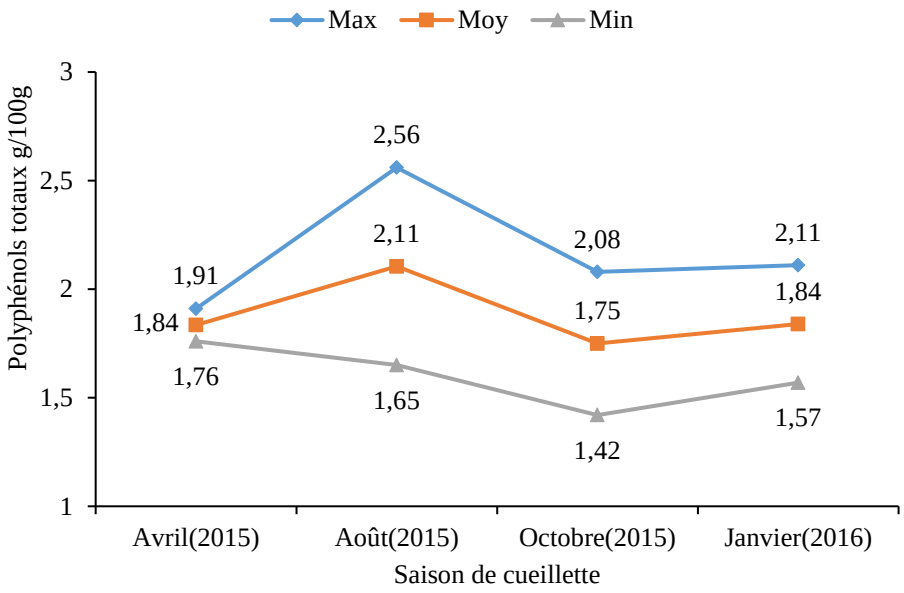


Figure III.19 : Variation saisonnière des quantités en phénols totaux.

Une bonne corrélation positive a été enregistrée entre les rendements en extraits bruts et les quantités en phénols totaux, le coefficient de corrélation est égal à 0,83. Cette valeur montre que 83 % des extraits bruts des 19 échantillons renferment que des composés phénoliques.

Les travaux de recherche relatifs à la quantification des composés phénoliques dans les extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont nombreux. Afin de comparer la capacité de nos extraits en contenu phénolique, nous avons choisi trois travaux tels que ceux de **Gardeli et al , Bampouli et al** et **Dahmoune et al** où ils ont trouvé des quantités très supérieures aux nôtres dans des extraits méthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* provenant de la Grèce et de l'Algérie. Les quantités en phénols totaux sont égales à 588 et 314,88 mg/g pour les échantillons de la Grèce et 185,69 mg/g pour les échantillons de l'Algérie. Ces différences peuvent êtres dues à plusieurs facteurs comme le solvant d'extraction, le genre de l'arbre, la région et la période de la cueillette.

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes ont été déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage de la quercétine prise comme flavonoïdes de référence (Figure III.20). Les quantités en flavonoïdes sont exprimées en équivalent de la quercétine par 100 grammes de matière végétale délipidé. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.08.

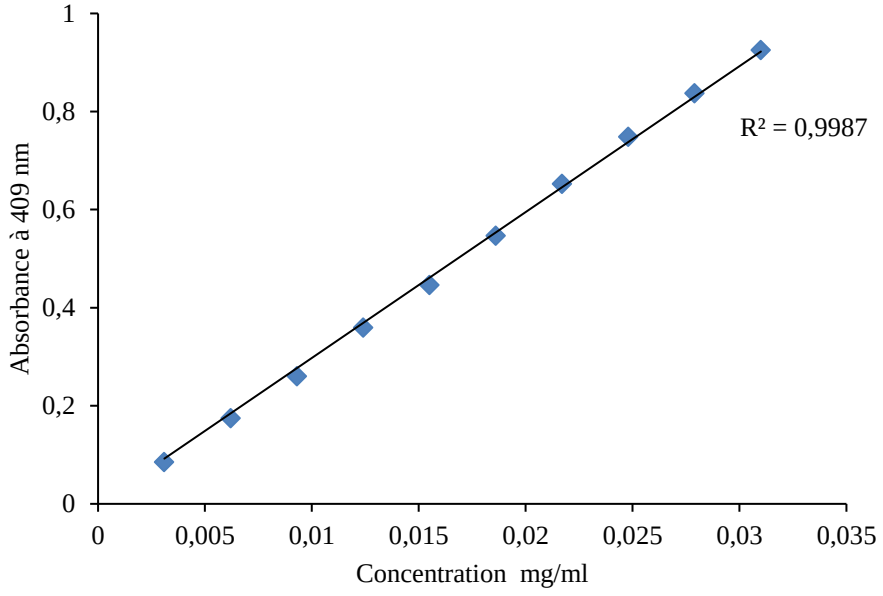


Figure III.20 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les valeurs maximales, minimales et moyennes des quantités en flavonoïdes sont représentées dans la figure III.21. Il est clair que les teneurs en flavonoïdes dans tous les échantillons sont inférieures à celles des phénols totaux et que ces teneurs varient en fonction de la saison. La valeur maximale des quantités en flavonoïdes est trouvé en mois d'août (0,36 g/100 g); par contre, le mois d'avril a enregistré la valeur minimale dont la valeur est égale à 0,14 g/100g. Une corrélation positive moyenne avec un coefficient de l'ordre 0,59 a été trouvée entre les quantités en phénols totaux et les quantités en flavonoïdes pour les 19 échantillons. Cette valeur montre que 59% de composés phénoliques sont des flavonoïdes. La comparaison des quantités en flavonoïdes de nos extraits avec la littérature montre que l'extrait méthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* provenant de la Grèce **(Bampoli et al)** est plus riche en flavonoïdes (106,5 mg/g) que nos échantillons.

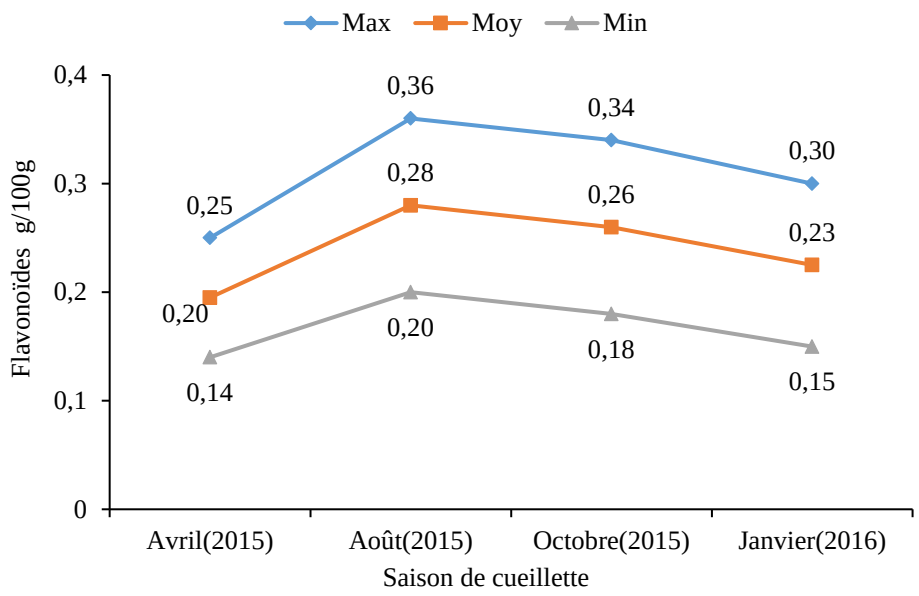


Figure III.21 : Variation saisonnière des quantités en flavonoïdes totaux.

III.2.3. Dosage des Tanins condensés

Les teneurs en tanins ont été déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage de la catéchine prise comme tanin de référence (Figure III.22). Les quantités en tanins sont exprimées en équivalent de la catéchine par 100 grammes de matière végétale.

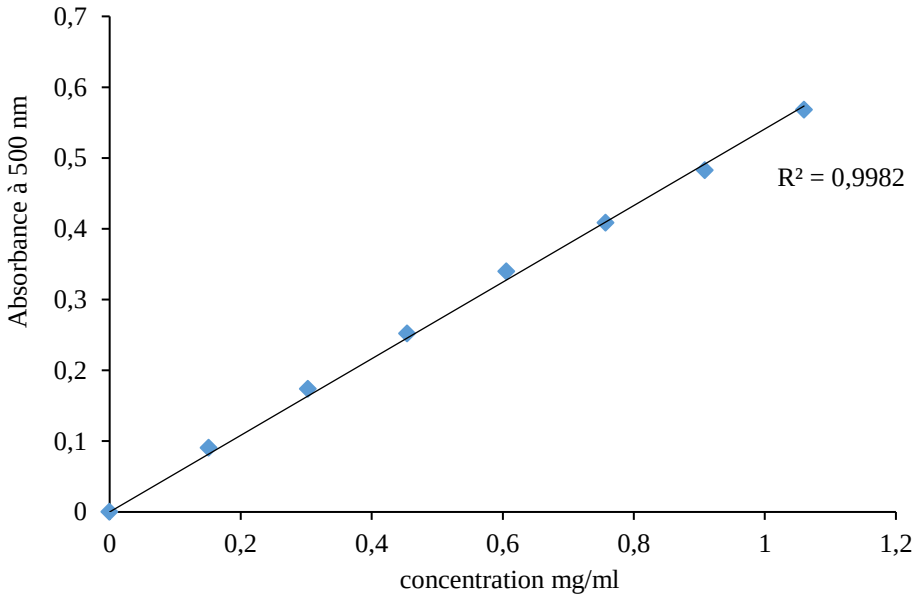


Figure III.22 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.08 et montrent que les quantités en tanins varient légèrement en fonction de la saison de la cueillette où la valeur maximale a été enregistrée au mois d'octobre (1,22 g/100g), la quantité minimale en tanins a été trouvée dans le même mois avec une valeur de 0,52 g/100 g (Figure III.23).

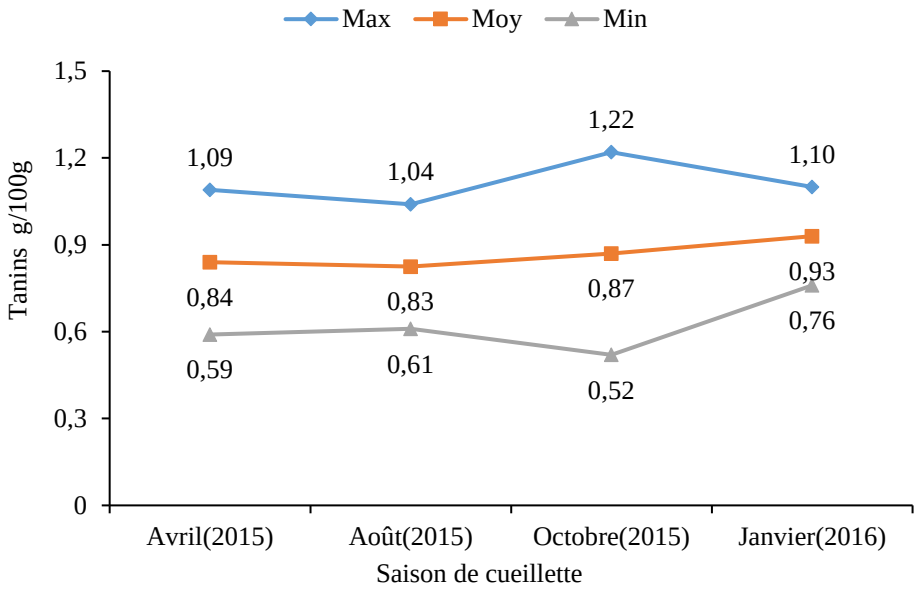
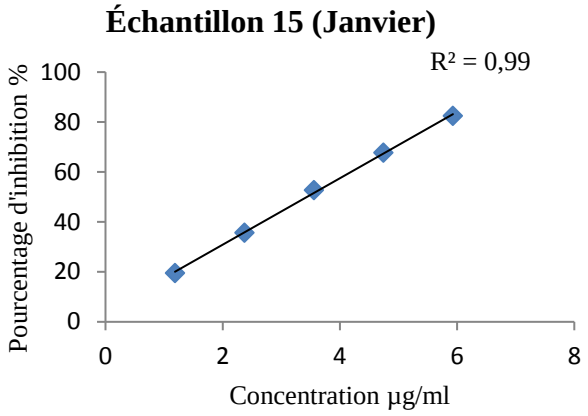
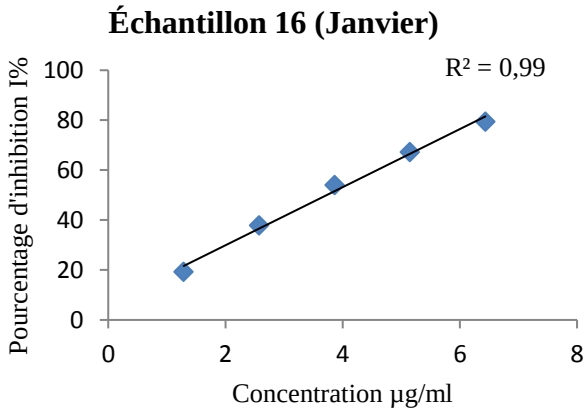


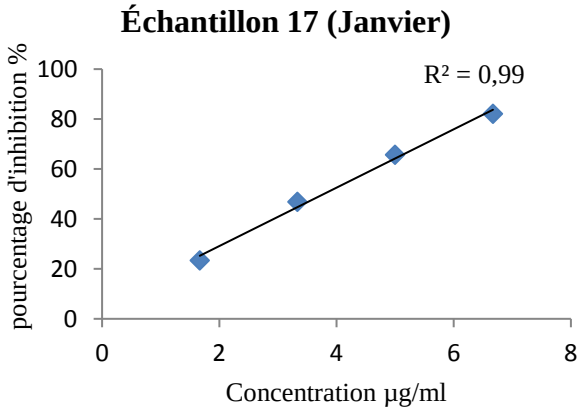
Figure III.23 : Variation saisonnière des quantités en tanins totaux.

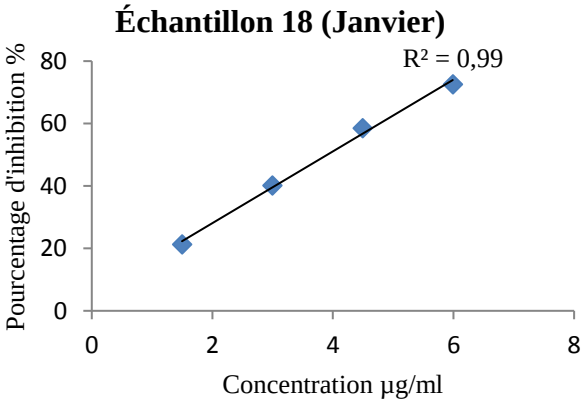
III.2.4. Évaluation de l'activité antioxydante

Nous avons réalisé trois tests pour estimer la capacité antioxydante des extraits phénoliques à savoir le test du DPPH, FRAP et ABTS. L'activité antioxydante est exprimée par IC_{50} qui est définie comme la concentration des extraits inhibant la moitié des radicaux libres. Les valeurs d'IC_{50} sont exprimées en µg/mL et elles sont calculées à partir des courbes du pourcentage du pouvoir d'inhibition PI % en fonction de la concentration des extraits (Figures 24, 25, 26 et Annexe).









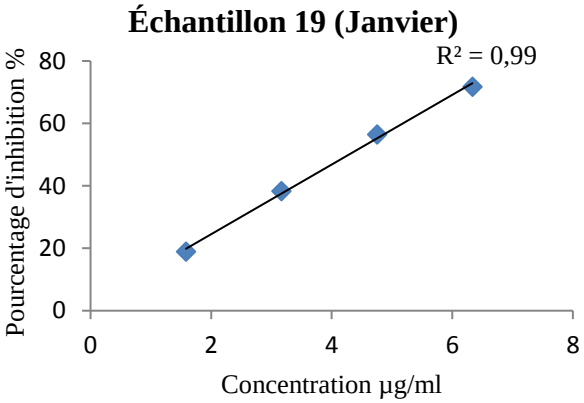
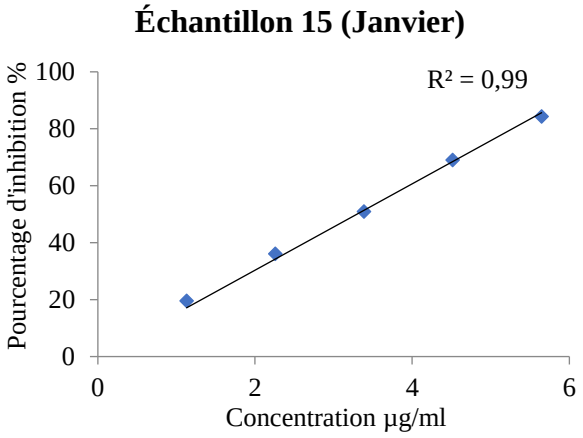
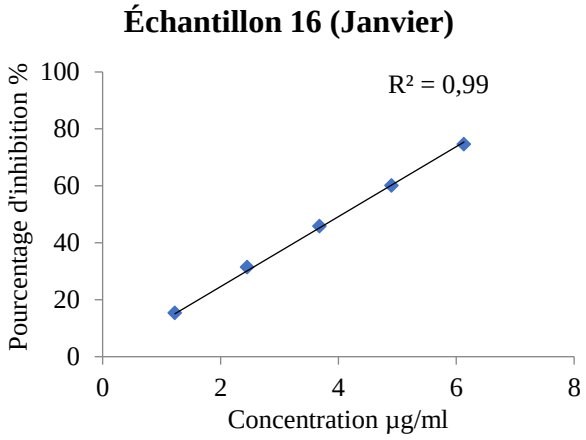
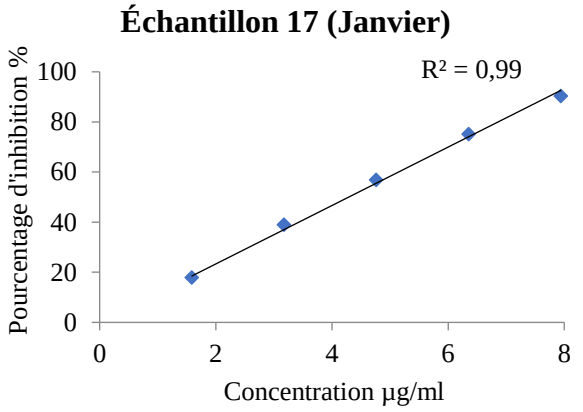
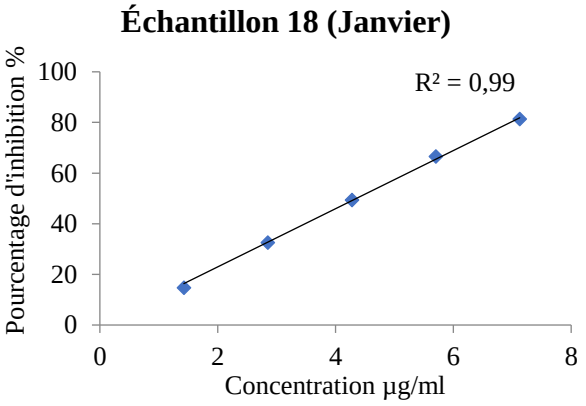


Figure III.24 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du DPPH.









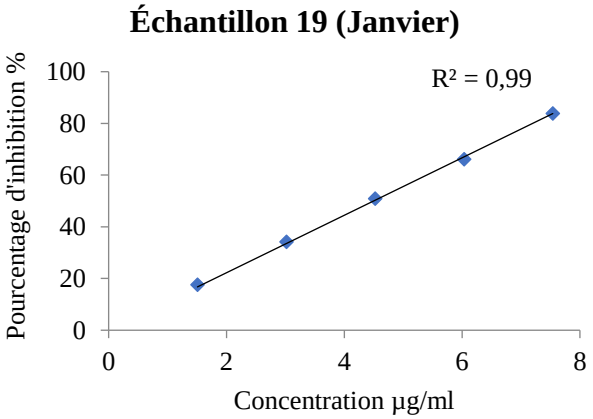


Figure III.25 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du FRAP.

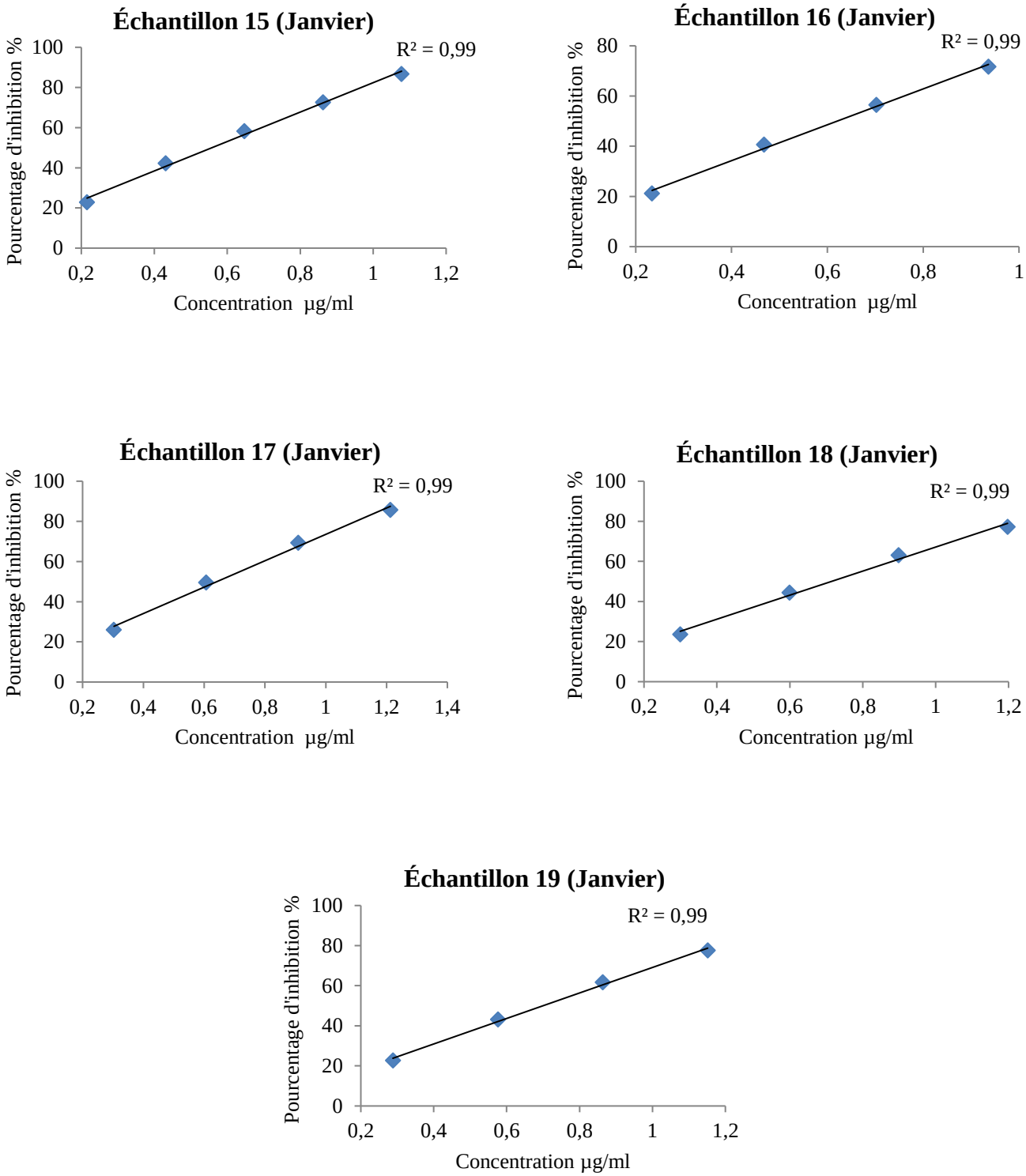


Figure III.26 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test de l'ABTS.

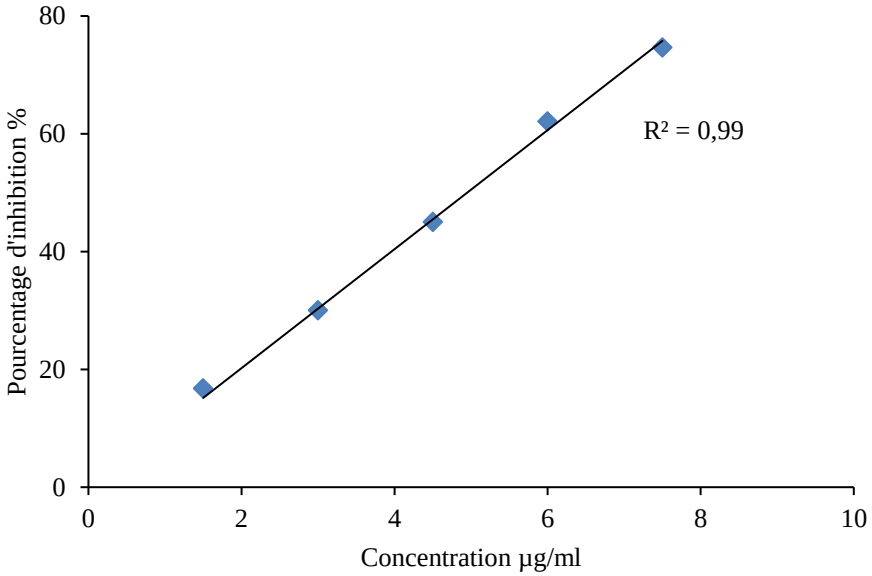
Les valeurs d'IC_{50} pour les trois tests sont regroupées dans le tableau III.09.

Tableau III.09 : Les valeurs de l'IC_{50} des polyphénols dans les trois tests

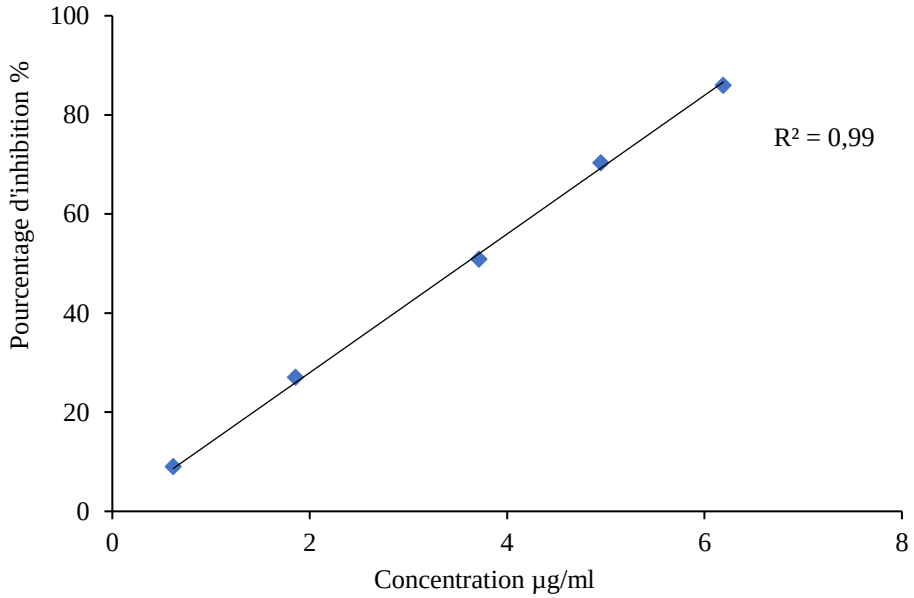
Échantillons/mois		DPPH IC_{50} (µg/mL)	FRAP IC_{50} (µg/mL)	ABTS IC_{50} (µg/mL)
Avril	1	4,92 ± 0,08	5,27 ± 0,03	0,85 ± 0,01
	2	6,07 ± 0,00	6,90 ± 0,08	1,11 ± 0,21
	3	4,70 ± 0,14	5,50 ± 0,04	0,90 ± 0,01
	4	5,06 ± 0,24	5,91 ± 0,09	0,98 ± 0,02
Août	5	3,57 ± 0,11	4,27 ± 0,05	0,66 ± 0,01
	6	4,41 ± 0,10	5,57 ± 0,06	0,81 ± 0,02
	7	4,40 ± 0,04	5,13 ± 0,09	0,86 ± 0,02
	8	4,28 ± 0,06	4,84 ± 0,07	0,76 ± 0,01
	9	5,37 ± 0,01	5,88 ± 0,06	0,91 ± 0,01
Octobre	10	3,84 ± 0,02	4,46 ± 0,05	0,75 ± 0,01
	11	4,81 ± 0,08	4,58 ± 0,03	0,95 ± 0,01
	12	3,59 ± 0,08	4,45 ± 0,02	0,76 ± 0,01
	13	3,77 ± 0,05	4,90 ± 0,06	0,80 ± 0,02
	14	3,83 ± 0,04	4,64 ± 0,07	0,80 ± 0,01
Janvier	15	3,50 ± 0,05	3,30 ± 0,04	0,56 ± 0,01
	16	3,83 ± 0,06	4,07 ± 0,02	0,62 ± 0,01
	17	3,89 ± 0,02	4,29 ± 0,03	0,64 ± 0,01
	18	3,96 ± 0,04	4,35 ± 0,02	0,71 ± 0,02
	19	4,30 ± 0,03	4,50 ± 0,03	0,70 ± 0,02
Vitamine C		4,95 ± 0,06	3,39 ± 0,24	-

Nous remarquons que l'activité antioxydante varie en fonction de la saison de cueillette. Dans le test DPPH, les valeurs d'IC_{50} varient de 3,50 µg/mL pour le mois janvier à 6,07 µg/mL en avril, en ce qui concerne le test FRAP et le test d'ABTS les plus faibles valeurs sont respectivement 3,30 µg/mL et 0,56 µg/mL et elles sont enregistrées au mois de janvier; par contre, les plus grandes valeurs d'IC_{50} sont enregistrées au mois d'avril dont les valeurs sont égales à 3,30 µg/mL et 0,56 µg/mL.

Afin de connaitre la capacité antioxydante de nos extraits par rapport aux antioxydants de synthèse utilisés en industries, nous avons comparé les valeurs d'IC_{50} de nos extraits par rapport à la vitamine C (Figure III.27). Les valeurs montrent que l'activité antioxydante de nos extraits phénoliques évaluée par les deux tests DPPH et FRAP sont comparables à celle de la vitamine C connue un puissant antioxydant en industrie.



(a) Test du DPPH

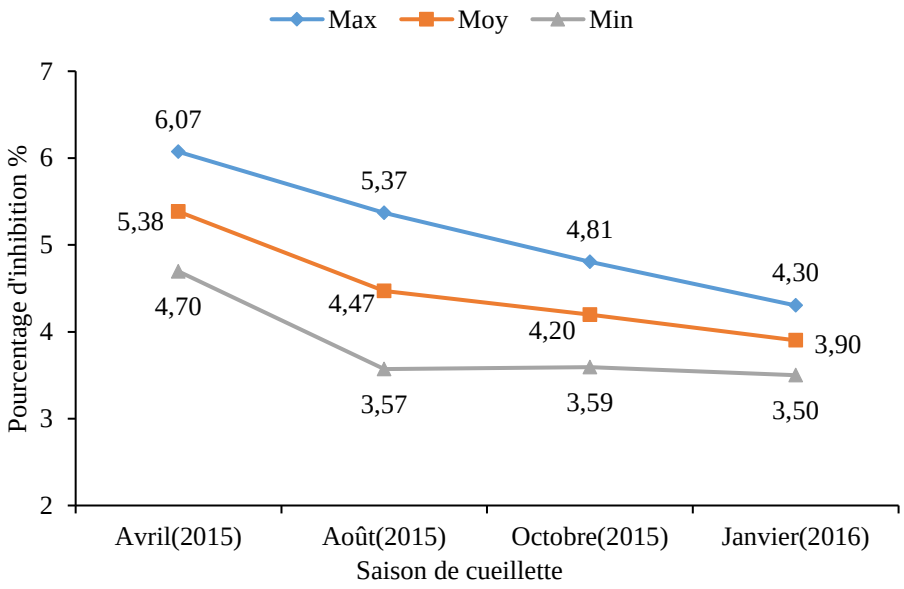


(b) Test du FRAP

Figure III.27 : Activité antioxydante de la Vitamine C.

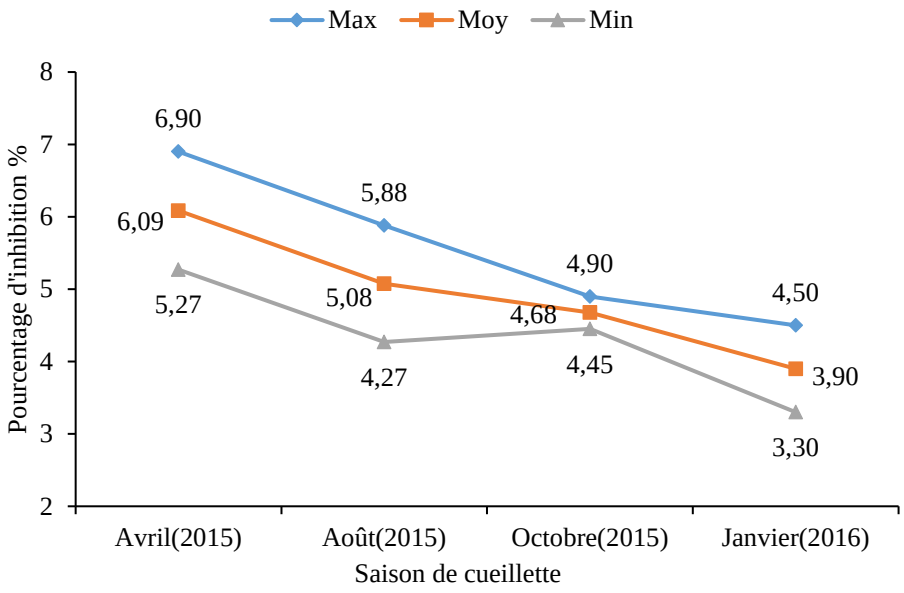
Des coefficients de corrélation de 0,87 à 0,90 ont été trouvés entre les valeurs d'IC_{50} pour les trois tests, ce qui nous permet de dire que 87% à 90% des valeurs d'IC_{50} des 19 échantillons varient dans le même sens.

Pour confirmer ce résultat, nous avons tracé les courbes des variations des valeurs minimales, maximales et moyennes des IC_{50} pour les trois tests en fonction des mois de la cueillette (Figure III.28). D'après les courbes, nous remarquons que les valeurs moyennes d'IC_{50} diminuent dans le même sens pour les deux tests DPPH et FRAP et cela est confirmé par un coefficient de corrélation égale à 0,97; par contre, dans le test ABTS l'activité antioxydante augmente légèrement entre les deux mois d'août et octobre.

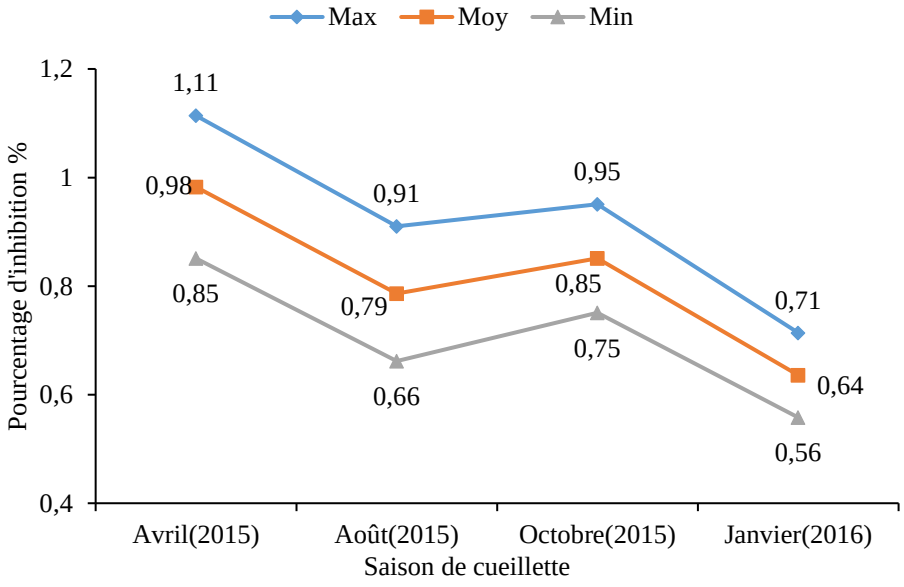


(a) Test DPPH

Figure III.28 : Courbes des variations des IC_{50} pour trois tests d'activités (DPPH, FRAP & ABTS).



(b) Test FRAP



(c) Test ABTS

Figure III.28 (suite) : Courbes des variations des IC_{50} pour trois tests d'activités (DPPH, FRAP & ABTS).

À la lumière de ces résultats, on remarque que l'extrait phénolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* possède une activité antioxydante très importante par rapport aux autres extraits lipidiques. Un point qui attire l'attention est que l'IC_{50} de l'extrait lipidique est 833 fois plus faible que celui de l'extrait phénolique. Cet effet justifie que les composés phénoliques sont les espèces moléculaires possédant la plus grande activité antioxydante importante vis-à-vis du radical stable DPPH.

Nous avons essayé de faire une comparaison de nos résultats avec d'autres références. Les données disponibles relatives aux tests DPPH et ABTS sont celles des travaux de Salhi **(Salhi et al, 2019)** et Dahmoune (**Dahmoune et al, 2014**) respectivement. Si nous comparons nos résultats avec ces travaux, nous constatons que nos extraits phénoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont plus actifs et puissants que l'extrait phénolique des travaux de Dahmoune (126.19 ± 1.88 µg/mL), cette extraction est assistée par micro-ondes et aussi celle de Salhi (17.72 ± 1.23 µg/mL).

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail présenté nous a permis d'approfondir la connaissance de quelques constituants chimiques des feuilles du *Pistachier lentisque* de la famille des anacardiacées par l'étude des principaux composés de la fraction lipidique (acides gras et tocophérols) des feuilles et le contenu en phénols totaux, comme il nous a permis aussi d'évaluer l'activité antioxydante des extraits lipidiques et phénolique et d'étudier l'influence de la saison de cueillette sur la composition des lipides(acides gras, tocophérols et stérols), ainsi sur le contenu en phénols totaux et l'activité antioxydante des différents extraits.

Les lipides des feuilles de *P. lentiscus* sont riches en AGINS différents et très importants: C18:2 & 3, mais présentent une grande variabilité dans leur composition : linoléique (6,5 à 16,99%), linolénique (5,04 à 48,92%) et acide oléique (3,42- 14,90%); ces AG sont connus pour leurs multiples avantages diététiques, pharmaceutiques et cliniques. L'acide gras d'origine naturelle et l'acide linoléique conjugué (C18:2) présentent différentes propriétés telles que anti-athérogène et anti-cancérigène (**Houseknecht et al, 1998**). Dans le même contexte, outre son rôle dans la réduction du risque de maladies cardiovasculaires, l'acide α-linolénique (C18:3) réduit le risque de maladie cardio-vasculaire; en plus, il présente également des effets diététiques tels que des anti-inflammatoires et des anti-athérogènes (**Zhao et al, 2004**).

Le résultat principal de cette étude illustre le potentiel nutritionnel richesse en MAGINS tels que C18:1w9, présence d'acides gras essentiels tels que C18:2w6 à tous les stades de la maturation, la richesse en acides gras oméga-3 tels que C18:3w3. De l'huile de feuilles de *P. lentiscus*, qui peut offrir des possibilités d'exploitation rationnelle à des fins médicinales et dans les industries alimentaires. En ce qui concerne les stérols et tocophérols, bien que la quantification totale ait été réalisée, des analyses plus profondes sont encouragées afin d'identifier les composants chimiques exacts et leurs quantités dans ces fractions.

L'évolution et la variabilité de la composition en métabolites lipidiques des feuilles de *P. lentiscus* ont été étudiées pendant plusieurs mois, ce qui correspond aux mi-saisons de printemps, d'été, d'automne et d'hiver. En règle générale, les résultats de cette enquête ont confirmé que la saison avait un effet significatif sur les métabolites présents (en particulier pour certains composants d'acides gras et l'isomère δ-tocophérol). Les AGPI ont atteint leur teneur maximale en automne et en hiver.

Le pourcentage de C18:3 a atteint sa valeur la plus élevée en hiver. Pour l'acide palmitique, son pourcentage été le plus bas en hiver mais atteint sa valeur la plus élevée au printemps.

La grande variabilité des compositions de métabolites et de leur contenu a été enregistrée pour chaque période de collecte de plantes tout au long de l'année (quatre saisons). Cette grande variabilité a dépassé la variation saisonnière, ce qui signifie que la variation saisonnière était un paramètre moins déterminant par rapport à la variabilité de la majorité des variations de paramètres étudiées. Enfin, quatre groupes différents ont identifié la composition en acide gras des populations étudiées. Ces groupes étaient indépendants de la saison de la collection.

L'étude de fraction insaponifiable a révélé la présence des stérols et des tocophérols. La teneur en stérols varie de 143,37 à 295 mg/g lipides, tandis que la teneur en tocophérols totaux est varié de 1,75 à 32,97 mg/g lipides. D'après ces résultats, on conclut que les lipides étudiés sont riches en stérols comparativement à d'autres huiles végétales. L'analyse des tocophérols dans les huiles étudiés par CLHP fait apparaitre une forte prédominance d'isomère α-tocophérol (30,97-97,57%) suivie de δ-tocophérol (2,43-65,17%).

Le dosage des composés phénoliques obtenu par le système d'extraction (Méthanol/Eau) montre que les extraits dévoilent des teneurs en phénols totaux s'étalant de 1430 à 2570 mg équivalents en acide gallique par 100 g de tourteaux. Cependant, la détermination quantitative des tanins condensés révèle que tous les extraits sont une source prometteuse en tanins condensés avec des teneurs allant de 520 à 1220 mg équivalents en catéchine par 100 grammes de tourteaux, tandis que la quantité des flavonoïdes totaux allant de 140 à 360 mg équivalents en quercétine par 100 grammes de tourteaux.

Tous les extraits lipidiques ont montré une activité similaire de piégeage des radicaux DPPH et dans le teste du *β*-carotène sauf pour l'extrait 1 du mois d'avril qui a une meilleure activité antioxydante qui contient la plus grande teneur en α-tocopherol (32,97±0,57 mg/g lipides).

Ce qui permet d'attribuer le bon pouvoir antioxydant de ce lipide à la présence de α-tocophérol ou à la présence des autres métabolites secondaires (composés phénoliques…) confirmé par une bonne corrélation entre l'EC_{50} et la teneur en (Stérols, tocophérols et les différents isomères).

Les activités antioxydantes des lipides et extraits phénoliques ont été réalisées en utilisant les tests : DPPH, β-carotène, FRAP et ABTS. Les résultats obtenus ont montré que les lipides possèdent un bon pouvoir réducteur, mais une activité anti-radicalaire faible ou parfois négligeable, et ceci en les comparant avec les antioxydants de références utilisés, alors que les composés phénoliques ont montré des activités plus fortes.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant d'approfondir l'étude par l'analyse qualitative et quantitative des stérols individuels et les composés phénoliques. Cependant, l'étude *in vivo* des extraits lipidiques des feuilles de *P. lentiscus* vont permettre d'évaluer l'effet biologique de ces extraits.

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure connaissance des ressources de la flore locale en substances d'intérêt biologique. Dans ce sens, l'esprit reste fondamental, on ne peut cependant nier la portée économique des résultats que nous avons obtenus dans la mesure où les antioxydants et les acides gras essentiels en particulier C18 :3 naturels se rencontrent rarement en telles quantités dans les plantes. La végétation dans toutes les régions de notre pays fournit des milliers de tonnes des feuilles de *P.lentiscus*. A notre considération, au lieu de voir cette biomasse partir en fumée; il serait bénéfique d'envisager une valorisation industrielle des produits nobles tels que les acides gras polyinsaturés et l'alpha-tocophérols que renferme cet arbre.

Références bibliographiques

Al-Mamun, M.; Yamaki, K.; Masumizu, T.; Nakai, Y.; Saito, K.; Sano, H.; Tamura, Y. (2007). Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern japan determined using electron spin resonance spectrometry. *Int. J. Biol. Sci.* **3**, 349-355.

Ames, B.N.; Gold, L. S; Willett, W.C. (1995). The Causes and Prevention of Cancer *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.Vol. 92, N°: 12, pp. 5258-5265.

Assimipoulou, A.N. ; Papageorgiou, V.P. (2005). GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. Biomedical Chromatography 19, 285-311.

Bampoulia, A. ; Kyriakopouloua, K. ; Papaefstathioub, G. ; Loulia, V. ; Krokidaa, M. ; Magoulas, K. (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1 : 81–91.

Barreto, M.C. (2005). Lipid extraction and cholesterol quantification. *J. Chem. Educ* . Vol 82(1): 103-104.

Baudoux, D. (2003). L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, édition Amyris, pp 145-146.

Belkheiri, N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Editions Le Fennec. Casablanca. 766pp.

Benabed, K.H. (2018). Composition chimique et activités biologiques des huiles essentielles et composés phénoliques de quelques espèces de la famille des *Lamiaceae*. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Benalia, M. (2016). Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Benalia, M. ; Djeridane, A. ; Gourine, N. ; Nia, S. ; Ajandouz, E. ; Yousfi, M. (2015). Fatty acid profile, tocopherols content and antioxidant activity of algerian pumpkin seeds oil (*Cucurbita pepo L*). *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 8 : 9–25.

Bensegueni, A. (2007). Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brulures. Thèse d'Etat en sciences vétérinaires. Université Mebtouri. Constantine. p. 21-22.

Benzie, I.F.F. ; Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ''Antioxidant Power'': The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.

Boizot, N. ; Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Ed. INRA, Paris.

Bougherara, M.I. (2015). Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse de Doctorat 3ème cycle (LMD). Université Badji Mokhtar – Annaba.P.5.

Boukhalkhal, S. (2018). Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des métabolites secondaires d'*Artemisia campestris* L. Thèse de doctorat, Université Amar Télidji – Laghouat.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 915 p.

Catier, O; Roux, D. (2007). "Botanique pharmacognosie phytothérapie",. Wolters Kluwer (ed.), Collection Porphyre, France

Chen, I. ; Chang, H. ; Yang, H. ; Chen, G. (2004). Evaluation of total activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H_2O_2/HRP system in micro. plates, *Journal of food and drug analysis*; 29-33.

Chevalley, I. (2000). Contribution à l'étude phytochimique des *Saxifracées* : isolement d'antioxydants à partir de *Saxifraga stellaris* L. et *Saxifraga cuneifolia* L. et d'un composé antifongique de *Ribes rubrum* L. Thèse de doctorat, Lausanne, PP : 175.

Cordell, G.A. ; Colvard, M.D. (2005). Some Thoughts on the Future of Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. P100,PP 5-14.

Crozier, A. ; Clifford, M.N. ; Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

Dacosta, Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p.

Dahmounea, F. ; Spignob, G. ; Moussia, K. ; Reminia, H. ; Cherbalc, 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. *Industrial Crops and Products* 61 : 31–40.

Delgado, R.; Martin, P., Del Alamo, M., Gonzalez, M.R. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 623-630.

Diamantoglou, S. ; Meletiou-Christou, M. (1979). Das jahresperiodische Verhalten des Rohfetts und der Fettsäuren in Rinden und Bläuern von *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* und *Pistacia vera*: The Lipid Content and Fatty Acid Composition of Barks and Leaves of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera* During the Course of a Year. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 93 (3):219-228.

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*, 654-660.

Emmerie, A. ; Engel, C. (1939). Colorimetric détermination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments. *Rec. Trav. Chim*. Vol 58(4): 283-289.

Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. Am J Clin Nutr, 72, 647S– 652S

Famsworth, N.R. ; Arkerele, O. ; Bingel, A.S. ; Soejarto, D.D. ; Guo, Z. (1985). Bull. WHO P.63, PP.965-981.

Gardeli, C. ; Papageorgiou, V. ; Mallouchos, A. ; Theodosis, K. ; Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* 107 : 1120–1130.

Gaussen, H. ; Leroy, J.F. ; Ozenda, P. (1982). Précis de Botanique. 2. Les Végétaux Supérieurs, Ed. Masson, 2ème édition, p.579.

Grosjean, N. (**2007).** L'Aromathérapie, édition Eyrolles, p 163.

Guenane, H. (2017). Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf). Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Guyot, M. (1992). Systématique des Angiospermes. Lomé (Togo): Presses Editogo.

Hertog, M.GL. ; Hollman, P.C.H. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentialy anticarcinogenic flavonïds in vegetables and fruits.J. Agric. Food. Chem. 40 : 1591-1598.

Houseknecht, K.L.; Heuvel, JPV; Moya-Camarena, S.Y.; Portocarrero, C.P.; Peck, L.W.; Nickel, K.P.; Belury, M.A. (1998). Dietary Conjugated Linoleic Acid Normalizes Impaired Glucose Tolerance in the Zucker Diabetic Fattyfa/faRat. Biochem Biophys Res Commun 244 : 678-682

Ichai, C; Quintard, H; Orban, J.C. Désordres métaboliques en réanimation : de la physiopathologie au traitement. *Éditions Springer*, 2010, 508 pages

Iserin, P. (2001). Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soin 2ième édition Ed Larousse/VUEF, pp13-16, p 250, pp291-296,

Jacques, B ; André, R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.

Jean-Denis, J. B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, Plasmopara viticola (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de NEUCHÂTEL.

Kalili, K.M. ; de Villier, A (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. J. Sep. Sci 34, 854-876

Karp, G. (2010). Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. Edition de Boeck Supérieur, p 35.

Koechlin, R.C. (2006). Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20, 165–177.

Kokwaro, J. O. (1986). Anacardiaceae. In: Polhill, R. M. (Editor), 1986. Flora of Tropical East Africa. Rotterdam (Netherlands) : A. A. Balkema. p.59.

Kordali, S. ; Cakir, A. ; Zengin, H. ; Duru, M.E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in turkey. *Fitoterapia* 74 : 164-167.

Lacolley, P. (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, p 312.

Laghouiter, OK. (2018). Valorisation phytochimique des noyaux de quelques variétés du Palmier dattier de l'Algérie. Thèse de doctorat, Université Amar Telidji – Laghouat.

Lindley, J. (1830). An introduction to the Natural System of Botany. Longman, Rees, Orme, Brown and Green, London, England.

Mabberley, D.J. (1987). The Plant Book (A portable dictionary of the higher plants). Cambridge: University Press.

Macheix, J.J ; Fleuriet, A ; Christian, J.A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Edition : Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes.

Magiatis, P.; Melliou, E.; Skaltsounid, A.L.; Chinou, 1.8.; Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oïls of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. Plant Med, 65.

Marco, G.J. (1968). A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45 (9) : 594–598.

Martinez, C.M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. Biochem.77: 147- 161.

Martin, S.; Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protéction cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie*, 51 : 304 – 315.

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.

Miller, H.E. (1971). A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48 (2) : 91–91.

Mompon, B. ; Lemaire, B. ; Mengal, P. (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, N° 87).

More, D. ; White, J. (2005). Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, 18-24.

Morena, M.; Martin-mateo, M.; Cristol, J.P.; Canoud, B. (2002). Stress oxydant,hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. Néphrologie, 23 (5), 201 – 208.

Naudet, M. (1992). Manuel des corps gras, tome 1 Ed technique et documentation Lavoisier, paris. P 43-45.

Naudet, N. ; Hautfenne, A. (1986). Méthode Normalisée pour la Détermination des Stérols Totaux dans les Huiles Et Graisses, Rev. Fr. *Corps Gras*, Vol 33, p 167.

Ouelmouhoub, S. (2005). Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie).

Ozenda, P. (1977). Flore du Sahara, Ed. CNRS. PARIS, France.PP.250-259.

Palevitch, D., Yaniv, Z., (2000). Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Istrael.

Park, P. J.; Jung, W. K.; Nam, K.S.; Shahidi, F.; Kim, S. K. (2001) Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society*, 78 (6), 651-656.

Pell, S.K. (2004). Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Thèse de Doctorat. St Andrews Presbyterian College, p. 207.

Pincemail, J. ; Meurisse, M.; Limet, R.; Defraign, J.O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaissaux, Cœur, Poumons, 4, 1 – 7.

Piquet, M.A.; Hébuterne, X. (2007). Nutrition en pathologie digestive. Editions Doin.

Price, M.L. ; Van Scoyoc, S. ; Butler, L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agr. *Food Chem*. 261214-1218.

Prior, R.L. ; Wu, X. Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Quezel, P. ; Santa, S. (1962). Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques éridionales, Tome I, Centre Nationale de la Rrcherche Scientifique, p 611

Saïd, O. ; Khalil, K. ; Fluder, S. ; Azaizeh, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 251-265.

Salhi, A. ; Bellaouchi, R. ; El Barkany, S. ; Rokni, Y. ; Bouyanzer, A. ; Asehraou, A. ; Amhamdi, H. ; Zarrouk, A. ; Hammouti, B. (2019). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Pistacia lentiscus* leaves, *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 17(3), pp. 189-198.

Salvador, M.D. ; Aranda, F. : Gomez-Alonso, S. ; Fregapane, G. (2001). Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem*. 74, 267–274.

Scalbert, A.; Canach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45, 287–306.

Scherrer, A.M. ; Motti, R. ; Weckeerie, C.S. (2005). Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Compania, southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 97, 129-143.

Silvia, T. M. ; Miller, E.E. ; Pratt, D.E. (1984). *Chia* Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants, *JAOCS*, vol. 61, no. 5 : 928-931.

Tapier, H. ; Townsend, DM. ; Tew, KD. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. *Copper Biomed Pharmacother* 57:386–398.

Trabelsi, H. ; Sakouhi, F. ; Renaud, J. ; Villeneuve, P. ; Khouja, ML. ; Mayer, P. ; Boukhchina, S. (2012). Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (*Pistacia lentiscus*) fruits. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114 (8):968-973

Vermerris, W. ; et Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry, *Springer, Netherlands*, 276p.

Villa, B. ; Calabresi, L. ; Chiesa, G. ; Risè, P. ; Galli, C. ; Sirtori, CR. (2002). Omega-3 fatty acid ethyl esters increase heart rate variability in patients with coronary disease. Pharmacological Research 45(6):475-478

Villar, A. ; Sanz, M.J. ; Paya, M. (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. Int. J. Crude Drug Res., 25, N°. 1, pp. 1-3.

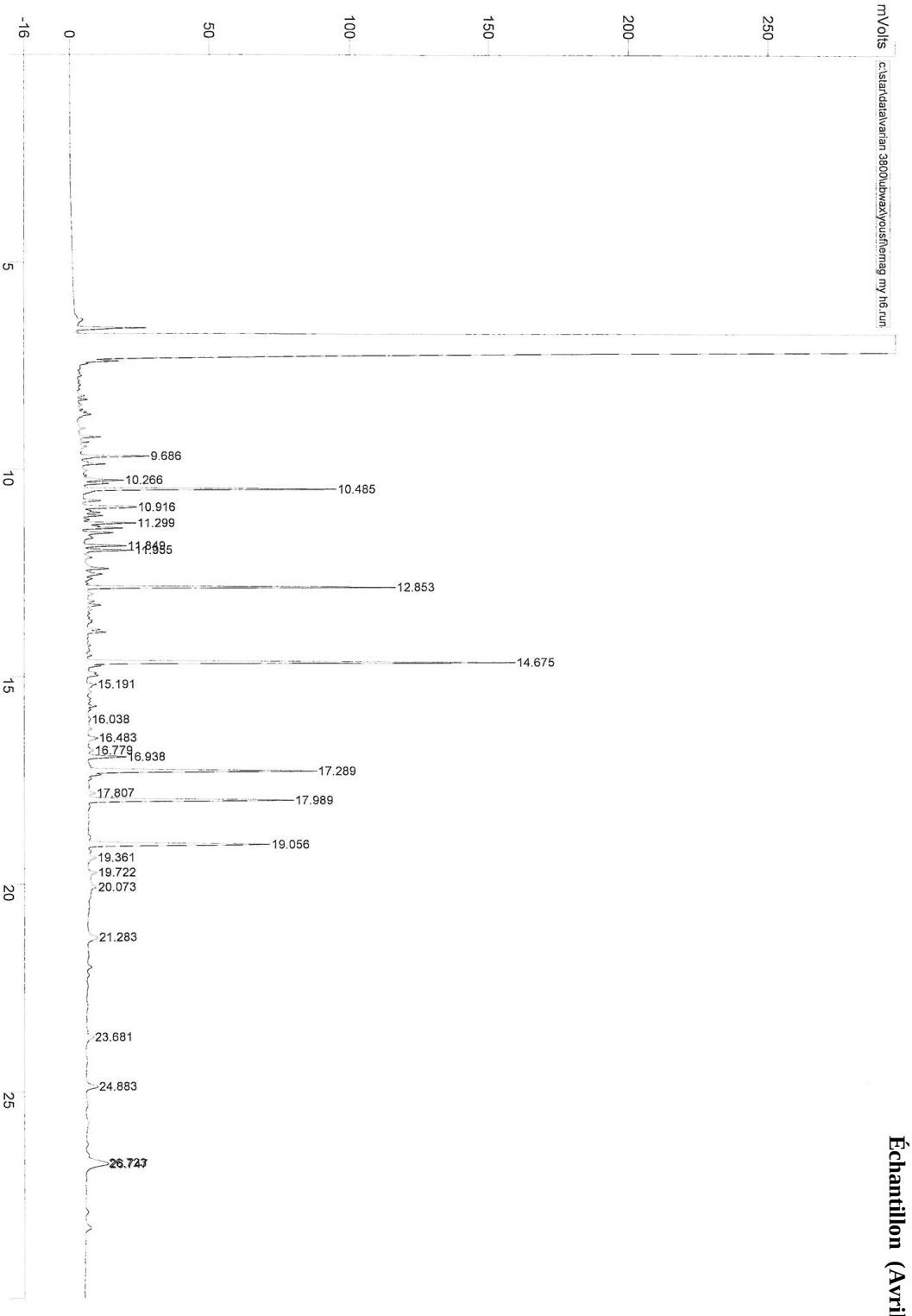
Yahia, M. (1992). La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie, Ain Taya, p59

Yaqoob, P. (2002). Monounsaturated fatty acids and immune function. *European Journal of Clinical Nutrition* 56 (Suppl 3):S9-S13.

Zakkad, F. (2017). Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés biologiques de trois espèces de l'*Euphorbia*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba.

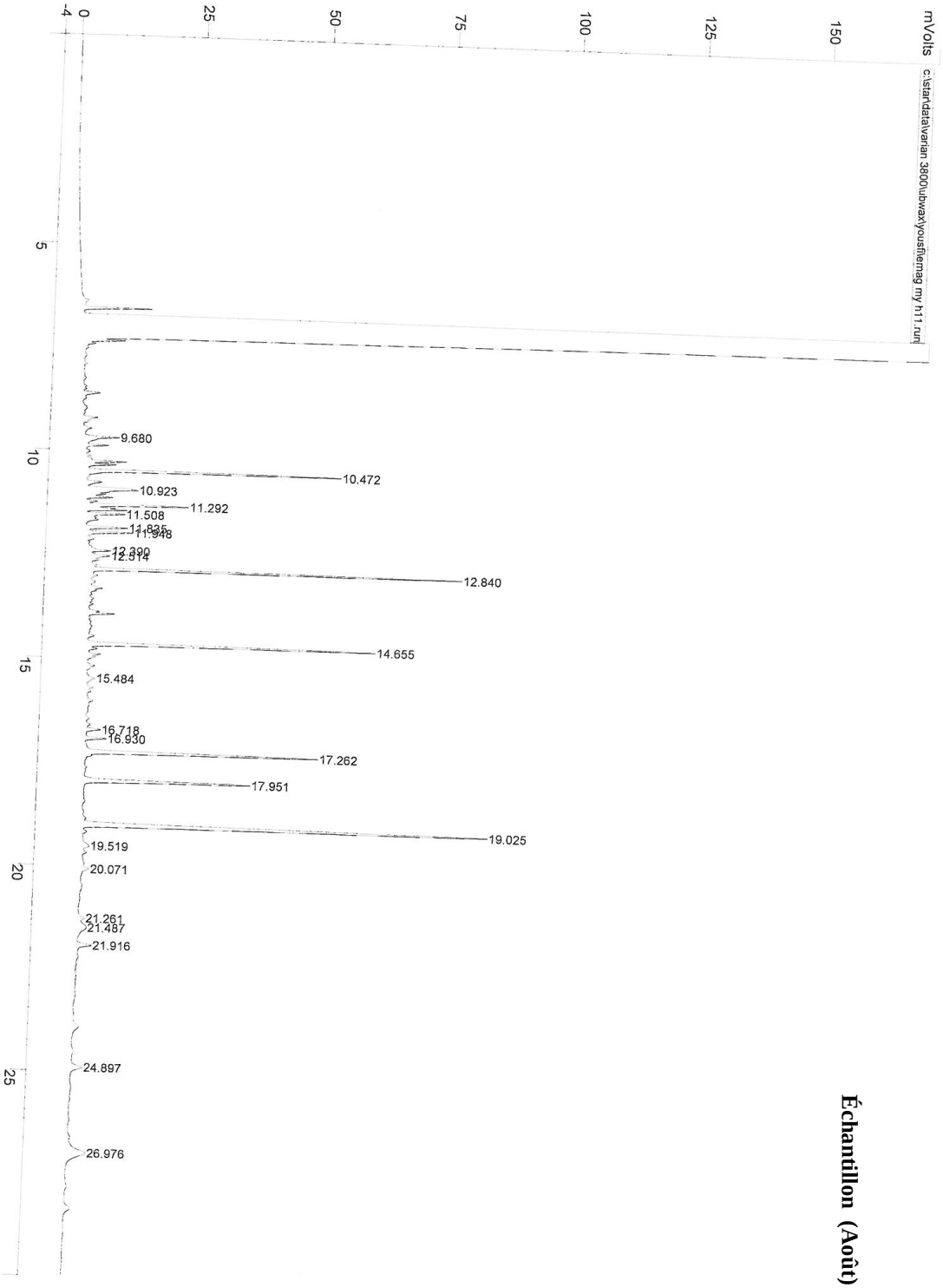
Zhao, G.; Etherton, T.D., Martin, K.R.; West, S.G.; Gillies, P.J.; Kris-Etherton, P.M. (2004). Dietary α-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. The Journal of Nutrition 134 : 2991-2997

Annexe



Échantillon (Avril)

Figure A1 : Exemple d'un Chromatogramme des EMAGs dans les lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*



Échantillon (Août)

Figure A1(Suite) : Exemple d'un Chromatogramme des EMAGs dans les lipides étudiés de *Pistacia*

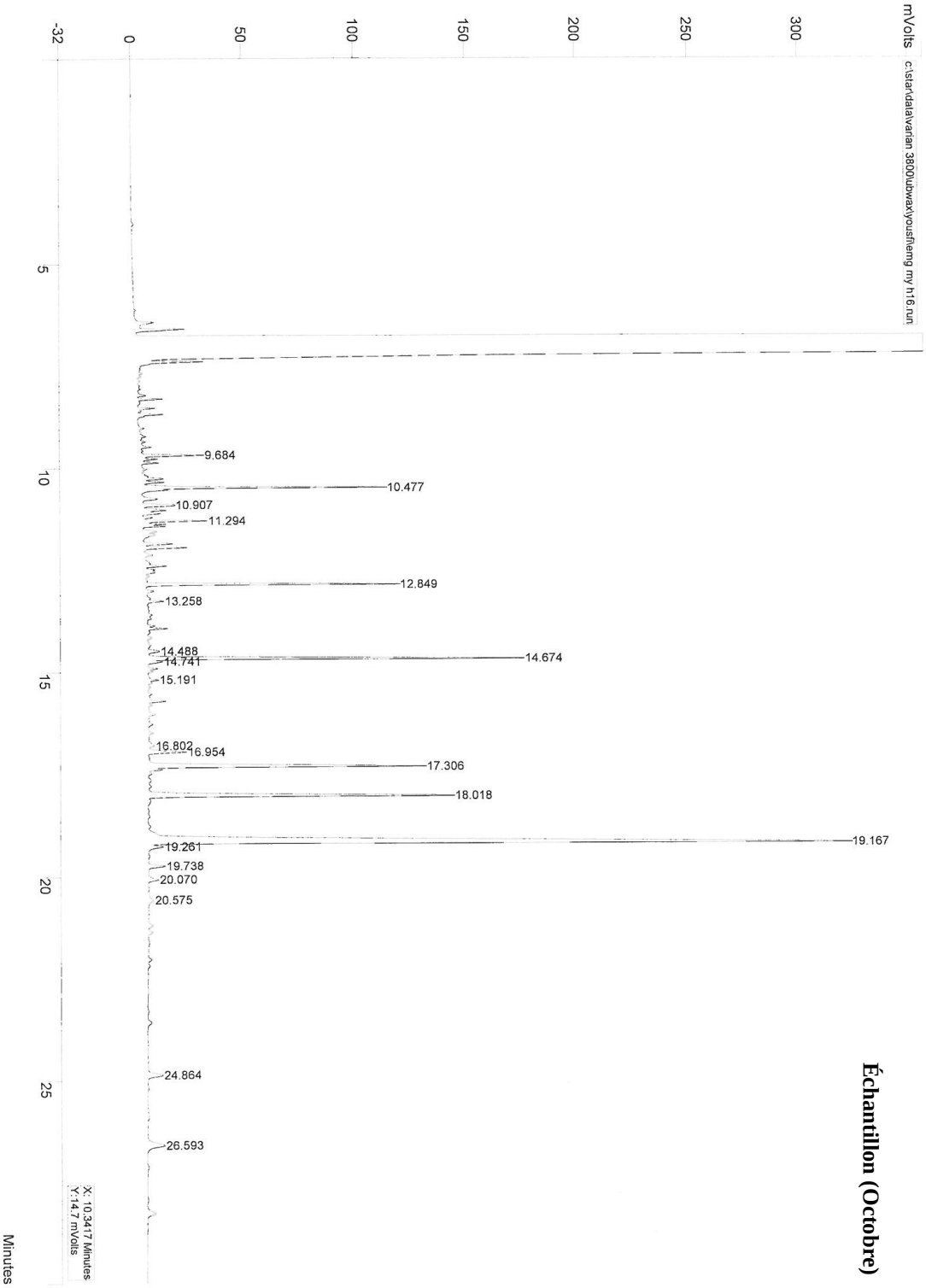


Figure A1(Suite) : Exemple d'un Chromatogramme des EMAGs dans les lipides étudiés de *Pistacia*

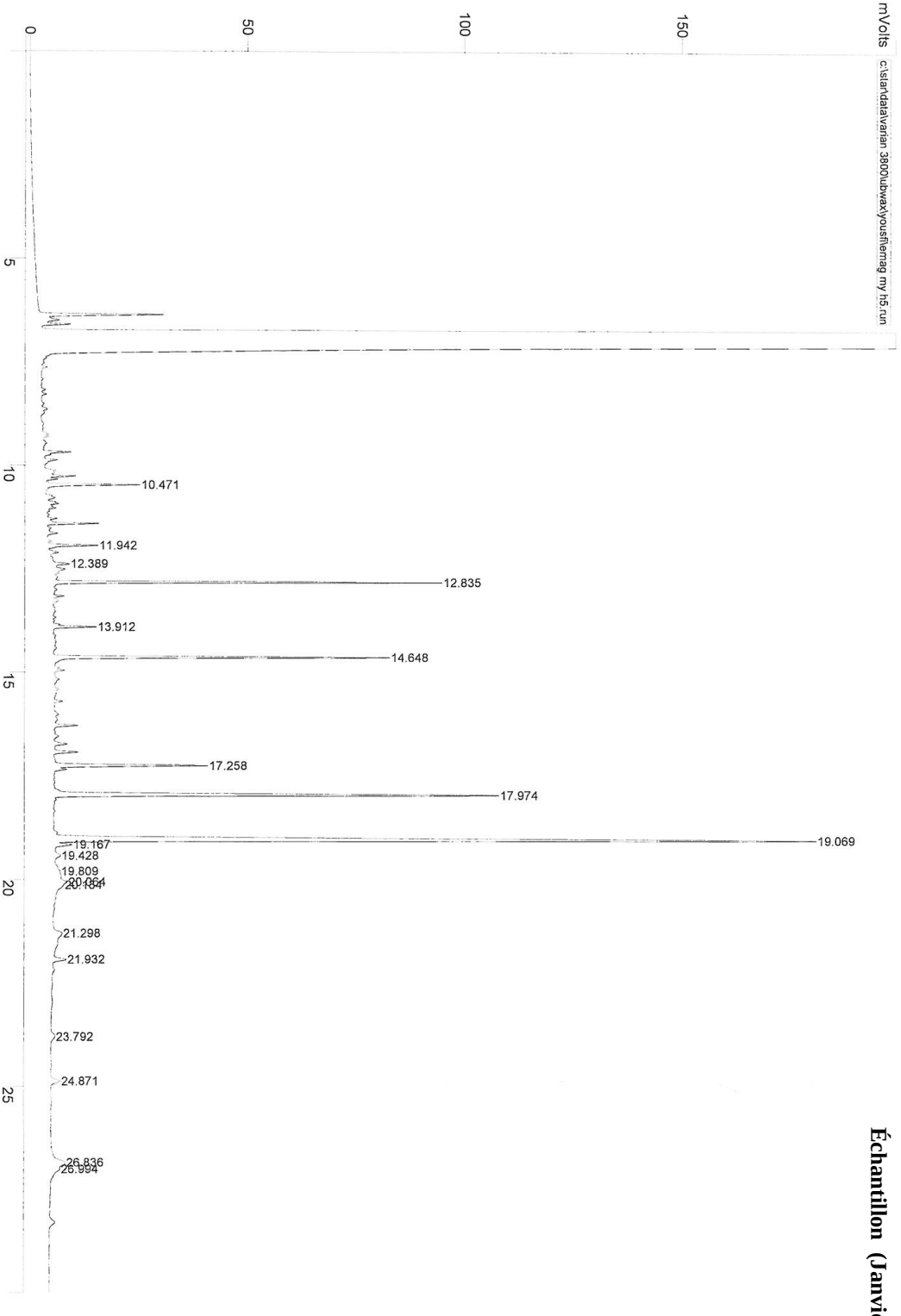


Figure A1(Suite) : Exemple d'un Chromatogramme des EMAGs dans les lipides étudiés de *Pistacia*

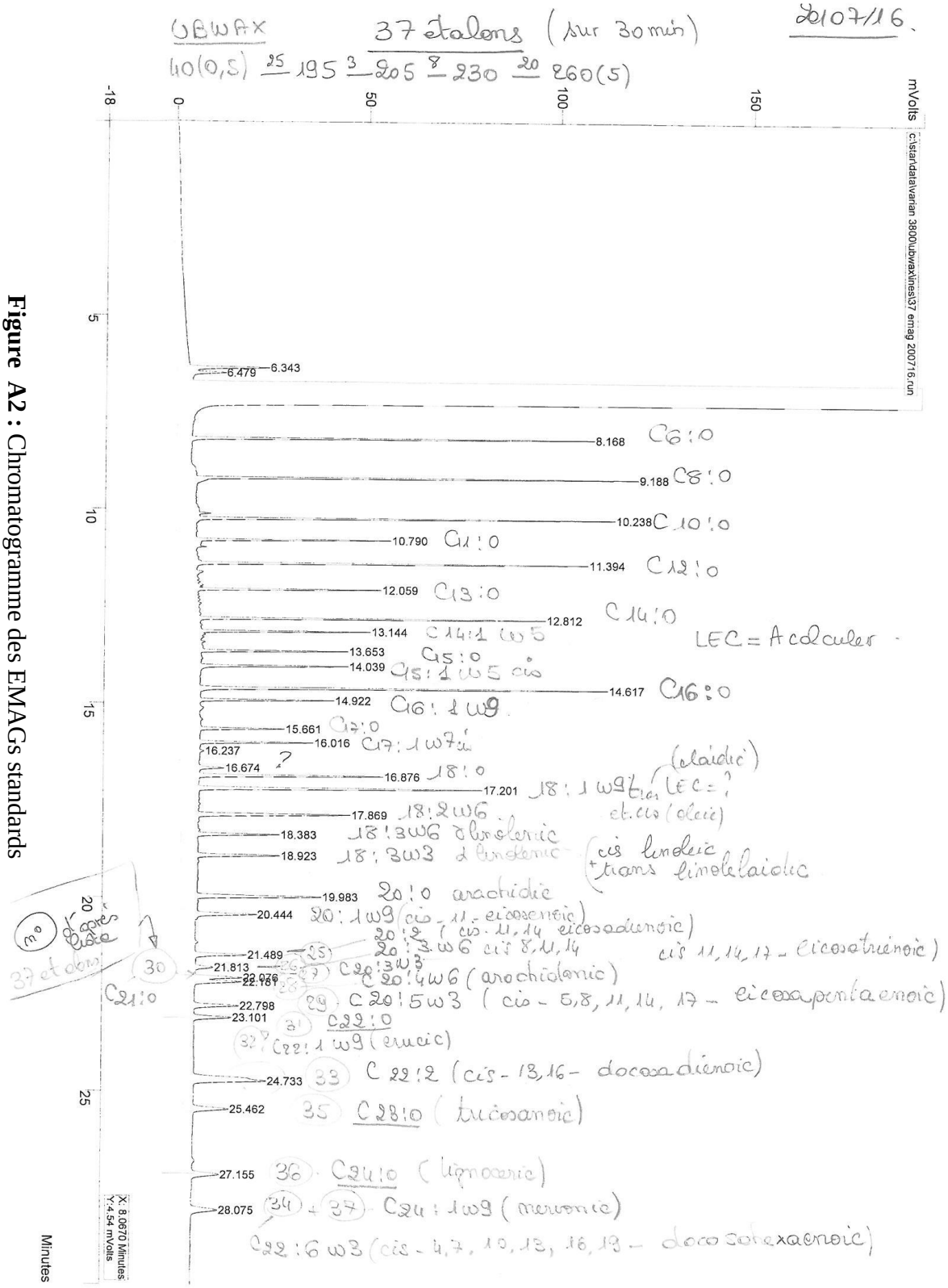


Figure A2 : Chromatogramme des EMAGs standards

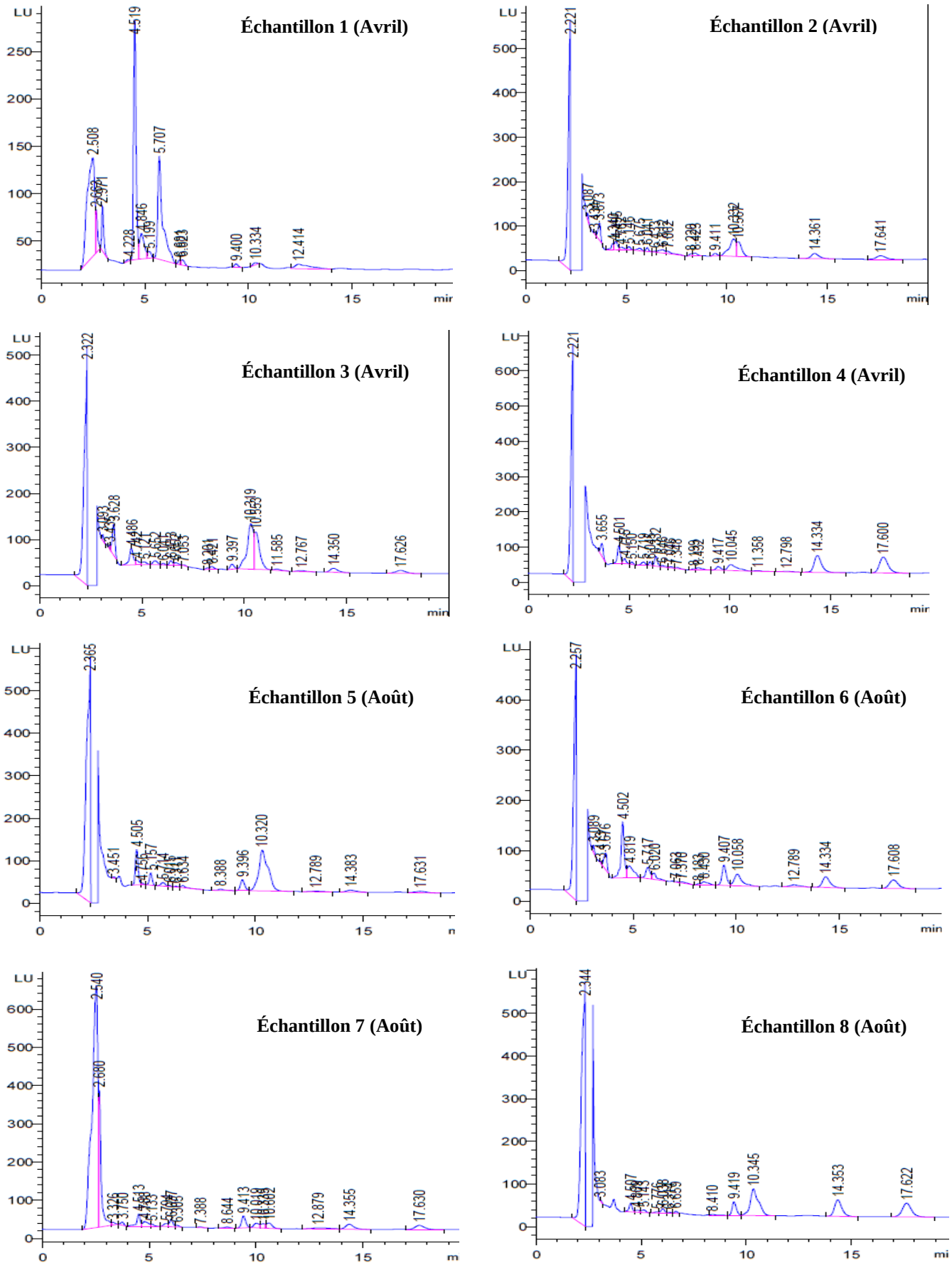


Figure A3 : Chromatogrammes CLHP des tocophérols des lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*

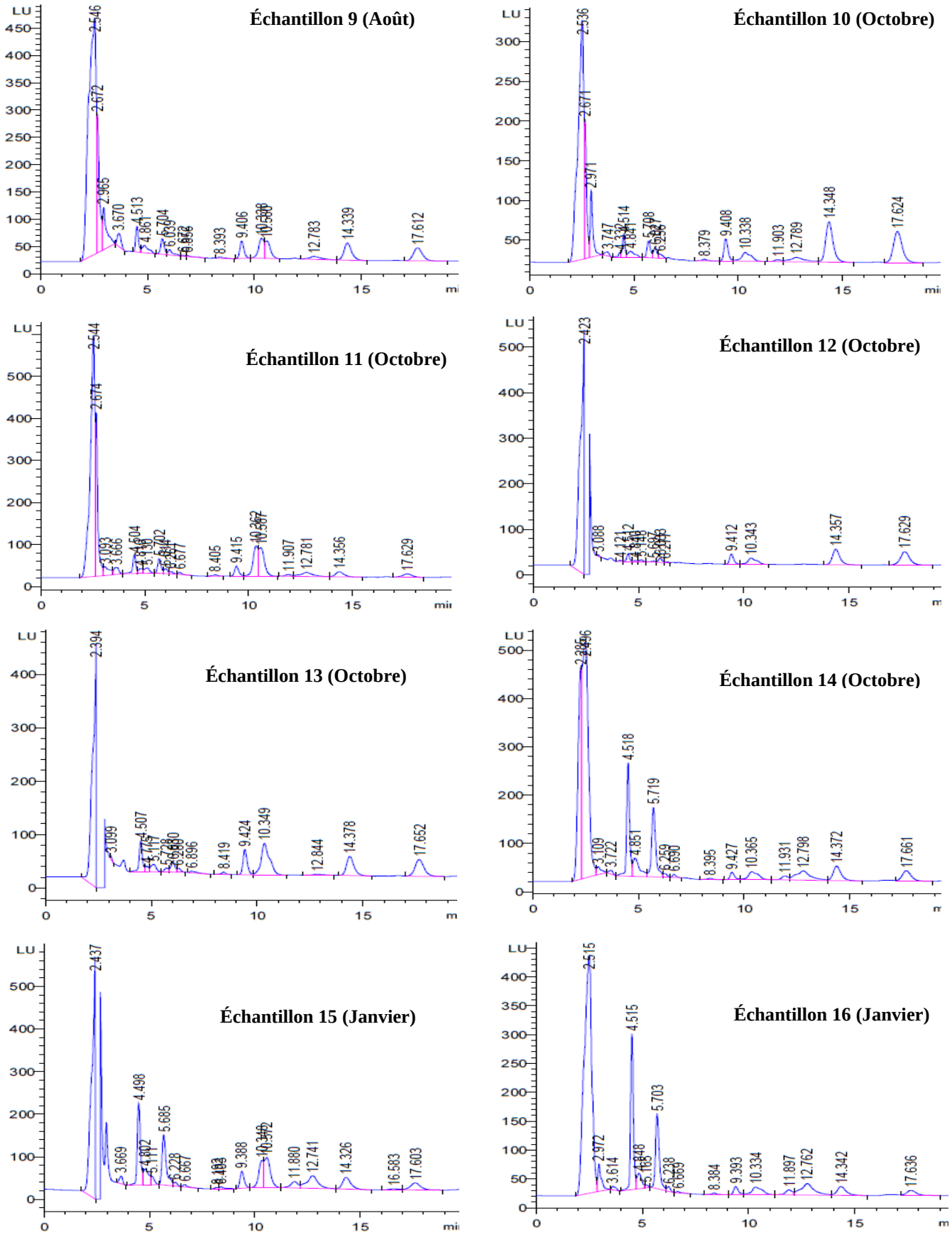


Figure A3 (suite) : Chromatogrammes CLHP des tocophérols des lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*

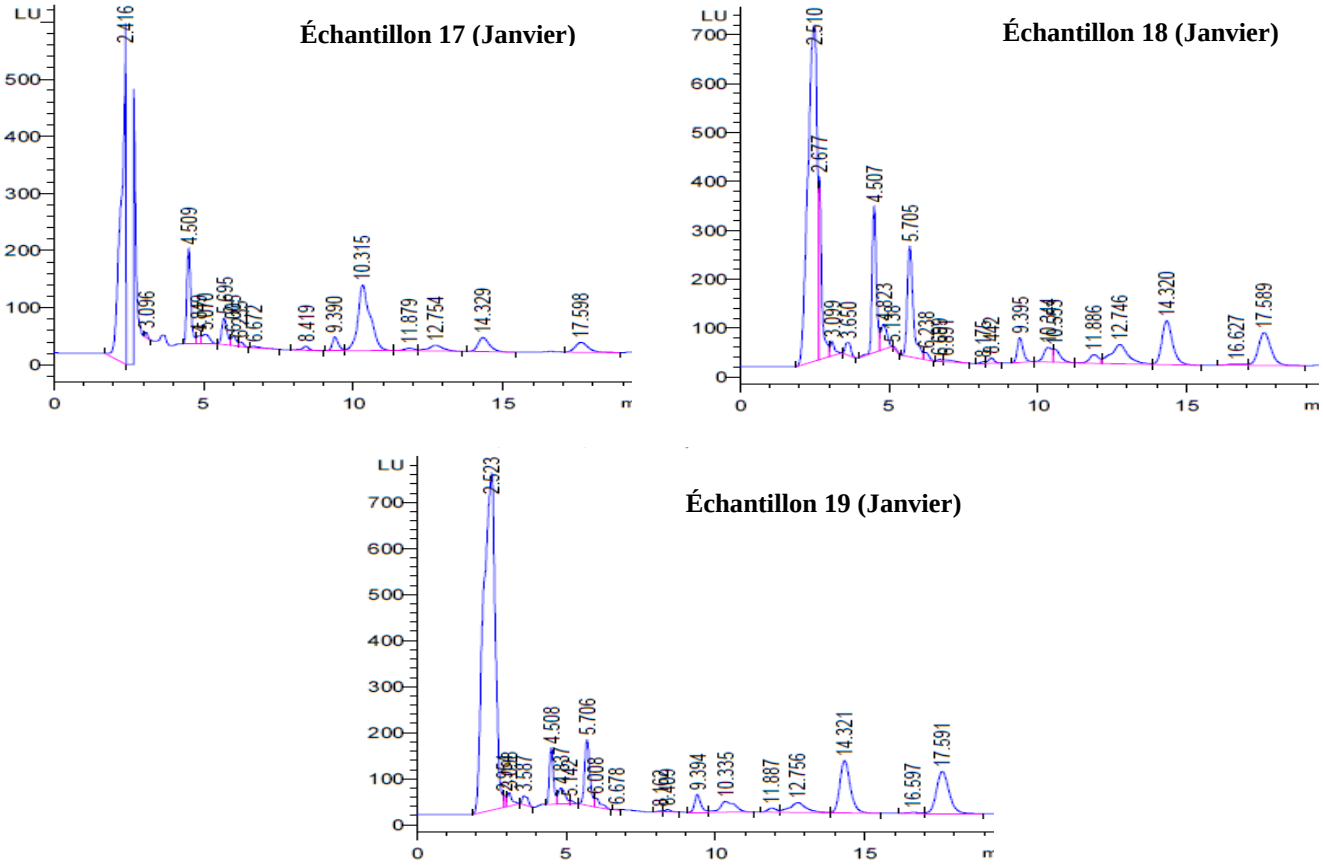


Figure A3 (suite) : Chromatogrammes CLHP des tocophérols des lipides étudiés de *Pistacia lentiscus*

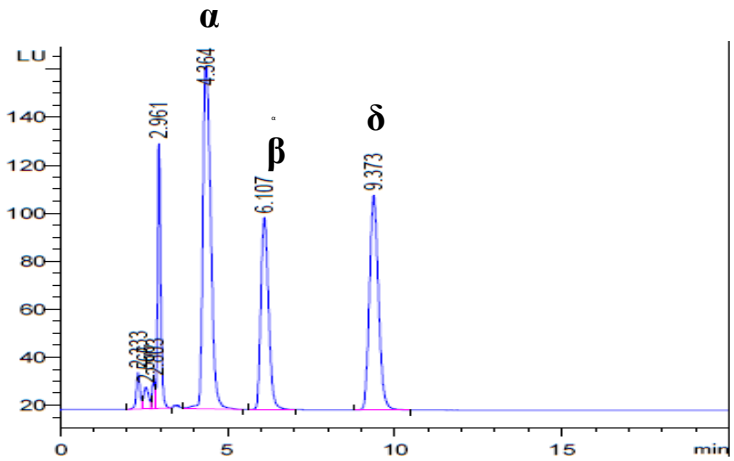


Figure A4 : Chromatogramme CLHP des tocophérols standards

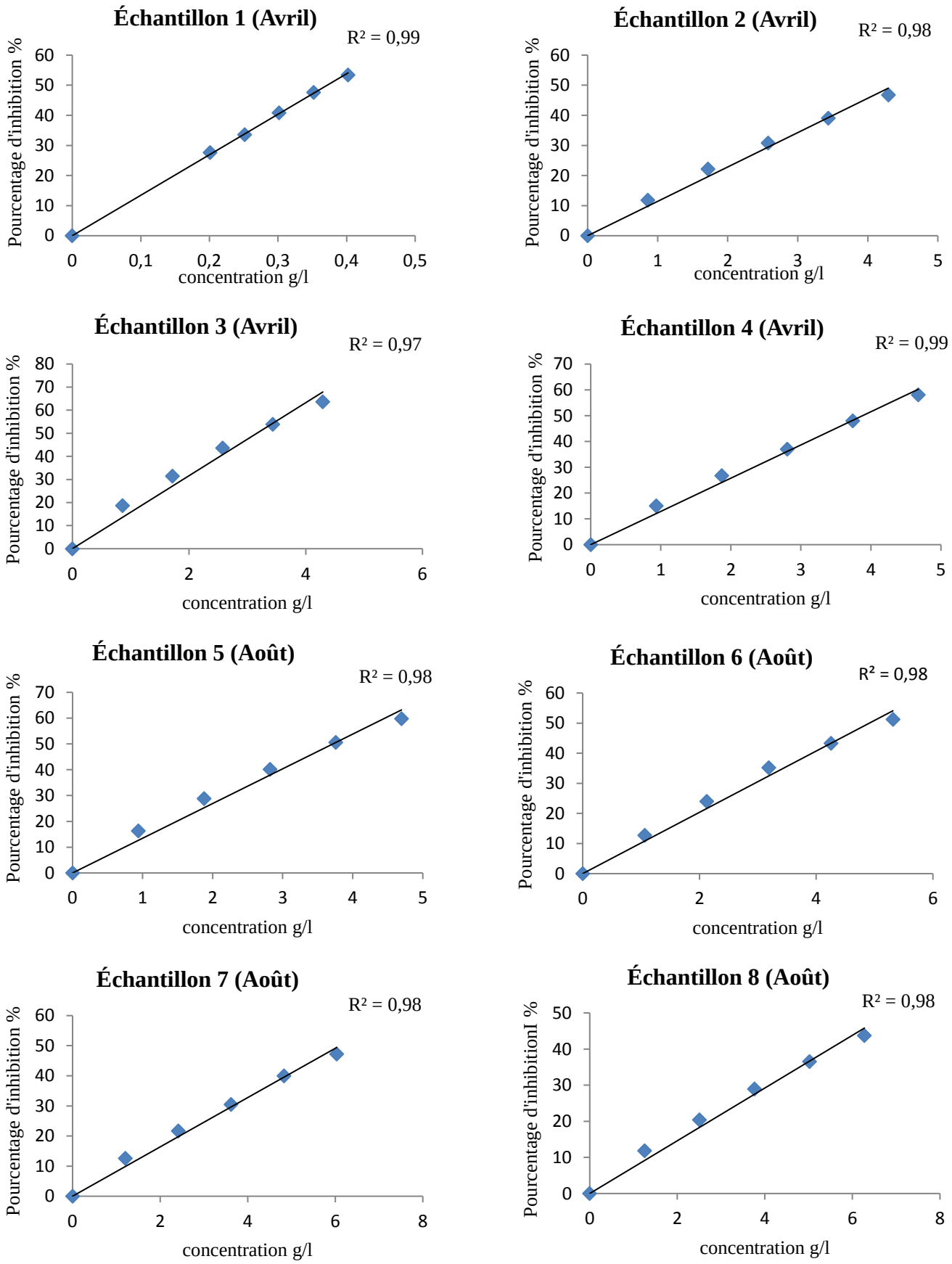
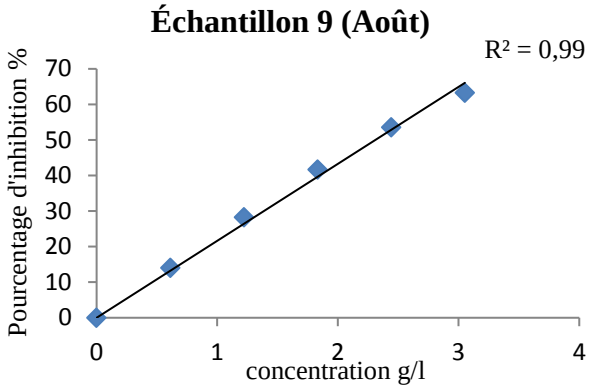
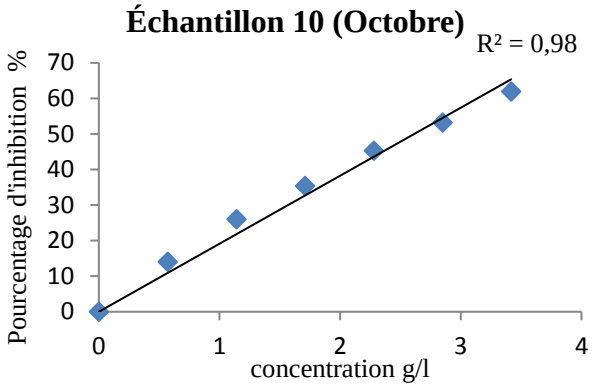
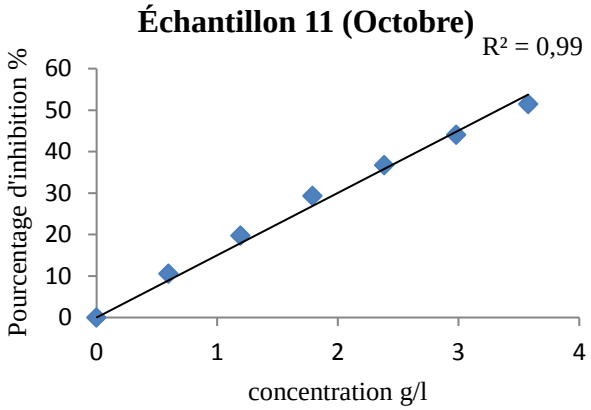
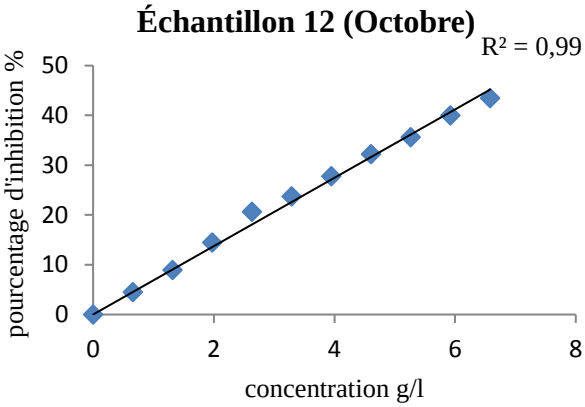


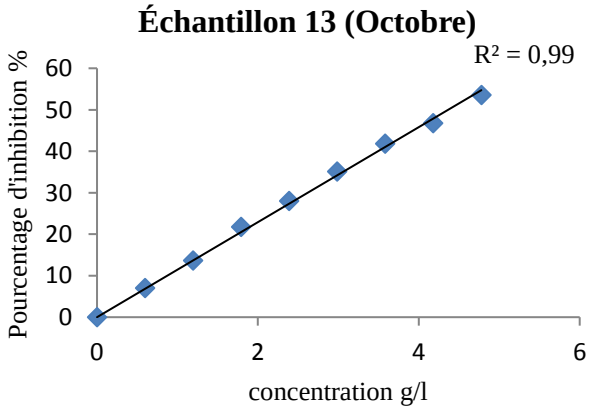
Figure A5 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH











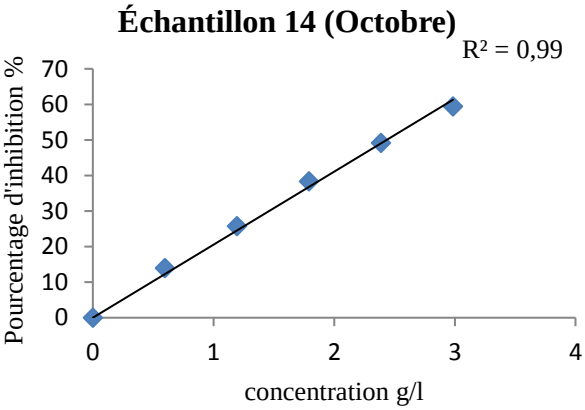


Figure A5 (suite) : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du DPPH

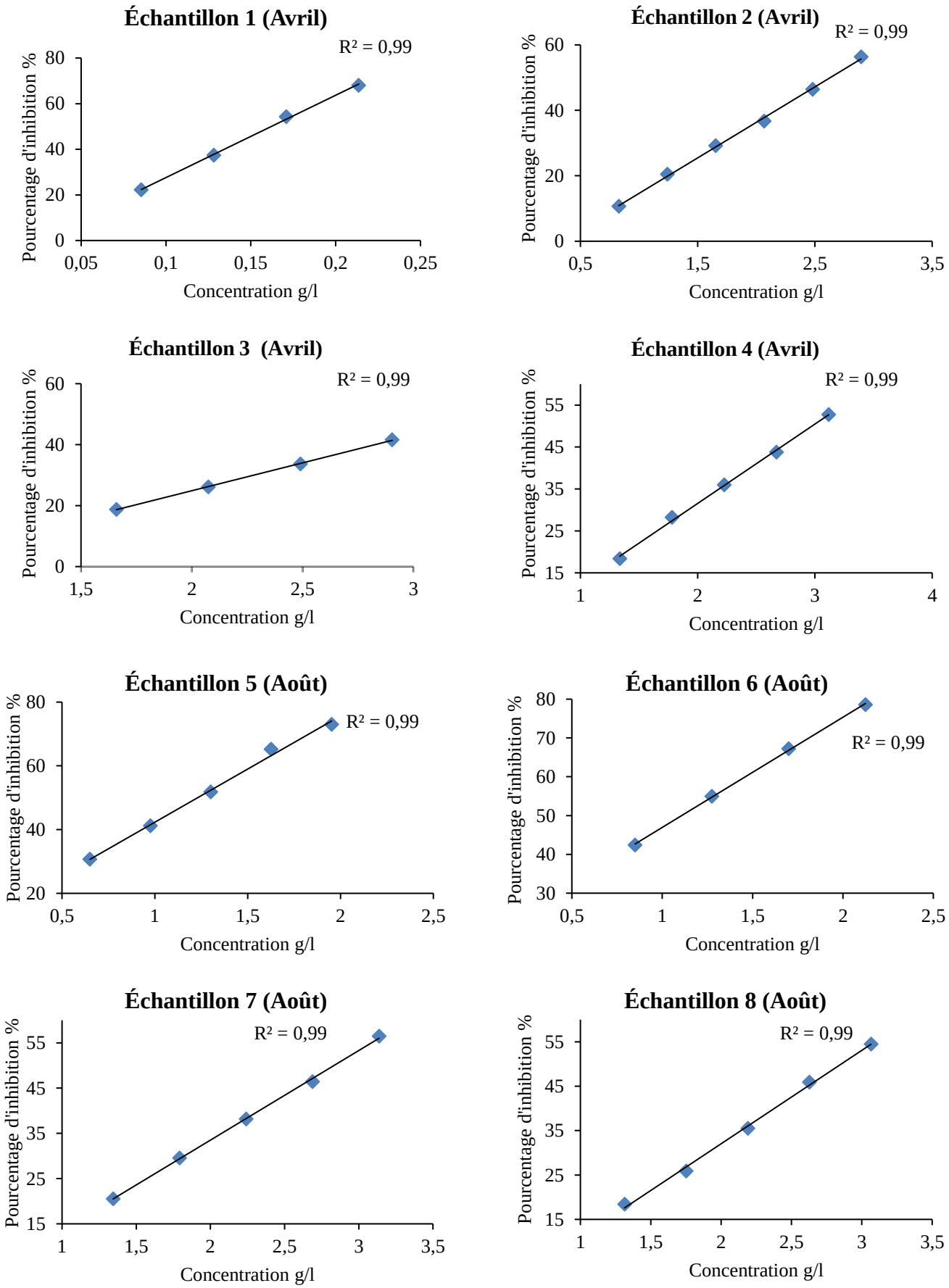


Figure A6 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du β-carotène

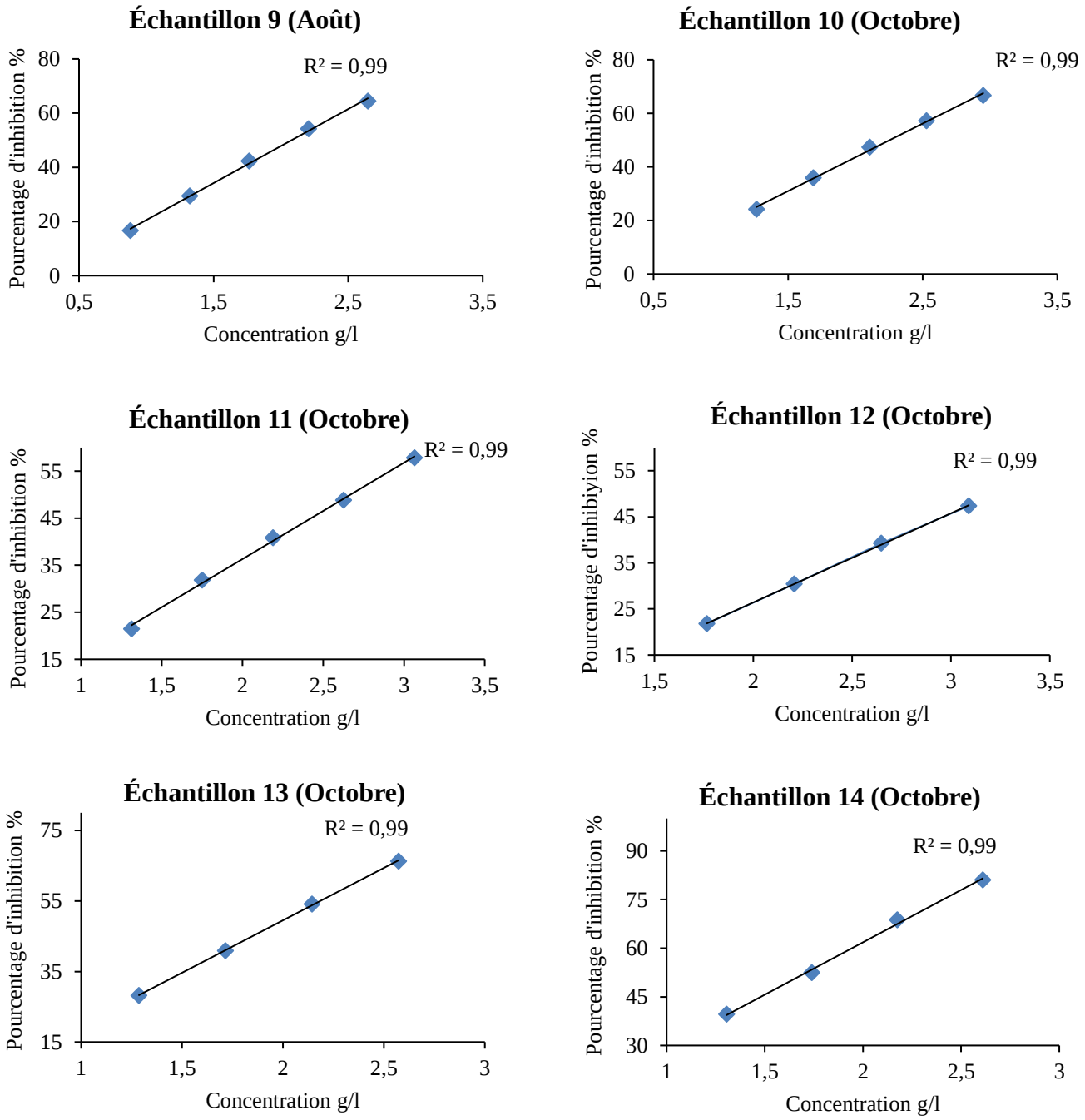


Figure A6 (suite) : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits lipidiques dans le test du β-carotène

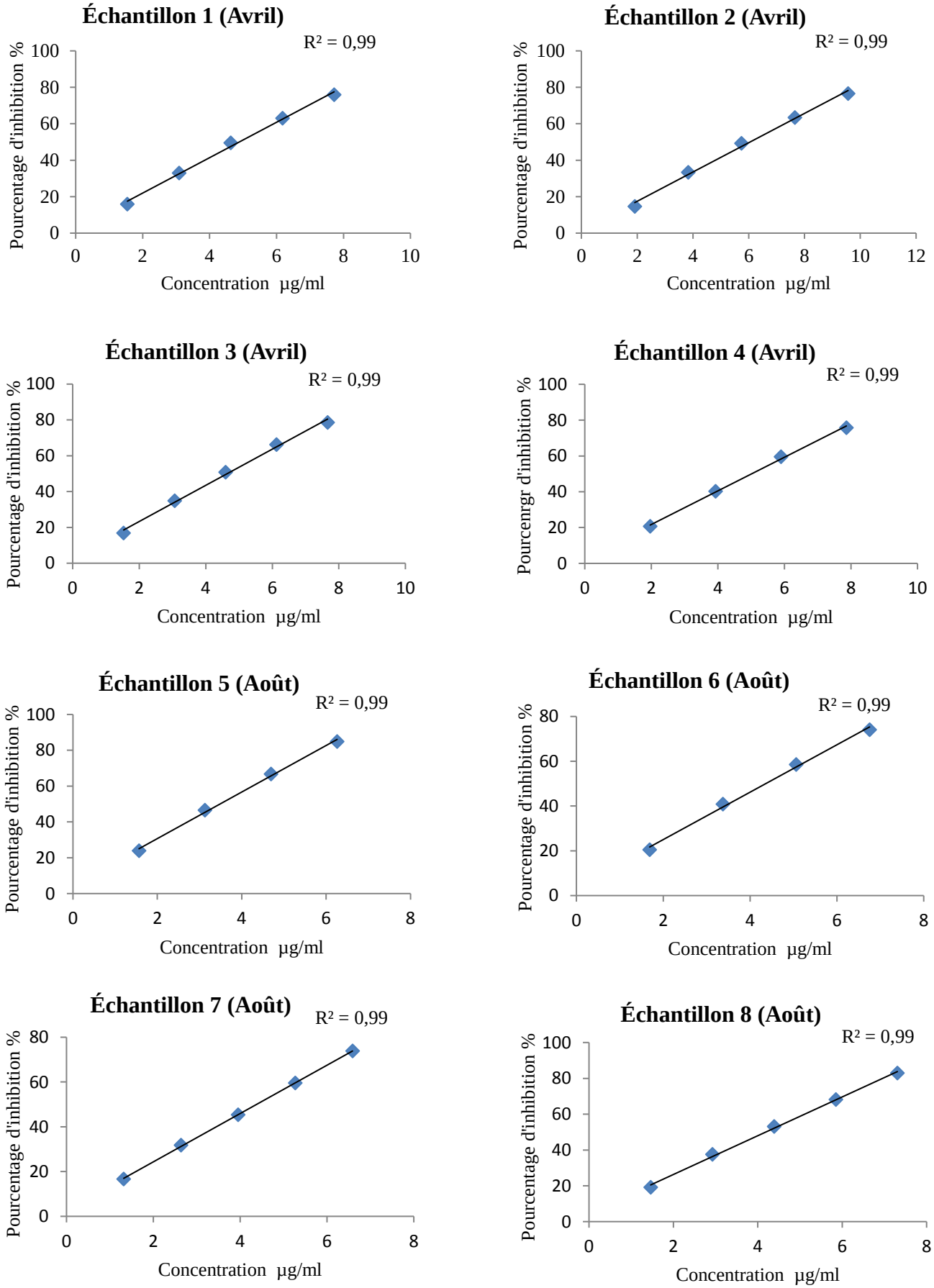
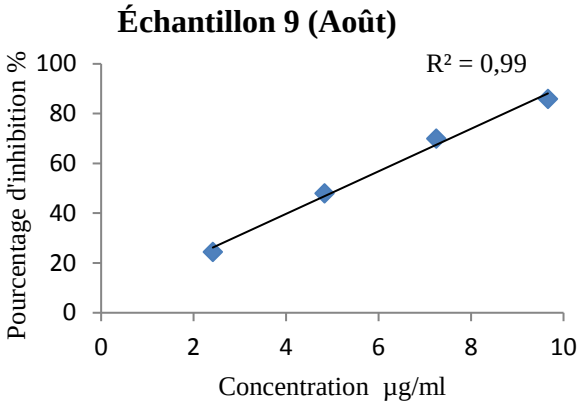
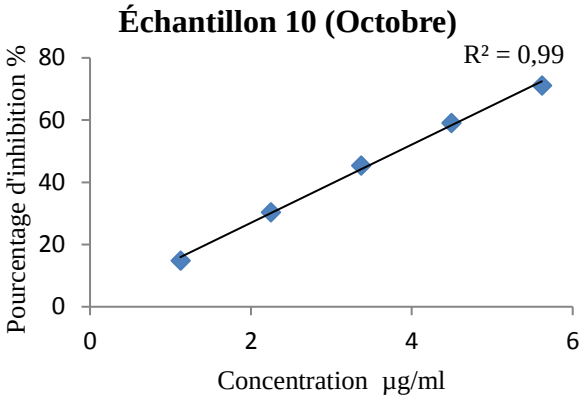
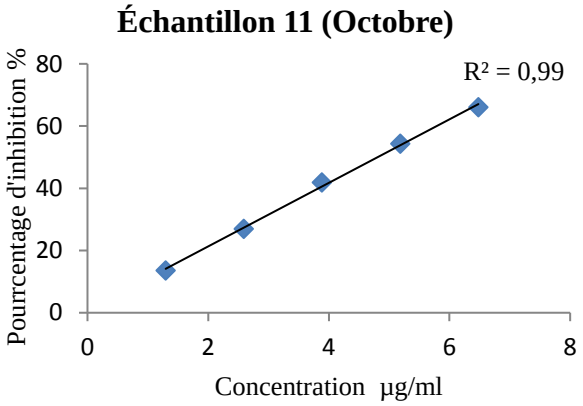
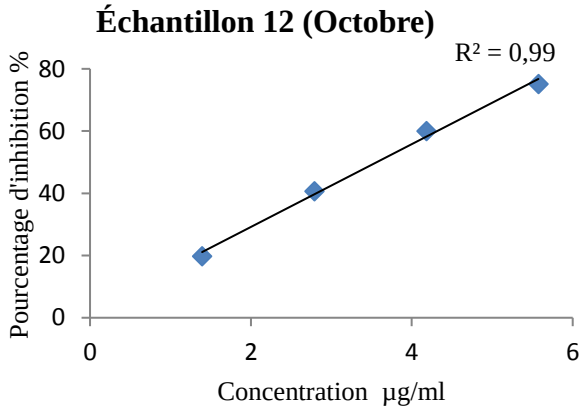


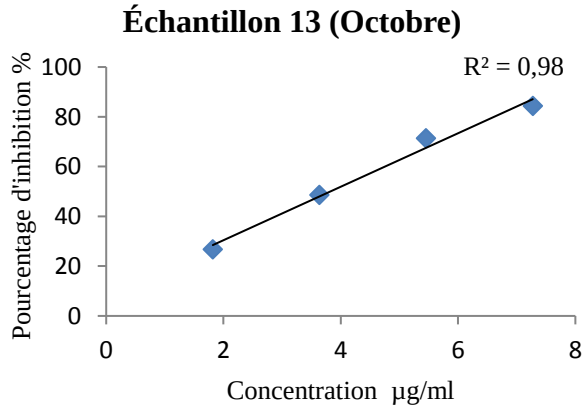
Figure A7 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du DPPH











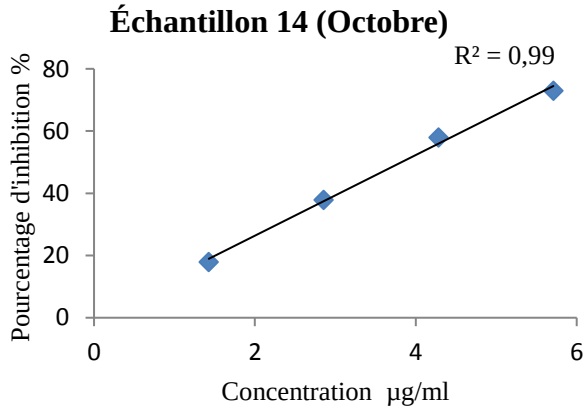


Figure A7 (suite) : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du DPPH

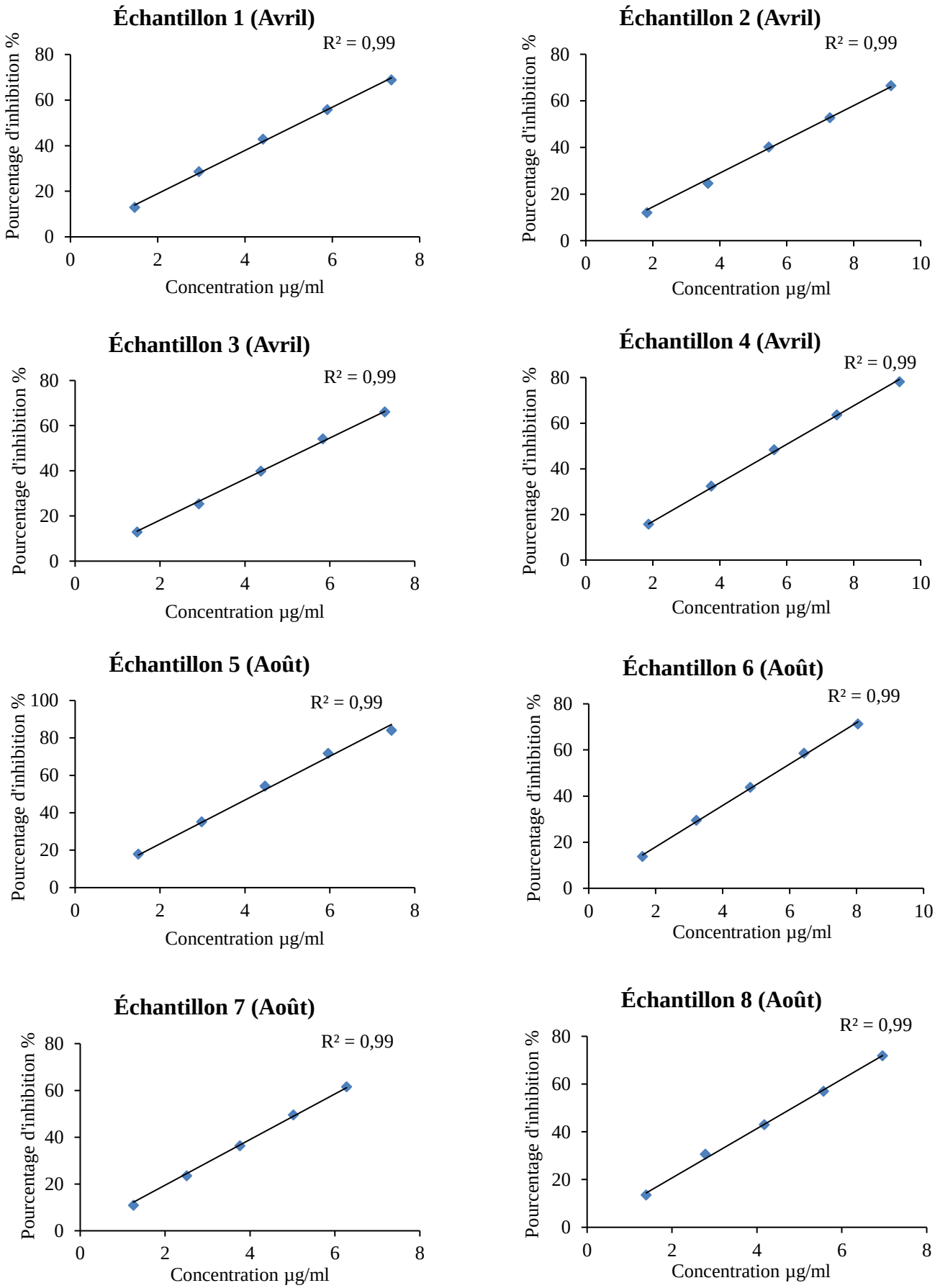
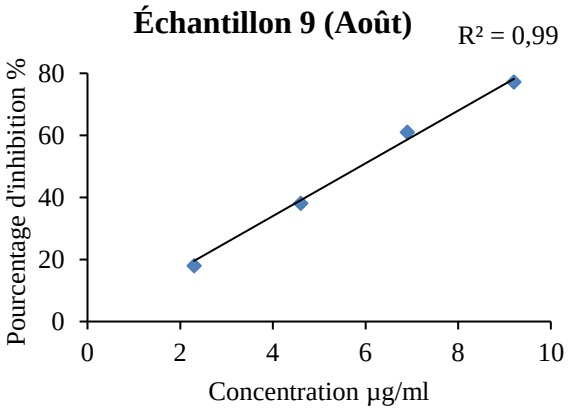
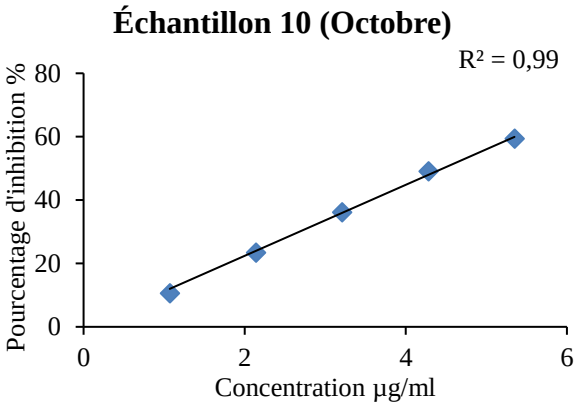
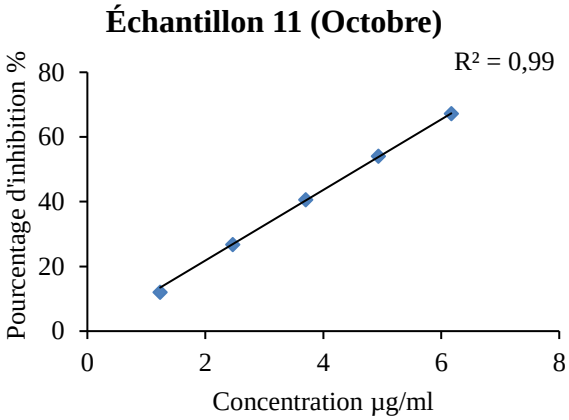
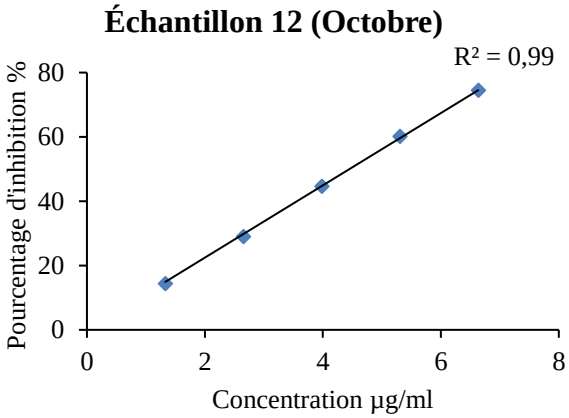


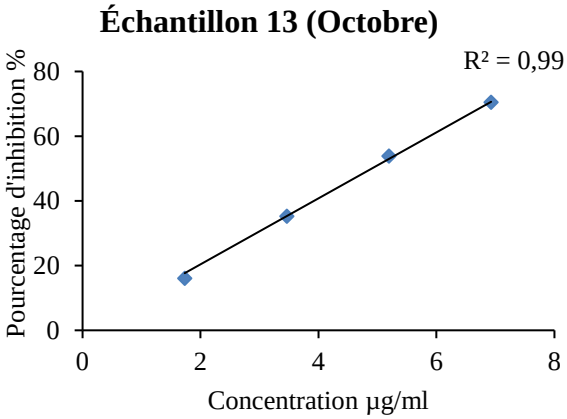
Figure A8 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du FRAP











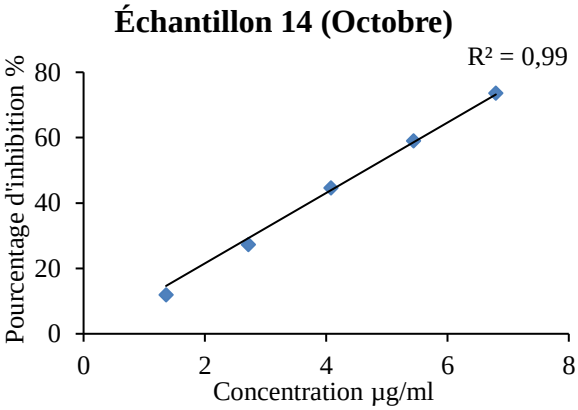


Figure A8 (suite) : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test du FRAP

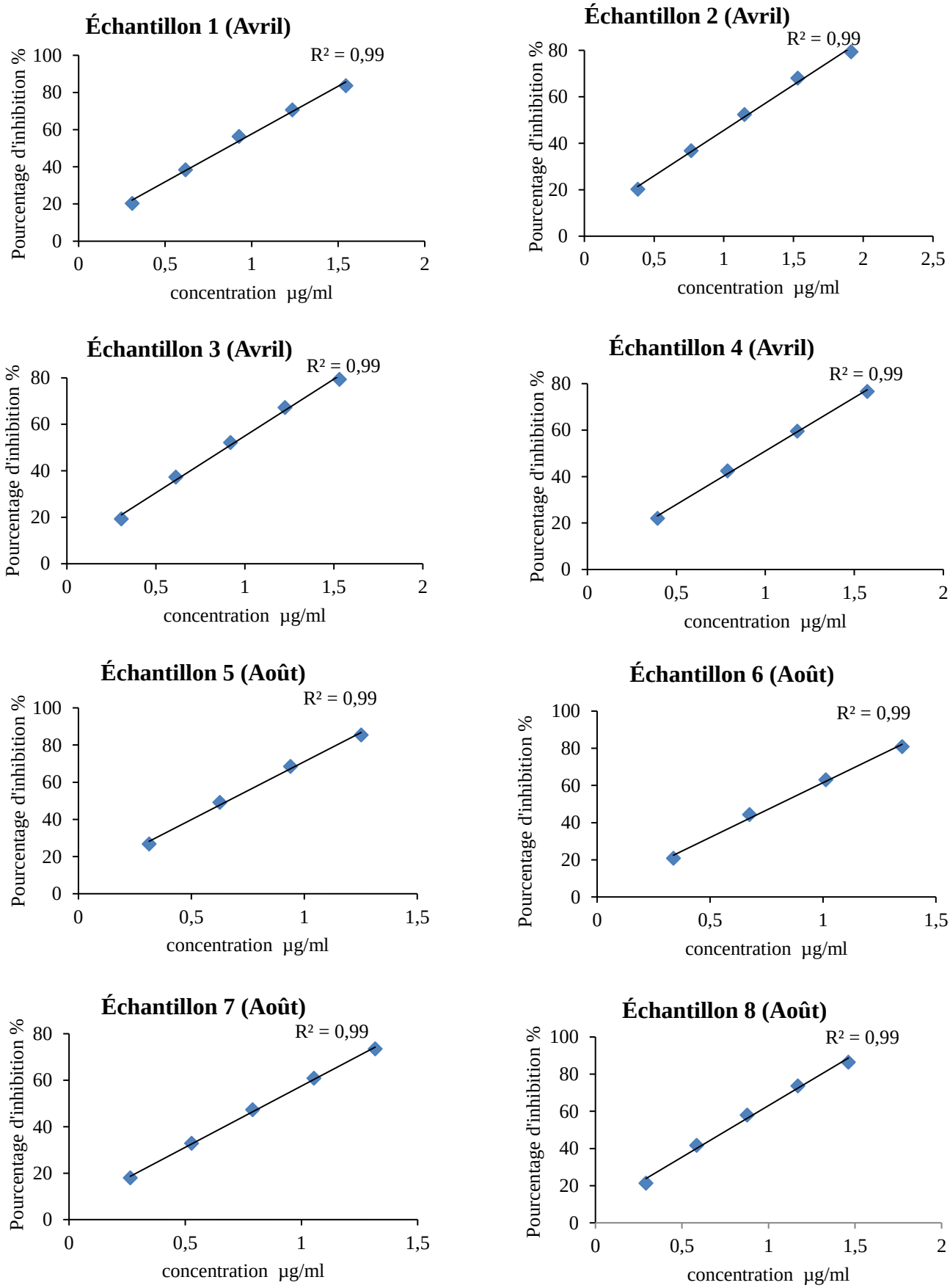
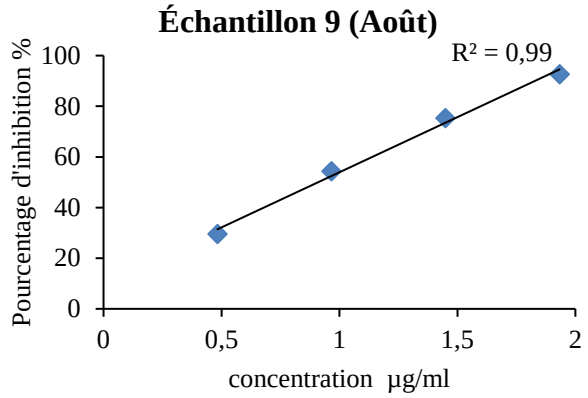
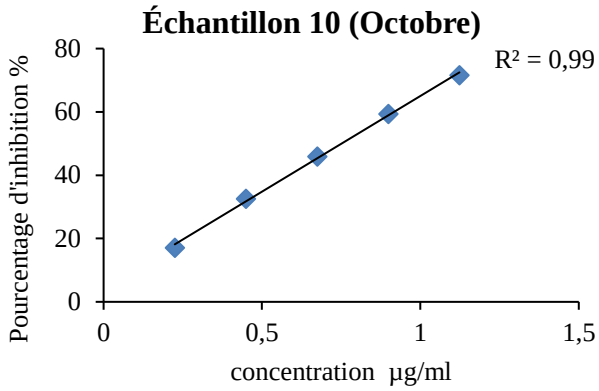
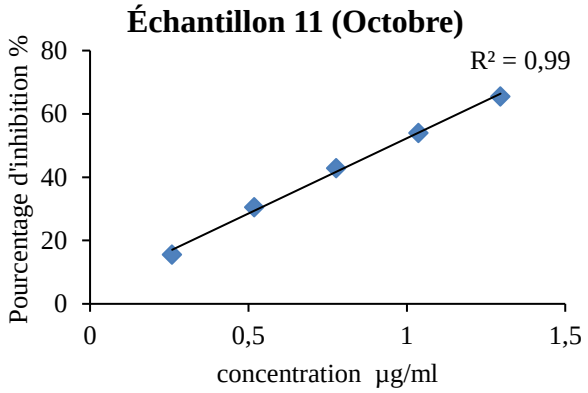
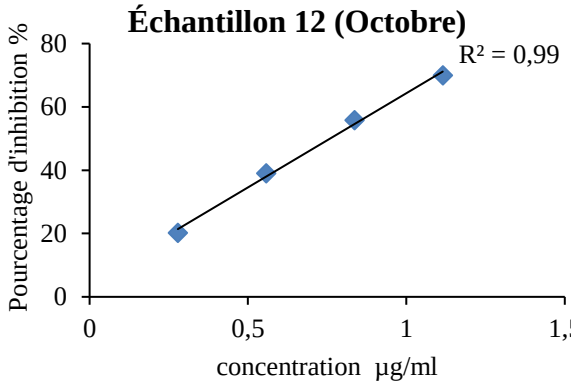


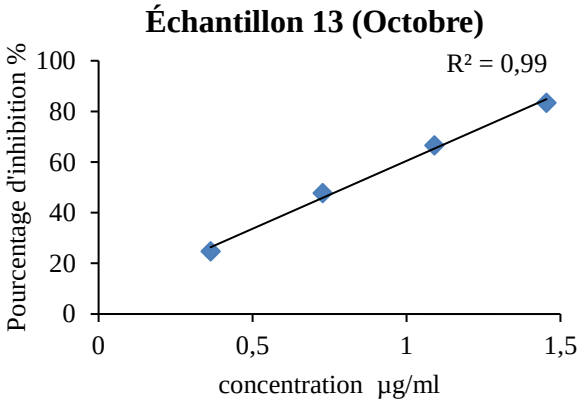
Figure A9 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test de l'ABTS











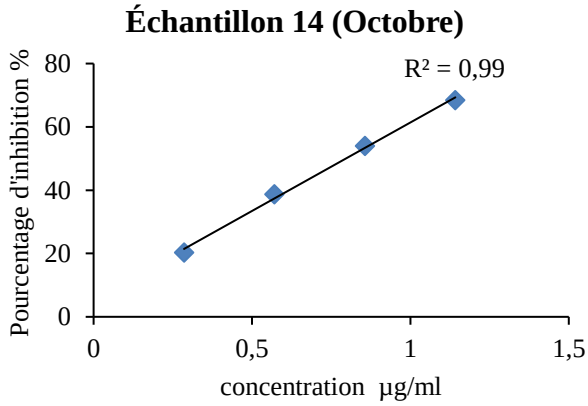


Figure A9 (suite) : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits phénoliques dans le test de l'ABTS

Publication

et

communication

Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism 11 (2018) 199–215
DOI:10.3233/MNM-18198
IOS Press

Variability of the chemical compositions of fatty acids, tocopherols and lipids antioxidant activities, obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria

Mohamed Harrat[a,b], Mohamed Benalia[a], Nadhir Gourine[a,*] and Mohamed Yousfi[a]
[a]*Laboratoire des Sciences Fondamentales (LSF), Université Amar Télidji, Laghouat, Algérie*
[b]*Laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (LVPRS), Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière, Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Ouargla, Algérie*

Received 20 January 2018
Accepted 27 March 2018

AUTHOR COPY

Abstract.
BACKGROUND: One of the objectives of food industry is to seek new resources of oil that preferably presents nutritional values. For human health, fats and particularly vegetable oils are considered as an important source of energy when glucose is not available. In addition, the search for effective, natural compounds with antioxidant activity has been intensified in recent years to replace the synthetic products.
OBJECTIVE: The aim of the present work was to determine the fatty acids profile (and variability) of the lipid fractions extracted from five different populations of the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria. In addition, the antioxidant activities of the lipidic fractions were also determined.
METHODS: The chemical compositions of tocopherols were also analyzed by HPLC for the first time for this plant part. The chemical percentage variability (presence of two main distinguished clusters) of the fatty acids was discussed using statistical analysis methods (Agglomerative Hierarchical Clustering "AHC" and principal component analysis "PCA"). The antioxidant activity of the dewaxed lipid fractions were investigated *in vitro* using two different assays: DPPH (*1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl*) free radicals scavenging activity and β-carotene bleaching test.
RESULTS: For the overall samples, the main saturated fatty acids components were capric acid (C10:0 = 2.49–13.88%), myristic acid (C14:0 = 4.71–9.12%) and palmitic acid (C16:0 = 5.31–9.03%). Alternatively, the main unsaturated fatty acids were oleic acid (C18:1w9 = 3.42–4.85%), linoleic acid (C18:2w6 = 10.94–16.99%) and most importantly α-linolenic acid (C18:3w3 = 20.92–48.92%), which is known for its multiple dietary, pharmaceutical and clinical benefits.
CONCLUSION: The results of fatty acids methyl esters identification using GC and GC-MS showed a clear variability in the composition of fatty acids. The main result of this study illustrate the nutritional potential (richness in MUFA such as C18:1w9, presence of essential fatty acids such as C18:2w6 at all the stages of maturation, richness in omega-3 fatty acids such as C18:3w3. of the oil of *P. lentiscus* leaves, which can provide opportunities for rational exploitation for medicinal

*Corresponding author: Nadhir Gourine, Laboratoire des Sciences Fondamentales (LSF), Université Amar Télidji, Laghouat, BP. 37G, (03000) Laghouat, Algeria. Tel./Fax: +213 92 00 66; E-mail: n.gourine@lagh-univ.dz.

ISSN 1973-798X/18/$35.00 © 2018 – IOS Press and the authors. All rights reserved

purposes and in the food industries. Regarding tocopherols HPLC analysis, the samples were rich in α-tocopherol (58.51–89.17% of the total tocopherols identified). Finally, and for antioxidant activity measured by β-carotene assay, the obtained values suggested good antioxidant activities when compared with antioxidants of reference.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, leaves, fatty acids, C18:3w3, tocopherols, antioxidant activity

1. Introduction

The genus of *Pistacia* has garnered pharmaceutical attention in recent times. In this regard, the ethnomedicinal, phytochemistry, biological potencies, and risks of *Pistacia* genus have been reviewed [1]. Although the phytochemical composition of the genus of *Pistacia* has been extensively studied, there are still many new recent reports focusing in the health curative effect of their extracts [2–11]. Moreover, their nutritional value (especially for Pistachios "*Pistacia vera*") is still of interest [12, 13].

Pistacia lentiscus L. (lentisk) is an evergreen bush (shrub or tree) of the Anacardiaceae family that can reach 3 m in high, belonging to the Anacardiaceae family that consists of more than eleven species. It is largely distributed in "extreme" ecosystems of the Mediterranean countries and has a large geographical and bioclimatical distribution, extending from the humid to the arid areas [14]. In Algeria, the tree is widespread in forest alone or associated with other tree species such as terebinth, olives and carob, in all coastal areas or in seaside stony areas [15]. *P. lentiscus* (also known in Algeria under the name of "Dharou") is extensively used in folk medicine by rural populations in Algeria. Algeria is home to at least 3164 species of vascular plant, of which 7.9% are endemic. *P. lentiscus* is important because of its medicinal value [16].

P. lentiscus is used for various medicinal properties. The extract of the different parts of the plant shows various activities like anti-inflammatory, antimicrobial, antiatherogenic and antimutagenic, antioxidant, antifungal, lipid lowering, hepatoprotective, anticancer, antiasthmatic, anthelmintic, wound healing, hypotensive, antiarthritic, antigout activity and also in the treatment of functional dyspepsia [17]. The essential oil obtained from the gum/resin of *P. lentiscus* L. is commonly called mastic oil, whereas the oil obtained from the leaves is named lentisk oil. In human medicine, aqueous extracts of leaves and young twigs are prepared as infusions or decoctions. Leaves and young twigs are used "as is" in veterinary medicine. Extracts exhibit a high concentration of phenolics and terpenes of varying composition [18]. The leaves of *P. lentiscus* are extensively used in folk medicine for the treatment eczema, diarrhoea, and throat infections, and as a potent antiulcer agent [19].

Actually, the food safety concern on human health resulting from excessive employment of synthetic additives have prompted the development of new sanitation methods to decrease the negative impact on human health and environment. One such possibility is the use of essential oils and plants products as antibacterial additives. Fixed oils are also known for their antimicrobial power related to fatty acids and phenol compounds. *P. lentiscus* L. seed oil is one of edible oils widely used and appreciated, for its special taste, by local population in Algerian and Tunisian forest areas [20].

Previous reports on the chemical composition of the fatty acids of *P. lentiscus* dealt mainly with fruits part [21–30]. Instead, other reports were focusing on the sterols analysis from the fruits [21, 30, 31]. For the tocopherols previous reports were interested in the fruits part [26, 30]. Regarding the leaves part, a previous report on *P. lentiscus* var. *chia* established a colorimetric quantification of α-tocopherol of the leaves by TLC-densitometry and colorimetry [19]. When considering the antioxidant activity of the fatty acids, the studied parts were those of fruits [27].

According to literature, and at best of our knowledge, there are only few reports dealing with the identification of the fatty acids of the leaves of *P. lentiscus*; beside an old reports published in German language, in which only seven main components were identified (C14, C16 and C18) [32], some recent report dealt with major fatty acid compositions of the oil extracts from different parts of this tree: seeds, fruits, resins, root, leaf and stem [33]. Additionally, some other recent studies from Tunisia dealt with the influence of the harvest date on

AUTHOR COPY

fatty acids composition of *P. lentiscus* edible oils [27] and investigated also the effect of the growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid contents obtained from the fruits of *P. lentiscus* [26]. Nevertheless, no reports were found on the sterols contents of the leaves of *P. lentiscus*, nor their tocopherols, except a colorimetric quantification of α-tocopherol as mentioned above [19]. The aim of the present work was to determine the fatty acids profile of the lipid fractions extracted from five different populations of the leaves of *P. lentiscus* L. growing in Algeria. Most importantly and for the first time for this plant part, the composition of tocopherols were determined by HPLC. In addition, the total tocopherols and total sterols were also quantified using colorimetric methods. Furthermore, the quantification of waxes in lipid fraction was also determined; and finally, the antioxidant activity of the lipid fractions were investigated *in vitro* for the first time, using two different and complementary methods: DPPH (*1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl*) free radicals scavenging assay, then β-carotene bleaching test.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Petroleum ether, anhydrous sodium sulfate, sodium and ascorbic acid were purchased from AnalaR NORMAPUR Prolab. Chloroform, absolute ethanol, activated charcoal (activated carbon), *n*-hexane, sulfuric acid, acetic acid, ferric chloride, dichloromethane, α-tocopherol (Vitamin E) and DPPH$^{\bullet}$ (*1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl*) were obtained from Sigma-Aldrich (Prochima Sigma, Tlemcen, Algeria). Butylated hydroxyanisole (BHA), was purchased from Fluka chemie (Prochima Sigma, Tlemcen, Algeria). *ortho*-phenanthroline and acetic anhydride were obtained from Merck (Merck S.A.R.L. Algiers, Algeria) and cholesterol from UCB Pharma (SARL E-SAHTI, Algiers, Algeria). All reagents and chemicals used were of analytical grade.

2.2. Collection of plant material

Leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Five different tree samples) were randomly collected in January 2016, from the location of Magtaâ Kheïra (town of Tipaza), located in north of Algeria, at west of the capital Algiers (36°39'34.43"N and 2°48'37.02"E with an altitude of 73 m). The leave samples of the plants were air-dried in the shade at room temperature for 15 days. A voucher specimen (PLL-TMK/01/2016) was deposited in the herbarium of the Fundamental Sciences Research Laboratory at Laghouat University.

2.3. Lipid extraction

The air dried leaves of *Pistacia lentiscus* L. were milled to obtain a fine powder using a coffee grinder. The lipids were extracted using a Soxhlet apparatus with petroleum ether as solvent for a period of 12 hours. The lipid extract was collected in a flask and subsequently dried over anhydrous sodium sulphate Na_2SO_4. After filtration, the lipid extract was transferred to a rotary vacuum evaporator at 40°C in order to fully dry the extract.

The chlorophyll removal was performed by reflux, using chloroform as solvent in the round-bottomed flask containing lipids and activated carbon for 2 hours. The ratio of activated carbon relative to initially air dried leaves was 1:5 (mass). The extract fraction was cooled to room temperature then filtered. At the end, the chloroform solvent was removed from the filtered solution in Rotavap under reduced pressure at 40°C.

The extracted lipid fraction was weighed to determine the total lipid content per dry weight of the plant, and then stored at +4°C for further analysis.

AUTHOR COPY

2.4. Fatty acids (FAs) composition

The FAs composition of the oils was determined after having converted the fatty acids FAs into fatty acids methyl esters (FAMEs) then analysed by gas chromatography (GC). The methyl esters were prepared by the following procedure: Lipids (0.5 g) were refluxed for 20 min in 10 mL of 2% sodium methylate (NaOMe), and then 20 mL of water was added. The fatty acid methyl esters (FAMEs) were extracted by *n*-hexane and washed with distilled water. The combined extracts were dried over anhydrous sodium sulfate Na_2SO_4 and evaporated under vacuum, then analysed by capillary gas chromatography.

2.5. Chromatographic analysis of FAMEs

The analyses of the FAMEs were performed in a gas chromatographic GC apparatus (model CP-Varian 3800). This model was equipped with a FID detector and DB-Wax capillary column (60 m × 0.32 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness). 2 μL of the sample was injected in the Split injection mode (50:1). Oven temperature was programmed using four different ramps. The temperature started at 40°C, held for 0.5 min, then raised at a rate of 25°C/min to 195°C, then raised at a rate of 3°C/min to 205°C, then raised at a rate of 8°C/min to 230°C, then raised at a rate of 20°C/min to 260°C, and finally kept for 5 min. The injector temperature was set at 250°C and the detector temperature at 260°C, the flow rate of carrier gas (helium) was 1 mL/min. Identification and quantification of FAMEs was accomplished by comparing the retention times of peaks with those of pure standards purchased from Sigma and analysed under the same conditions. The results were expressed as total area percentage of identified individual fatty acids in the lipid fraction.

2.6. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) analysis of FAMEs

The GC-MS analysis was performed on an AGILENT 6890 GC/CMSD 5973 equipped with a capillary column UB-Wax (30 m × 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness) and a 70 eV EI quadrupole detector. Helium was the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. Injector and MS transfer line temperatures were set at 250°C and 220°C, respectively. Column temperature was programmed same as the gas chromatography. 1 μL of samples were injected using split mode (50:1).

2.7. Dewaxing of lipids

Prior to the subsequent determinations: antioxidant activity, quantification of total sterols and total tocopherols, the lipid fractions were dewaxed by the following procedure. Crude lipids were first dissolved in absolute ethanol, and then kept in refrigerator for a period of 24 hours in order to crystallize the waxes fractions; after that, the solution containing frozen waxes particles was filtered and finally, the solvent extracts were eliminated under vacuum pressure in rotary evaporator at 40°C.

2.8. Tocopherols analysis by HPLC

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 × 4.6 mm internal diameter, 5 μm film thickness, 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 25°C. Commercial standard (α-Toc) and a mixture (α-Toc, β-Toc, γ-Toc and δ-Toc) were co-injected with samples for the identification of tocopherol isomers. Prior to HPLC analysis, 35 mg of lipids fraction was diluted with 1 mL *n*-hexane and 20 μL of the solution was injected.

AUTHOR COPY

2.9. Determination of the total tocopherols content of P. lentiscus leaves

The total tocopherols content of the lipids was determined by the spectrometric method described in reference [34] with a few modifications. This method is based on the redox reaction between tocopherols and ferric iron (Fe^{3+}) which is reduced to ferrous iron (Fe^{2+}). The latter, in the presence of specific reagents such as *ortho*-phenanthroline (1,10-phenantroline), forms a stable red-orange complex with a very high molar extinction coefficient at 510 nm.

From the standard solution of α-tocopherol in dichloromethane we prepared aliquot solutions with different concentrations. To 2 mL of each solution was added 1 mL of 1,10-phenantroline reagent (0.4% in absolute ethanol), then 1 mL of ferric chloride reagent (0.12% in absolute ethanol) was added and the mixture was shaken for 5 min. The absorbance of the mixture was read at 510 nm. A blank was run, using 2 mL of dichloromethane, 1 mL of 1,10-phenantroline reagent and 1 mL of ferric chloride reagent. The above described procedure was followed by using sample solutions of lipids (dewaxed lipids). The total tocopherols in the dewaxed lipids were calculated from the regression equation of the standard curve.

The results were expressed as α-tocopherol equivalent in mg/(g of lipids).

2.10. Determination of the total sterols content of P. lentiscus leaves

This method is based on spectrophotometric absorption according to the Liebermann-Burchard test (or acetic anhydride test) [35, 36], based on a specific coloured reaction of the 3 β-hydroxysteroids having a double bond in position 5-6. The sterols form a stable complex with the β-acetic anhydride in an acid medium which absorbs in the visible at a wavelength of 550 nm (the Liebermann spectral reagent consists of 60 mL of acetic anhydride and 10 mL of concentrated sulfuric acid and 30 mL of acetic acid).

From a chloroformic solution of cholesterol with a concentration of 1 g/L, we have prepared a series of solution dilutions in order to plot a calibration curve linking the optical density to the concentration. 1 mL of each diluted solution was mixed with 2 mL of the Liebermann reagent, then kept for 25 min in order to allow reagent colour to fully develop and stabilize.

The above described procedure was followed by using sample solutions of lipids (dewaxed lipids). The total sterols in the dewaxed lipids were calculated from the regression equation of the standard curve. The results were expressed as cholesterol equivalent in mg/(g of lipids) and in μg/(g leaves "d.w.").

2.11. Antioxidant activity

2.11.1. Radical-scavenging activity (DPPH assay)

The antioxidant activity was determined by DPPH method, which is based on the evaluation of the free-radical scavenging capacity. Briefly, 0.5 mL of the sample (dewaxed lipids) diluted in absolute ethanol was mixed with 0.5 mL of 250 μM $DPPH^{\bullet}$ prepared in absolute ethanol. The reaction mixture was well shaken and incubated in the dark at room temperature for a period time of 30 min. The absorbance of the resulting solution was read at 517 nm against a blank. The antiradical activity was expressed as IC_{50} (mg/mL): the concentration required to cause 50% initial $DPPH^{\bullet}$ inhibition. The inhibitory percentage of $DPPH^{\bullet}$ was calculated according to the following equation:

$$I\%\ (Inhibition\ \%) = \left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right) \times 100\right]$$

Where A_0 and A are the absorbance values of control and of the tested sample, respectively.

Antioxidants of reference (Vitamin E and ascorbic acid) were used for comparison. All experiments were performed in triplicate.

AUTHOR COPY

2.11.2. Bleaching ability of β-carotene in linoleic system

The inhibition of β-carotene bleaching by the lipid fractions was determined according to slightly modified method described in literature [37].

A volume of 5 ml of dichloromethane solution of β-carotene at initial concentration of 0.1 mg/mL was added to a round flask containing 20 mg of acid linoleic and 200 mg of Tween 80. Dichloromethane was completely removed at 40°C under vacuum, then 50 mL of distilled water was slowly added and vigorously shaken. Aliquots (40 μL) of different solutions concentrations were added to 1 mL of β-carotene/linoleic acid emulsion. A control preparation was obtained by adding 40 μL of ethanol to 1 mL of β-carotene/linoleic acid emulsion. Absorbance of the preparations was measured at 490 nm before and after 2 h of incubation in a water bath at 50°C. Antioxidative activity (AA%) in percentages was calculated using the following formula:

$$AA\% = \frac{(As_{120} - Ac_{120})}{(Ac_0 - Ac_{120})} \times 100$$

Where:

Ac_0 is the absorbance of the control respectively measured before the incubation.

As_{120} and Ac_{120} are the absorbance of the test and the control respectively measured after 2 h of incubation.

Results were expressed in AA% corresponding to solutions concentrations of 2 mg/mL (relative to the 40 μL added). The results were also expressed as AA_{50}, the concentration providing 50% β-carotene bleaching inhibition. Vitamin E was used as positive control. All trials were performed in triplicate.

2.12. Cluster analysis

Cluster analysis was performed using Agglomerative Hierarchical Clustering AHC (Ward's technique) with Euclidean distance measure. The calculus was performed using a set of individuals composed of 5 different fatty acids samples (different plants from the region of Zeralda). The total number of adopted variables was 20 (representing simply the major identified components in all represented individuals, or the most influencing parameters that could make a difference *i.e.* some minor compounds).

2.13. Principal component analysis (PCA)

The principal component analysis was performed using both the same individuals and variables adopted for Agglomerative Hierarchical Clustering method.

3. Results and discussion

3.1. Lipid contents and fatty acids compositions of P. lentiscus leaves

The lipid contents and the fatty acids FAs composition of the *P. lentiscus* leaves are summarised in Table 1. The lipid contents were not the same for all studied samples; they were ranging from 1.94 to 4.12% upon dry matter. The content of lipids were very interesting since they are practically representative values when compared with those of other parts rich in oils (fruits) provided by literature. In fact, the maximum obtained yield value 4.12% was only about 3 to 8 times lower than the yields obtained by the fruits of *P. lentiscus* from Algeria reported by Charef et al. [29] in which they found 11.7% and 32.8% for red and black fruits, respectively. Moreover, the obtained yield was not far different from both of *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. in which they exhibited identical yields values of 9.0% (from the fruits parts), and were reported also by Charef et al. [29].

The results of gas chromatography GC and gas chromatography coupled to the mass spectroscopy GC-MS analysis of the fatty acids methyl esters FAMEs of *P. lentiscus* leaves are given in Table 1. The identification of the FAMEs showed some clear variability of the compositions of the five studied samples. For the overall

AUTHOR COPY

Table 1
Fatty acid compositions of the lipids fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Fatty acids	Composition (%)					Identification
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	
C10:0	2.49	**11.74**	**13.88**	3.18	2.57	GC, MS
C11:0	0.80	1.64	2.86	tr	tr	GC, MS
C12:0	0.87	2.42	2.16	tr	tr	GC, MS
C13:0	0.94	1.32	tr	tr	1.62	GC, MS
C14:0	**6.43**	**8.19**	**7.38**	**4.71**	**9.12**	GC, MS
C14:1w5	tr	tr	1.77	tr	tr	GC, MS
C15:0	0.73	1.32	1.54	tr	1.35	GC, MS
C16:0	**7.49**	**8.05**	**6.9**	**5.31**	**9.03**	GC, MS
C17:0	0.54	tr	tr	tr	tr	GC, MS
C18:0	0.88	1.53	1.79	tr	tr	GC, MS
C18:1w9	3.66	4.11	4.66	3.42	4.85	GC, MS
C18:2w6	**14.73**	**11.25**	**10.94**	**12.38**	**16.99**	GC, MS
C18:3w3	**48.92**	**27.71**	**25.07**	**20.92**	**33.94**	GC, MS
C20:0	0.79	1.36	2.07	**7.07**	1.96	GC, MS
C20:1w9	tr	1.35	2.19	**6.56**	tr	GC, MS
C20:2	0.74	1.61	1.47	4.90	1.92	GC, MS
C20:3w6	tr	tr	1.52	3.27	1.72	GC, MS
C20:5w3	tr	1.55	tr	tr	tr	GC, MS
C22:2	0.88	1.30	1.56	3.34	1.46	GC, MS
C23:0	tr	tr	tr	2.73	tr	GC, MS
Total identified (%)	**90.89**	**86.45**	**87.76**	**77.79**	**86.53**	
ΣSFA (%)	21.96	37.57	38.58	23.00	25.65	
ΣMUFA (%)	3.66	5.46	8.62	9.98	4.85	
ΣPUFA (%)	65.27	43.42	40.56	44.81	56.03	
ΣUSFA (%)	68.93	48.88	49.18	54.79	60.88	
U/S (%)	3.14	1.30	1.27	2.38	2.37	
Lipids yield (%) dw	**2.76**	**1.94**	**2.50**	**4.12**	**3.49**	
Waxes in lipids (%) mass.	54.08	59.85	59.92	52.39	66.63	

ΣSFA: Sum of saturated fatty acids; ΣMUFA: Sum of mono-unsaturated fatty acids; ΣPUFA: Sum of poly-unsaturated fatty acids; ΣUSFA: Sum of unsaturated fatty acids; U/S: ratio "unsaturated/saturated" fatty acids.

AUTHOR COPY

samples, the main saturated fatty acids SFAs components were capric acid (C10:0 = 2.49–13.88%), myristic acid (C14:0 = 4.71–9.12%) and palmitic acid (C16:0 = 5.31–9.03%). Alternatively, the main unsaturated fatty acids USFAs chemical compounds were oleic acid (C18:1w9 = 3.42–4.85%), linoleic acid (C18:2w6 = 10.94–16.99%) and most importantly α-linolenic acid (C18:3w3 = 20.92–48.92%). The investigated samples presented high percentages of USFAs fractions compositions (48.88–68.93%), which were mostly represented by high amounts of poly unsaturated fatty acids (PUFA) in the range of (40.56–65.27%). In the other hand, the SFAs were varying from 21.96 to 38.58%. The U/S ratio ("USFAs/SFAs") was not steady once more; it depended also on the studied sample. In general, the amounts of fatty acids were decreasing in the order PUFA>SFA>MUFA "mono unsaturated FAs". The U/S range variation was very noticeable and shifting from 1.27 to 3.14. The overall values of U/S are suggesting moderate to good values and these values provides to the oils a good prevention of oxidation. Let's remind that MUFA have great importance because of their nutritional implications and their effect on the

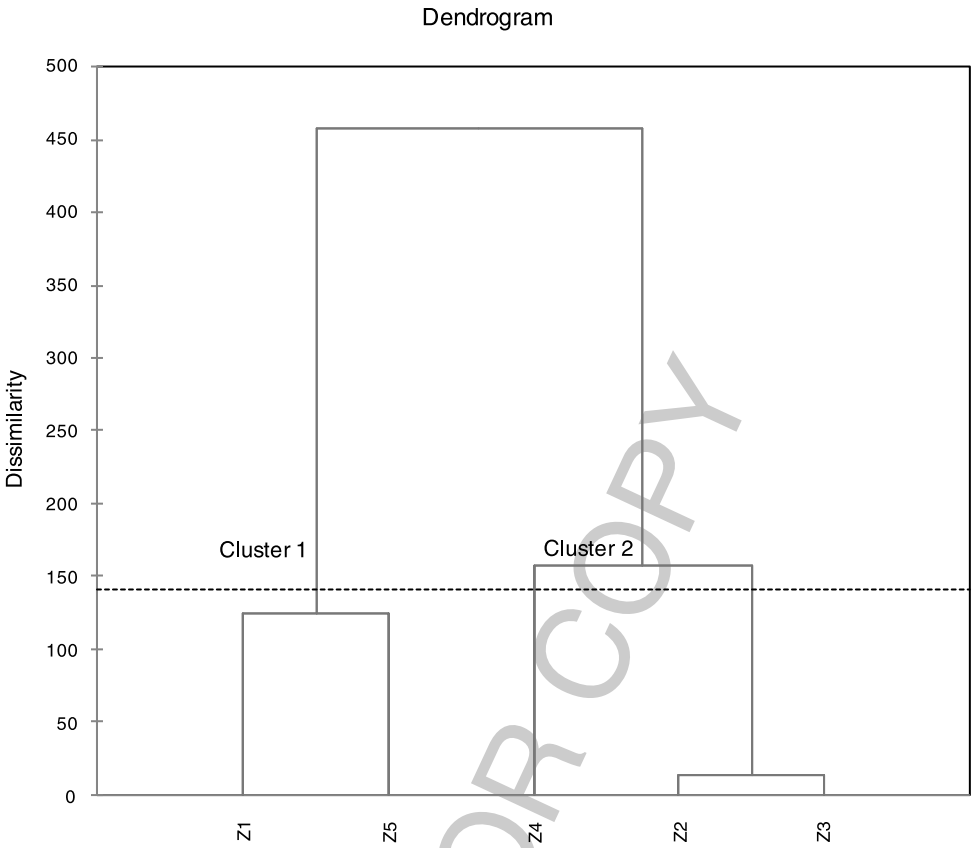


Fig. 1. Dendrogram obtained from a cluster analysis of five samples of fatty acids of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves. Samples are clustered using Ward's technique with a Euclidean distance measure.

AUTHOR COPY

oxidative stability of oil. These results suggested that the *P. lentiscus* leave oils may serve as a potential dietary source of MUFA and PUFA. According to literature, it has been recognized that a diet rich in MUFA may be an alternative choice to low-fat diet, which may lower blood cholesterol levels, modulate immune function decrease susceptibility of oxidation of LDL and improve the fluidity of HDL [38]. The PUFA-enriched diet may also be important for the structure and function of many membrane proteins, including receptors, enzymes, and active transport molecules [39].

For better understanding of similarities and/or differences between the studied samples in term of FAs compositions, cluster analysis was performed using Agglomerative Hierarchical Clustering AHC. The results of AHC schemed in the dendrogram of the Fig. 1, showed two clearly distinguished clusters "or groups" of samples (cluster 1: Z1, Z5) and (cluster 2: Z2, Z3 and Z4). Which indicated an existing dissimilarity of the studied samples (proves the existence of some variability of the chemical composition). The comparison of the chemical composition of samples Z1 and Z5 indicates roughly close values of the percentages of both major and minor components. For samples Z2 and Z3, the distance between these two samples was very low (Fig. 1), which means a very close values of percentages in both samples, as confirmed by the data of Table 1. Sample Z4 was clustered with Z2 and Z3 but with some existing differences of some components. The most influencing difference is that C10:0 in Z4 was becoming a minor component (3.18%) at the opposite of Z2 and Z3 where it was considered as a major component (11.74%, 13.88%). The most influencing difference between cluster 1 and 2 is, the higher

percentages of C18:3w3 (48.92%, 33.94%) in cluster 1 in comparison with cluster 2 where the percentages were important but lower (20.92–27.71%).

In order to determine a more detailed similarities or differences between the two cluster and the samples, principal component analysis PCA method was performed to try to identify the most influencing components that can distinguish or regroup the studied samples.

These above observations (occurrence of two clusters) were also confirmed by the results of PCA (Fig. 2), and which allowed us to discuss the similarities and the differences upon the chemical compositions. Loading factors for principal axes F1 and F2 (representing 71.24% of the total information), are given in Fig. 2. The F1 Axis, which represents 48.98% of the total information, is strongly and positively correlated with C23:0 (99.2%), C20:0 (97.8%), C22:2 (95.6%), C20:2 (95.1%), C20:1 (91.4%) and C20:3 (84.7%). This same axis is negatively correlated with C15:0 (–87.7%), C16:0 (–81.5%) and C14:0 (–80.9%).

Axis F2, which represents 28.26% of the total information, is highly negatively correlated with C10:0 (–90.0%), C11:0 (–81.7%), C14:1 (–74.4%), C12:0 (–73.3%) and C18:0 (–72.2%). This same axis is strongly and positively correlated with only one compound C18:2 (93.1%).

As previously demonstrated with AHC method, there is appearance of the same formerly grouping of (Z1, Z5) and (Z2, Z3: with larger distance) and Z4, in which this time can be clearly distinguished (Fig. 2). The sample Z4 is strongly correlated with relatively higher percentages of C20:0 (7.07% *Vs* 0.79–2.07%), C20:1 (6.56% *Vs*

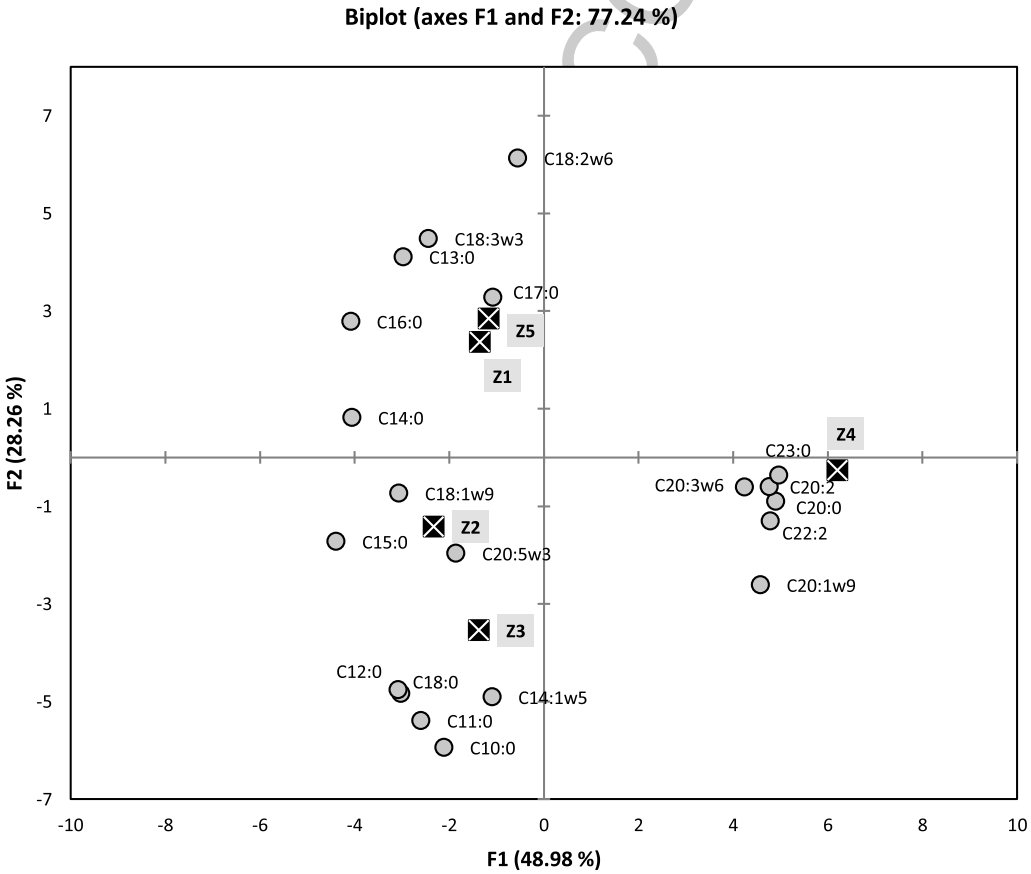


Fig. 2. Two dimensional plot on axes F1 and F2 using PCA of five samples of fatty acids of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves.

tr-2.19%), C20:2 (4.9% *Vs* 0.74–1.92%).C23:0 (2.73% *Vs* tr), C22:2 (3.34% *Vs* 0.8–1.56%) and C20:3 (3.27% *Vs* tr-1.72%) in comparison with the rest of the samples. The samples Z1 and Z5 are strongly correlated with C18:3 (48.92% and 33.94%, respectively) and C18:2 (14.73% and 16.99%, respectively), since their percentages in these major compounds are the highest ones recorded for this two samples. For the Z2 and Z3 samples which are this time not as close as Z1 and Z5 were. This group is distinguished by high content of major compound C10:0 (11.74% and 13.88%, respectively), in comparison with the rest of the samples (2.49–3.18%). Then again, this group is also distinguished by relatively higher compositions of minor compounds such as C11:0 (1.64% and 2.86%, respectively *Vs* tr-0.8%), C12:0 (2.42% and 2.16%, respectively *Vs* tr-0.87) and C18:0 (1.53% and 1.79%, respectively *Vs* tr-0.88%), when compared with the remaining samples. Finally, when taking in account the two main agglomerations of the studied samples (groups 1 and 2) obtained from dendrogram of the Fig. 1, the results showed clear resemblance of the contents of SFA, MUFA and PUFA for the following pairs of individuals (Z1, Z5 then Z2, Z3, respectively) (Table 1).

The comparison of obtained results here in this investigation with the previous previous reports from Germany [32] and Turkey [33] revealed very few similarities but lot of differences (Table 2). Starting with similarities, the samples of Algeria were presenting comparables ranges with those of Germany and Turkey for the following compounds C14:0, C18:0 and C18:3. When considering differences, there were lot of dissimilarities detected. The compound C16:1 which was not detected in Algerian samples was present as a minor compound in samples of Germany and Turkey. The percentage ranges of C16:0, C18:1 and C18:2, were higher in the samples of

Table 2

Comparison of the determined percentages of the fatty acids of the leaves of *P. lentiscus* with those of literature

	Fatty acids	Algeria (current investigation)	Germany [32]	Turkey [33]		
				Male tree		Female tree
				In vivo	*In vitro*	*In vivo*
	C14:0	4.71–9.12%	5.0–7.8%	6.10	1.66	4.79
Similarities	C18:0	tr-1.79%	1.4–2.5%	1.11	2.12	0.87
	C18:3	20.92–48.92%	33.7–40.4%	35.57	32.06	36.78
Differences	C16:0	5.31–9.03%	17.2–22.4%	19.29	23.10	21.12
	C16:1	Not detected	0.8–1.9%	2.2	1.00	3.61
	C18:1	3.42–4.85%	8.2–22.7%	6.83	8.58	8.03
	C18:2	10.94–16.99%	10.3–21.2%	28.87	31.17	24.77
	C15:0	tr-1.54%	Not reported	Not detected	0.28	Not detected
	C10:0	2.57–13.88%	Not reported	Not reported		Not reported
	C11:0	tr-2.86%	Not reported	Not reported		Not reported
	C12:0	tr-2.42%	Not reported	Not reported		Not reported
	C13:0	tr-1.62%	Not reported	Not reported		Not reported
	C14:1	tr-1.77%	Not reported	Not reported		Not reported
	C15:0	tr-1.54%	Not reported	Not detected		Not detected
	C17:0	tr-0.54%	Not reported	Not detected		Not detected
	C20:0	0.79–7.07%	Not reported	Not reported		Not reported
	C20:1	tr-6.56%	Not reported	Not detected		Not detected
	C20:2	0.74–4.90%	Not reported	Not reported		Not reported
	C20:3	tr-3.27%	Not reported	Not reported		Not reported
	C20:5	tr-1.55%	Not reported	Not reported		Not reported
	C22:2	0.88–3.34%	Not reported	Not reported		Not reported
	C23:0	tr-2.73%	Not reported	Not reported		Not reported

AUTHOR COPY

Germany and Turkey, in comparison with those of Algeria. A large number of detected minor compounds in Algerian samples (at least fourteen FAs) were not reported (or not identified) in those of Germany and Turkey. Finally, it is very useful to mention that the range variation of C18:3 in the Algerian samples were presenting larger arrays (for min. and max.) in comparison with those of literature samples. This is the first investigation than report the presence of C18:3 with a percentage that can reach 48.92%.

3.2. Waxes content in lipid fractions of P. lentiscus leaves

The lipids of *P. lentiscus* leaves were very rich in wax fractions (Table 1). Indeed, the percentages of waxes were very high, varying from 52.39 to 59.92% "mass", with mean and standard deviation values of (58.57 ± 5.63)% "mass".

3.3. Tocopherols composition analysis

Tocopherols analysis was performed for the five adopted samples. The results of the tocopherols percentages determined by HPLC analysis was exposed in Table 3. The data revealed that all investigated lipid samples contained a substantial amount of α-tocopherol "most important and requested vitamin", ranging from 58.51 to 89.17% (with mean-value±sd = 76.14±11.20%). Furthermore, the γ-tocopherol was completely absent in all samples. For most investigated samples, the percentages of β-tocopherol were low (3.24–4.35% "minor compound"), except for Z5, where its percentage was relatively significant (14.02%). For δ-tocopherol, its percentage was moderately significant in the majority of studied samples (7.59–27.47%). The founded percentages values of tocopherols isomers suggested the presence a certain variability of the composition, which should be further clarified using a larger number of populations.

3.4. Quantification of total sterols of P. lentiscus leaves

Recently, the cosmetic, drug and alimentary/nutraceutical industries have focused attention on low-cost renewable resources, rich in lipid-related compounds such as phytosterols which are an important part of the unsaponifiable matter of vegetable oils. The analysis of the sterols provides rich information about the quality and the identity of the oil investigated, and for the detection of oil and mixtures not recognized by their fatty acids profile [21].

The results of the quantification of the dewaxed lipid fractions obtained from the leaves of *P. lentiscus* sterols and tocopherols are summarized in Table 3.

The total contents of sterols were much higher than the content of total tocopherols. The range content of sterols was varying from 143.37 to 175.61 mg/"g of lipids", which were presenting significant variations. The

AUTHOR COPY

Table 3
Tocopherols and sterols contents in the lipids fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Lipid samples	Sterols contents		Total tocopherols contents		Percentages (%)*		
	(mg/g lipids)	(μg/g leaves "d.w.")	(mg/g lipids)	(μg/g leaves "d.w.")	α-Toc	β-Toc	δ-Toc
Z1	149.97 ± 0.01	4132.8 ± 0.1	4.5 ± 0.3	125.0 ± 8.9	75.99	3.90	20.10
Z2	175.61 ± 0.01	3404.2 ± 0.2	4.6 ± 0.2	89.4 ± 3.7	89.17	3.24	7.59
Z3	171.84 ± 0.01	4302.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	80.1 ± 4.0	79.06	4.34	16.60
Z4	167.40 ± 0.01	6897.3 ± 0.3	3.7 ± 0.1	152.4 ± 4.3	77.97	4.35	17.68
Z5	143.37 ± 0.01	4997.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1	110.0 ± 3.5	58.51	14.02	27.47

*Percentages determined by integration of surface area.

three samples Z2, Z3 and Z4 were presenting close values of sterols contents, and especially for Z3, Z4. The lowest content value was recorded for the sample Z5.

3.5. Quantification of total tocopherols of P. lentiscus leaves

Tocopherols (vitamin E isomers) are well known natural antioxidants whose presence in oils is often correlated with a relatively high abundance of USFA.

The results of the quantification of sterols and tocopherols in the dewaxed lipid fractions obtained from the leaves of *P. lentiscus* are summarized in Table 3. For tocopherols content, the range variation was narrow, revealing close contents in the studied samples (3.2–4.6 mg/"g of lipids"). The two samples Z1 and Z2 were presenting very close contents. In addition, samples Z3, Z4 and Z5 were also presenting practically close contents.

3.6. Antioxidant activity

3.6.1. DPPH assay (free radical scavenging activity)

The antioxidant activity of the lipid fractions was determined *in vitro* using DPPH• (*1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl*) assay. The results are summarized in Table 4. The obtained values of IC_{50} suggested low antioxidant activity when compared with antioxidant of reference (vitamins C and E), but the overall values are very interesting in comparison with the majority of common lipid fractions. In addition, and since there was a low variability of the values of IC_{50} for the different adopted samples, the IC_{50}values range was very tight (3.28–4.51 mg/mL). The minimum value of IC_{50} recorded for the sample Z2 represented the highest antioxidant activity. In the opposite side, the maximum IC_{50} value was reflecting the lowest antioxidant power, in which this time was registered for Z5 sample.

Correlation between antioxidant activity (expressed as Antioxidant Capacity $AOC = 1/IC_{50}$) and total tocopherols contents were investigated using linear equation model and estimated by minimum least square method. The found model gave a relatively good correlation factor "correlation coefficient $\rho_{x,y} = 75.90\%$" (Fig. 3), which indicated a direct relation between antioxidant capacity AOC of scavenging free DPPH radicals and total contents of tocopherols. This direct correlation supposes that the antioxidant activity is due mainly to the presence of tocopherols in the lipids.

Table 4
Antioxidant activity (DPPH assay and β-carotene test) of the lipid fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

		Antioxidant activity		
		DPPH assay	β-carotene test	
	Samples	IC_{50} (mg/mL)	AA% (2 mg/mL)	AA_{50} (mg/mL)
Lipid extract samples	Z1	3.76 ± 0.14	61.61 ± 0.04	1.53 ± 0.04
	Z2	3.28 ± 0.13	71.72 ± 0.04	1.43 ± 0.04
	Z3	3.98 ± 0.27	37.24 ± 0.07	2.59 ± 0.07
	Z4	3.54 ± 0.27	42.43 ± 0.04	2.47 ± 0.04
	Z5	4.51 ± 0.03	46.4 ± 0.02	2.21 ± 0.02
Antioxidants of reference	Vitamin E	0.0195 ± 0.0075	85.14	–
	Ascorbic acid	0.0130 ± 0.0023	0.71	–
	BHA	–	96.00	–
	BHT	–	96.62	–

AUTHOR COPY

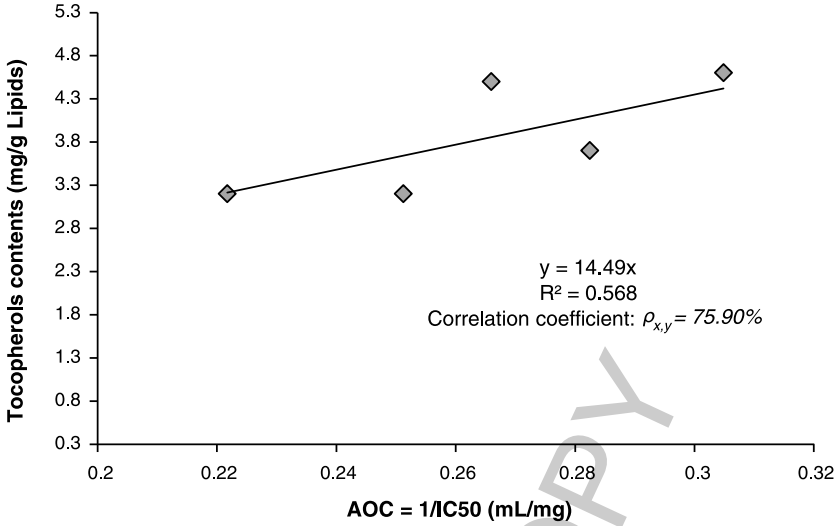


Fig. 3. Linear correlation between antioxidant activity (Antioxidant capacity AOC) and total contents of tocopherols in the lipids of *Pistacia lentiscus* leaves.

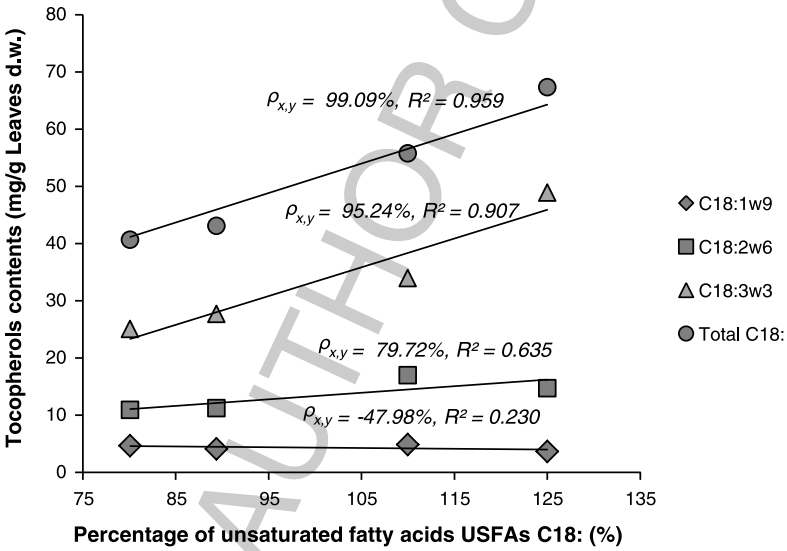


Fig. 4. Linear correlations between percentages of unsaturated fatty acids (C18:) and total contents of tocopherols in the lipids of *Pistacia lentiscus* leaves.

Linear correlations between percentages of unsaturated fatty acids (C18:1, 2 and 3) and total contents of tocopherols were also investigated. When exception was made for the sample Z4 (excluded), Fig. 4, shows strong linear relationship between total tocopherols and the percentages of C18:1 or C18:2 or C18:3, or the sum of these components. Especially for both C18:3 and total C18: it was observed that higher content of tocopherols in the lipids is directly correlated with higher content of C18: (or sum of C18:) "Correlation coefficient $\rho_{x,y} = 95.24\%$ and 99.09% for C18:3 and C18:, respectively". The exclusion of sample Z4 may be explained by the fact that

AUTHOR COPY

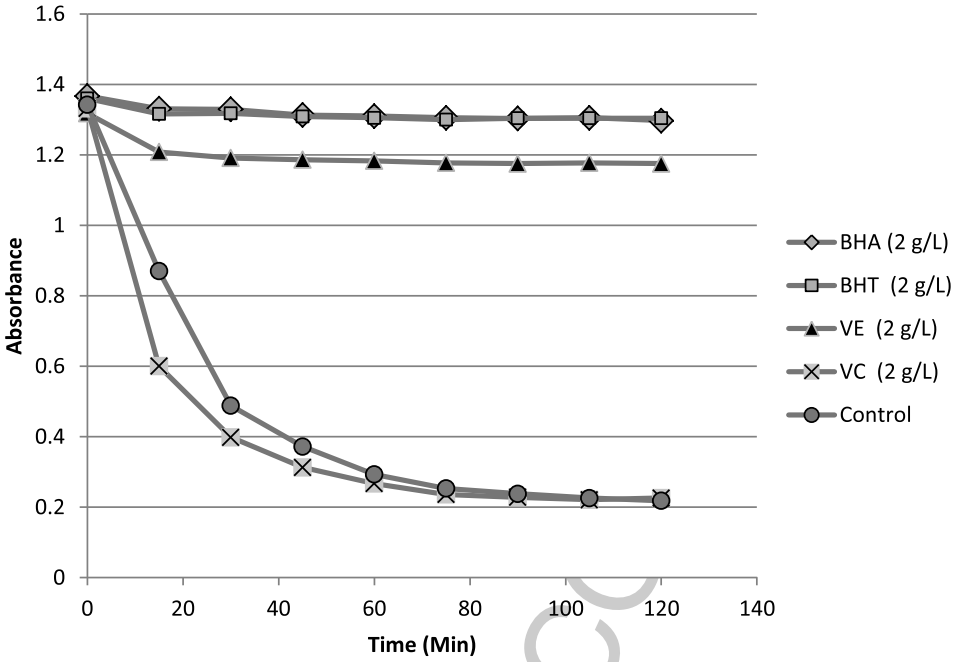


Fig. 5. Evolution of the absorbance of antioxidants of reference in β-carotene/linoleic system as function of time.

this sample belongs to a new different chemotype (as was above justified by statistical analysis: Figs. 1 and 2) that should be studied separately.

3.6.2. β-carotene bleaching test

The result of β-carotene bleaching test was summarized in Table 4. In addition, kinetic evolution of antioxidants of reference (BHA, BHT, vitamin C, vitamin E) in β-carotene/linoleic system is presented in Fig. 5. The antioxidants of reference showed different responses in term of their activity at 2 mg/mL. Explicitly, vitamin C presented very weak activity in comparison with the rest of the antioxidants, whereas BHA and BHT were very effective antioxidants. Furthermore, vitamin E was also exhibiting practically lower but close activity to both BHA and BHT. The comparison of the antioxidant activity AA% of the lipid samples with those of antioxidants of reference shows some variability of this activity ranging from 37.24 to 71.72%, the highest value was recorded for sample Z2 (this value was close to recorded for vitamin E) whereas the lowest one was belonging to sample Z3. In terms of AA_{50}, the antioxidant data values revealed the presence of two clusters of activities. The first cluster, which involves Z1 and Z2 samples, showed the highest activities in term of AA_{50} (1.53 and 1.43 mg/mL). The second cluster (Z3,4,5) exhibited a slightly lower activities compared to the first one with AA_{50} range variation of 2.21–2.52 mg/mL. As a conclusion the lipid fractions presented good antioxidant activities in comparison with those of antioxidant of reference.

3.7. Correlations between C18:, tocopherols and antioxidant activities

In order to determine possible existing relations between antioxidant activity (two assays) and the main important chemical components of the fatty acids (C18:1,2,3) and tocopherols (α,β,δ-Toc), correlations between these three groups of variables were determined using Excel internal statistical function "COEFFICIENT.CORRELATION". The results were gathered in Table 5. Strong positive correlation was found between

Table 5
Correlations between antioxidant activity (DPPH assay and β-carotene test), C18: and tocopherols

	AA_{50} β-carontene	IC_{50} DPPH	18:1	18:2	18:3	α-Toc	β-Toc	δ-Toc
AA_{50} β-carontene	1.0000	0.4425	0.2730	–0.0991	–0.6081	–0.3566	0.2578	0.3905
IC_{50} DPPH		1.0000	**0.7484**	**0.7139**	0.1561	**–0.9267**	**0.9119**	**0.8616**
18:1			1.0000	0.2260	–0.0831	–0.4612	0.6362	0.3134
18:2				1.0000	0.5946	**–0.8840**	**0.8130**	**0.8578**
18:3					1.0000	–0.2746	0.1093	0.3570
α-Toc						1.0000	**–0.9214**	**–0.9693**
β-Toc							1.0000	**0.7976**
δ-Toc								1.0000

IC_{50} (DPPH assay) and the two isomers β,δ-Toc. Alternatively, strong negative correlation was obtained between IC_{50} and α-Toc Moreover, good correlation was also found between IC_{50} and USFAs C18: except for the case of C18:3 where low correlation value was noticed (15.61%). This means that the higher antiradical power (lower IC_{50} values) is primarily correlated with high percentages of α-Toc (strong negative correlation), and in the same time with low percentage of C18:1,2 and β,δ-Toc. For β-carotene assay, the results indicated no meaningful correlation between the three investigated variables. Furthermore, correlations between the percentages of the two sets of variables C18:1,2 and α,β,δ-Toc were also determined. First, C18:2 was highly positively correlated with β,δ-Toc, and at the same time highly negatively correlated with α-Toc. Secondly, tocopherols isomers were exhibiting some strong correlations within each others *i.e.* α-Toc was strongly and negatively correlated with β,δ-Toc isomers, which means that the highest percentages of α-Toc were related to the lowest percentages of both β- and δ-Toc. In the same context, β- and δ-Toc were strongly positively correlated with each others; this result consolidates the previous above statement.

AUTHOR COPY

4. Conclusion

One of the objectives of food industry is to seek new resources of oil that preferably presents nutritional values. For human health, fats and particularly vegetable oils are considered as an important source of energy when glucose is not available.

The lipids of leaves of *P. lentiscus* are rich in two very important USFAs: linoleic (up to 16.99%) and linolenic (up to 48.92%) acids, which are known for their multiple dietary, pharmaceutical and clinical benefits. This obtained percentage of linolenic acid is the highest one yet recorded for this plant part. The naturally occurring fatty acid: conjugated linoleic acid (C18:2), presents different proprieties such anti-atherogenic and anti-carcinogenic [40]. In the same context and besides its role in reducing cardiovascular disease risk, α-linolenic acid (C18:3) presents also dietary effects such as anti-inflammatory and antiatherogenic [41].

The main result of this study illustrate the nutritional potential (richness in MUFA such as C18:1w9, presence of essential fatty acids such as C18:2w6 at all the stages of maturation, richness in omega-3 fatty acids such as C18:3w3) of the oil of *P. lentiscus* leaves, which can provide opportunities for rational exploitation for medicinal purposes and in the food industries. The results of statistical analysis showed else more the occurrence of at least two FAs chemoypes. Further investigations involving larger number of populations are required to identify all possible existing chemotypes. Regarding tocopherols analysis by HPLC, the samples were highly rich in α-tocopherol (up to 89.17%), which could be exploited in both food and pharmaceutical industries.

References

[1] Rauf A, Patel S, Uddin G, Siddiqui BS, Ahmad B, Muhammad N, Mabkhot YN, Hadda TB. Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. Biomed Pharmacother. 2017;86:(Supplement C):393-404. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.017

[2] Abidi A, Aissani N, Sebai H, Serairi R, Kourda N, Ben Khamsa S. Protective effect of *Pistacia lentiscus* oil against bleomycin-induced lung fibrosis and oxidative stress in rat. Nutr Cancer. 2017;69(3):490-7. doi:10.1080/01635581.2017.1283423

[3] Gündoğdu M, Akdeniz F, Özbek FE, Demirci S, Adigüzel V. A promising method for recovery of oil and potent antioxidant extracts from *Pistacia khinjuk* Stocks seeds. Ind Crops Prod. 2016;83(Supplement C):515-21. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.076

[4] Naouar MS, Mekki LZ, Charfi L, Boubaker J, Filali A. Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. Biomed Pharmacother. 2016;83(Supplement C):577-83. doi:10.1016/j.biopha.2016.07.021

[5] Andreadou I, Mitakou S, Paraschos S, Efentakis P, Magiatis P, Kaklamanis L, Halabalaki M, Skaltsounis L, Iliodromitis EK. "*Pistacia lentiscus* L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. Phytomedicine. 2016;23(11):1220-6. doi:10.1016/j.phymed.2016.06.002

[6] Costa J, Silva I, Vicente AA, Oliveira MBPP, Mafra I. Pistachio nut allergy: An updated overview. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;(In press). doi:10.1080/10408398.2017.1379947

[7] Beghlal D, El Bairi K, Marmouzi I, Haddar L, Mohamed B. Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2016;6(4):305-10. doi:10.1016/S2222-1808(15)61035-0

[8] Kalogeropoulos N, Chiou A, Ioannou MS, Karathanos VT. Nutritional evaluation and health promoting activities of nuts and seeds cultivated in Greece. Int J Food Sci Nutr. 2013;64(6):757-67. doi:10.3109/09637486.2013.793298

[9] Hacibekiroğlu Ii, Yilmaz PK, Ha¸imi N, Kilinç E, Tolan V, Kolak U. *In vitro* biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. Nat Prod Res. 2015;29(5):444-6. doi:10.1080/14786419.2014.947492

[10] Hadjimbei E, Botsaris G, Goulas V, Gekas V. Health-promoting effects of pistacia resins: Recent advances, challenges, and potential applications in the food industry. Food Rev Int. 2015;31(1):1-12. doi:10.1080/87559129.2014.938350

[11] Yemmen M, Landolsi A, Ben Hamida J, Megraud F, Trabelsi Ayadi M. Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017;63(9):87-95. doi:10.14715/cmb/2017.63.9.16

[12] Ojeda-Amador RM, Fregapane G, Salvador MD. Composition and properties of virgin pistachio oils and their by-products from different cultivars. Food Chem. 2018;240(Supplement C):123-30. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.087

[13] Pantano L, Lo Cascio G, Alongi A, Cammilleri G, Vella A, Macaluso A, Cicero N, Migliazzo A, Ferrantelli V. Fatty acids determination in Bronte pistachios by gas chromatographic method. Nat Prod Res. 2016;30(20):2378-82. doi:10.1080/14786419.2016.1180599

[14] Lo-Presti M, Sciarrone D, Crupi ML, Costa R, Ragusa S, Dugo G, Mondello L. Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. Flavour Fragrance J. 2008;23(4):249-257. doi:10.1002/ffj.1878

[15] Yildirim H. Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. Scientia Horticulturae. 2012;137:29-35. doi:10.1016/j.scienta.2012.01.020

[16] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process. 2011;89(3):217-33. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008

[17] Nahida AS, Siddiqui A. *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. Int J Pharm Pharm Sci. 2012;4(4):16-20

[18] Landau S, Muklada H, Markovics A, Azaizeh H. Traditional Uses of *Pistacia lentiscus* in Veterinary and Human Medicine. In: Yaniv Z, Dudai N (eds) Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East. vol 2. Springer Netherlands, 2014, pp. 163-80. doi:10.1007/978-94-017-9276-9_8

[19] Kivçak B, Akay S. Quantitative determination of α-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. Fitoterapia. 2005;76(1):62-6. doi:10.1016/j.fitote.2004.09.021

[20] Mezni F, Aouadhi C, Khouja ML, Khaldi A, Maaroufi A. *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. Nat Prod Res. 2015;29(6):565-70. doi:10.1080/14786419.2014.952232

[21] Trabelsi H, Sakouhi F, Renaud J, Villeneuve P, Khouja ML, Mayer P, Boukhchina S. Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (*Pistacia lentiscus*) fruits. Eur J Lipid Sci Technol. 2012;114(8):968-73. doi:10.1002/ejlt.201100146

[22] Trabelsi H, Cherif OA, Sakouhi F, Villeneuve P, Renaud J, Barouh N, Boukhchina S, Mayer P. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. Food Chem. 2012;131(2):434-40. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.083

[23] Mizi A, Djedaia S. Physico-chemical and biochemical properties of oil extracted from *Pistacia lentiscus*. Asian J Chem. 2010;22(1):646-50.

AUTHOR COPY

[24] Mekni N. GC/MS chemical analysis of *Pistashia lentiscus* fatty oil from the north of Tunisia. International Journal of PharmTech Research. 2011;3(4):2245-8. doi:10.13140/rg.2.1.1689.7448

[25] Mezni F, Khaldi A, Maaroufi A, Hamrouni L, Msallem M, Boussaid M, Khouja ML. Fatty acid composition and biological properties of the fixed oil of the fruits of *Pistacia lentiscus* L. Acta Horticulturae. 2013;997:219-24.

[26] Mezni F, Khouja ML, Gregoire S, Martine L, Khaldi A, Berdeaux O. Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of *Pistacia lentiscus* edible oil. Nat Prod Res. 2014;28(16):1225-30. doi:10.1080/14786419.2014.895724

[27] Mezni F, Labidi A, Msallem M, Boussaid M, Khouja M, Khaldi A. Influence of harvest date on fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oils. J Mater Environ Sci. 2014;5(6):1703-8.

[28] Haouli A, Seridi R, Djemli S, Bourdjiba O. Contribution to the analysis of *Pistacia lentiscus* extracted oil. American-Eurasian Journal of Agricultural and eEnvironmental Sciences. 2015;15(6):1075-81.

[29] Charef M, Yousfi M, Saidi M, Stocker P. Determination of the fatty acid composition of acorn (Quercus), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. Journal of the American Oil Chemists Society. 2008;85(10):921-4. doi:10.1007/s11746-008-1283-1

[30] Dhifi W, Jelali N, Chaabani E, Beji M, Fatnassi S, Omri S, Mnif W. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. African Journal of Agricultural Research. 2013;8(16):1395-400. doi:10.5897/AJAR11.1837

[31] Mezni F, Labidi A, Khouja ML, Martine L, Berdeaux O, Khaldi A. Diversity of sterol composition in tunisian *Pistacia lentiscus* seed oil. Chem Biodivers. 2016;13(5):544-8. doi:10.1002/cbdv.201500160

[32] Diamantoglou S, Meletiou-Christou M. Das jahresperiodische Verhalten des Rohfetts und der Fettsäuren in Rinden und Bläuern von *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* und *Pistacia vera*: The Lipid Content and Fatty Acid Composition of Barks and Leaves of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera* During the Course of a Year. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1979;93(3):219-28. doi:10.1016/S0044-328X(79)80200-7

[33] Akdemir OF, Tilkat E, Onay A, Keskin C, Bashan M, Kilinç FM, Kizmaz V, Süzerer V. Determination of the fatty acid composition of the fruits and different organs of lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). J Essent Oil-Bear Plants. 2015;18(5):1224-33. doi:10.1080/0972060X.2014.986541

[34] Emmerie A, Engel C. Colorimetric determination of α-tocopherol (vitamin E). Recl Trav Chim Pays-Bas. 1938;57(12):1351-5. doi:10.1002/recl.19380571207

[35] Naudet M, Hautfenne A. Méthode normalisée pour la détermination des stérols totaux dans les huiles et graisses (y compris les résultats d'une étude en collaboration)=Standardized method for the determination of total sterols in oils and fats (including the results from a collaborative study). Revue Française des Corps Gras. 1986;33(4):167-70.

[36] Barreto MC. Lipid extraction and cholesterol quantification: A simple protocol. J Chem Educ. 2005;82(1):103. doi:10.1021/ed082p103

[37] Dib I, Fauconnier M-L, Sindic M, Belmekki F, Assaidi A, Berrabah M, Mekhfi H, Aziz M, Legssyer A, Bnouham M. Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. BMC Complement Altern Med. 2017;17(1):82. doi:10.1186/s12906-017-1598-2

[38] Villa B, Calabresi L, Chiesa G, Risè P, Galli C, Sirtori CR. Omega-3 fatty acid ethyl esters increase heart rate variability in patients with coronary disease. Pharmacol Res. 2002;45(6):475-8. doi:10.1006/phrs.2002.0989

[39] Yaqoob P. Monounsaturated fatty acids and immune function. Eur J Clin Nutr. 2002;56(Suppl 3):S9-S13. doi:10.1038/sj.ejcn.1601477

[40] Houseknecht KL, Heuvel JPV, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. Dietary Conjugated Linoleic Acid Normalizes Impaired Glucose Tolerance in the Zucker Diabetic Fattyfa/faRat. Biochem Biophys Res Commun. 1998;244(3):678-82. doi:10.1006/bbrc.1998.8303

[41] Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary α-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. The Journal of Nutrition. 2004;134(11):2991-7. doi:10.1093/jn/134.11.2991

AUTHOR COPY

Seasonal variability of chemical composition and antioxidant activity of lipids (fatty acids and tocopherols) from the leaves of Pistacia lentiscus *L.*

Mohamed Harrat, Nadhir Gourine, Mónica Válega, Artur M. S. Silva & Mohamed Yousfi

Journal of Food Measurement and Characterization

ISSN 2193-4126
Volume 14
Number 4

Food Measure (2020) 14:1939-1956
DOI 10.1007/s11694-020-00441-0

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com”.

Springer

Author's personal copy

Journal of Food Measurement and Characterization (2020) 14:1939–1956
https://doi.org/10.1007/s11694-020-00441-0

ORIGINAL PAPER

Seasonal variability of chemical composition and antioxidant activity of lipids (fatty acids and tocopherols) from the leaves of *Pistacia lentiscus* L.

Mohamed Harrat[1,2] · Nadhir Gourine[1] · Mónica Válega[3] · Artur M. S. Silva[3] · Mohamed Yousfi[1]

Received: 30 October 2019 / Accepted: 6 March 2020 / Published online: 18 March 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

In this study, seasonal evolution and variability of the chemical composition of the fatty acids and tocopherols (isoforms) obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* growing in Algeria were investigated. Furthermore, quantified total tocopherol and total sterol contents were monitored during the same season. Besides, the antioxidant activity of the lipids was also investigated. The identification of the fatty acid methyl esters FAMEs showed some clear variability of the composition. The range variation of main saturated fatty acids SFA detected were: myristic acid (C14:0 = 2.94–16.61%), palmitic acid (C16:0 = 5.31–15.98%), capric acid (C10:0 = 0–13.88%), lauric acid (C12:0 = 0–8.09%), and arachidic acid (C20:0 = 0–7.07%). On the other hand, the main unsaturated fatty acids USFA were α-linolenic acid (C18:3 = 5.04–48.92%) which is known for its multiple dietary, pharmaceutical and clinical benefits, followed by linoleic acid (C18:2 = 5.49–16.99%), and oleic acid (C18:1 = 3.42–14.90%). The highest content of C18:3 was obtained in January. Major compounds showed different roads of evolutionary patterns. Surprisingly, antioxidant activity determined using two different assays (DPPH and β-carotene) revealed no significant variations for each of the tests during the same season. The variability of the contents of the fatty acids was discussed using clustering analysis (four distinguished clusters). As a main result, the maximum percentages of C18:3 and δ-tocopherol were dependent on the season of collection. In conclusion, this study illustrates the nutritional potential of the oil of *P. lentiscus* leaves, and gives valuable informations about the season variability of the lipid metabolites, which can provides some real opportunities for rational exploitation in the food industry or for medicinal purposes.

Keywords *Pistacia lentiscus* · Leaves · Fatty acids · Tocopherols · DPPH assay · β-carotene assay

Introduction

The genus of *Pistacia* has garnered pharmaceutical attention in recent times. In this regard, the ethnomedicinal, phytochemistry, biological potencies, and risks of the *Pistacia* genus have been reviewed [1]. Although the phytochemical composition of the genus of *Pistacia* has been extensively studied, there are still many new recent reports focusing on the health curative effect of their extracts [2–11]. Moreover, their nutritional value (especially for Pistachios "*Pistacia vera*") is still of interest [12, 13].

Pistacia lentiscus L. (lentisk) is an evergreen bush (shrub or tree) belonging to the Anacardiaceae family, that can be three meters in height, and consists of more than eleven species. It is largely distributed in "extreme" ecosystems of the Mediterranean countries and has a large geographical and bioclimatic distribution, extending from the humid to the arid areas [14]. In Algeria, the tree is widespread in forest alone or associated with other tree species such as terebinth, olives and carob, in all coastal areas or in seaside stony areas [15]. *P. lentiscus* (also known in Algeria under the name of "Dharou") is extensively used in folk medicine by rural populations in Algeria. Algeria is home to at least 3164 species of vascular plant, of which 7.9% are endemic. *P. lentiscus* is important because of its medicinal value [16].

✉ Nadhir Gourine
n.gourine@lagh-univ.dz

1 Laboratoire des Sciences Fondamentales (LSF), Université Amar Télidji, BP. 37G, Laghouat 03000, Laghouat, Algeria

2 Laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (LVPRS), Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière, Université d'Ouargla, Route de Ghardaïa, BP. 511, 30000 Ouargla, Algeria

3 Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Author's personal copy

P. lentiscus is used for various medicinal purposes. The extract of the different parts of the plant shows various activities like anti-inflammatory, antimicrobial, antiatherogenic and antimutagenic, antioxidant, antifungal, lipid lowering, hepatoprotective, anticancer, antiasthmatic, anthelmintic, wound healing, hypotensive, antiarthritic, antigout activity and also in the treatment of functional dyspepsia [17]. The essential oil obtained from the gum/resin of *P. lentiscus* L. is commonly called mastic oil, whereas the oil obtained from the leaves is named lentisk oil. In human medicine, aqueous extracts of leaves and young twigs are prepared as infusions or decoctions. Leaves and young twigs are used "as it is" in veterinary medicine. Extracts exhibit a high concentration of phenolics and terpenes of varying composition [18]. The leaves of *P. lentiscus* are extensively used in folk medicine for the treatment eczema, diarrhoea, and throat infections, and as a potent antiulcer agent [19].

The food safety concern on human health resulting from excessive employment of synthetic additives has prompted the development of new sanitation methods to decrease the negative impact on human health and the environment. One such possibility is the use of essential oils and plant products as antibacterial additives. Fixed oils are also known for their antimicrobial power related to fatty acids and phenol compounds. *P. lentiscus* L. seed oil is one of the edible oils widely used and appreciated, for its special taste, by the local population in Algerian and Tunisian forest areas [20].

Previous reports on the chemical composition of the fatty acids of *P. lentiscus* dealt mainly with the part of the fruits [21–30]. Alternatively, other reports were focusing on the sterols analysis from the fruits [21, 30, 31]. For the tocopherols, previous reports were interested in the part of fruits [26, 30]. Regarding the leaves part, a previous report on *P. lentiscus* var. *chia* established a colorimetric quantification of α-tocopherol of the leaves by TLC-densitometry and colorimetry [19]. According to literature, when the issue of antioxidant activity of the fatty acids was considered, the studied parts were those of fruits [27].

According to literature, only few reports were dealing with the identification of the fatty acids of the leaves of *P. lentiscus* [32–34]; some recent report dealt with major fatty acid compositions of the oil extracts from different parts of this tree: seeds, fruits, resins, root, leaf and stem [32]. Additionally, some other recent study from Tunisia dealt with the influence of the harvest date on fatty acids composition of *P. lentiscus* edible oils [27] and another one investigated also the effect of the growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid contents obtained from the fruits of *P. lentiscus* [26].

The primary aim of the present work is to investigate season effect on the chemical composition of the lipid fractions (essentially: fatty acids components and tocopherols isoforms) extracted from the leaves of *P. lentiscus* L. growing in Algeria. A second objective is to monitor the evolutions of total tocopherol and total sterol contents during the same season. And the final objective is to test the variability of in vitro antioxidant activity of the lipid fractions, using two different and complementary methods: DPPH (1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl) free radicals scavenging assay, then β-carotene bleaching test.

Materials and methods

Chemicals

Petroleum ether, anhydrous sodium sulfate, sodium and ascorbic acid were purchased from AnalaR NORMAPUR Prolab (Algeria). Chloroform, absolute ethanol, activated charcoal, *n*-hexane, sulfuric acid, acetic acid, ferric chloride, dichloromethane, α-tocopherol (Vitamin E) and DPPH$^{\cdot}$ (1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl) were obtained from Sigma-Aldrich (Prochima Sigma, Tlemcen, Algeria). Butylated hydroxyanisole (BHA), was purchased from Fluka chemie (Prochima Sigma, Tlemcen, Algeria). *ortho*-phenanthroline and acetic anhydride were obtained from Merck (Merck S.A.R.L. Algiers, Algeria) and cholesterol from UCB Pharma (SARL E-SAHTI, Algiers, Algeria). All reagents and chemicals used were of analytical grade.

Collection of plant material

Leaves of *Pistacia lentiscus* L. (different tree samples) were periodically and randomly collected for 4 months, from January 2015 to October 2016. The choice of months stands as follows: January for mid-winter, April for mid-spring, August for mid-Summer and October for mid-autumn, consecutively. The samples were collected from the location of Magtaâ Kheïra (town of Tipaza), located in the north of Algeria, at the west of the capital Algiers (36° 39′ 34.43″ N and 2° 48′ 37.02″ E with an altitude of 73 m). The leave samples of the plants were air-dried in the shade at room temperature for 15 days. A voucher specimen (PLL-TMK/01/2015–16) was deposited in the herbarium of the Fundamental Sciences Research Laboratory at Laghouat University.

Lipid extraction

The air dried leaves of *Pistacia lentiscus* L. were milled to obtain a fine powder using a coffee grinder. The lipids were extracted using a Soxhlet apparatus with petroleum ether for 12 h. The lipid extract was collected in a flask and subsequently dried over anhydrous sodium sulphate Na_2SO_4. After filtration, the lipid extract was transferred

Author's personal copy

to a rotary vacuum evaporator at 40 °C to fully dry the extract (remove the solvent).

The chlorophyll removal was performed by reflux, using chloroform as a solvent in the round-bottomed flask containing lipid extract and activated carbon for 2 h. The ratio of activated carbon relative to initially air dried leaves was 1:5 (mass). The extract fraction was cooled to room temperature then filtered. In the end, the chloroform solvent was removed from the filtered solution in Rotavap under reduced pressure at 40 °C.

The extracted lipid fraction was weighed to determine the total lipid content per dry weight of the plant, and then stored at + 4 °C for further analyses.

Fatty acid FA composition analysis

Fatty acid methyl esters FAMEs preparation

The fatty acid FA composition of the oils was determined after having converted the fatty acids FAs into fatty acid methyl esters FAMEs then analysed by gas chromatography GC. The FAMEs were prepared by the following procedure: lipids (0.5 g) were refluxed for 20 min in 10 mL of 2% sodium methylate (NaOMe), and then 20 mL of water was added. The FAMEs were extracted by *n*-hexane and then washed with distilled water. The combined extracts were dried over anhydrous sodium sulfate Na_2SO_4 and evaporated in vacuum, then analysed by capillary GC.

Chromatographic analysis of FAMEs

The analysis of the FAMEs was performed in a gas chromatographic GC apparatus (model CP-Varian 3800). This model was equipped with an FID detector and DB-Wax capillary column (60 m × 0.32 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness). 2 µL of the sample was injected in the Split injection mode (50:1). The oven temperature was programmed using four different ramps. The temperature started at 40 °C, held for 0.5 min, then raised at a rate of 25 °C/min to 195 °C, then raised at a rate of 3 °C/min to 205 °C, then raised at a rate of 8 °C/min to 230 °C, then raised at a rate of 20 °C/min to 260 °C, and finally kept for 5 min. The injector temperature was set at 250 °C and the detector temperature at 260 °C. The flow rate of carrier gas (helium) was 1 mL/min. Identification and quantification of FAMEs were accomplished by comparing the retention times of peaks with those of pure standards purchased from Sigma-Aldrich and analysed under the same conditions. The results were expressed in percentage for each component as the area under each peak relative total area of peaks integrated.

Gas Chromatography-Mass Spectroscopy GC–MS analysis of of FAMEs

The gas chromatography–mass spectroscopy GC–MS analysis was performed on an AGILENT 6890 GC/CMSD 5973 equipped with a capillary column UB-Wax (30 m × 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness) and a 70 eV EI quadrupole detector. Helium was the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. Injector and MS transfer line temperatures were set at 250 °C and 220 °C, respectively. The column temperature was programmed the same as the gas chromatography. 1 µL of samples were injected using split mode (50:1).

Dewaxing of lipids

Prior to the following determinations: antioxidant activity, quantification of total sterol content TSC and total tocopherol content TTC, the crude lipid fractions were dewaxed by the following procedure. Crude lipids were first dissolved in absolute ethanol, and then kept in the refrigerator for 24 h to crystallize the waxes fractions; after that, the solution containing frozen waxes particles was filtered, and finally, the solvent was eliminated under vacuum pressure in a rotary evaporator at 40 °C.

Tocopherols and sterols

Analysis of tocopherol composition by HPLC

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 330 nm for emission wavelength. The separation column was a SI60 (250 mm × 4.6 mm internal diameter, 5 µm film thickness, 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. The column compartment was set at 25 ºC. Commercial standard (α-Toc) and a mixture (α-Toc, β-Toc, γ-Toc and δ-Toc) were co-injected with samples for the identification of tocopherol isoforms (i.e. isomers). Prior to HPLC analysis, 35 mg of lipids fraction was diluted with 1 mL *n*-hexane and 20 µL of the solution was injected.

Determination of the total tocopherol content TTC

The total tocopherol content of the lipids was determined by the spectrometric method described in reference [35] with a few modifications. This method is based on the redox reaction between tocopherols and ferric iron (Fe^{3+}) which is reduced to ferrous iron (Fe^{2+}). The latter, in the presence of

Author's personal copy

specific reagents such as *ortho*-phenanthroline (1,10-phenanthroline), forms a stable red–orange complex with a very high molar extinction coefficient at 510 nm.

From the standard solution of α-tocopherol in dichloromethane, aliquots solutions with various concentrations were prepared. To 2 mL of each solution, an aliquot was added 1 mL of 1,10-phenanthroline reagent (0.4% in absolute ethanol), then 1 mL of ferric chloride reagent (0.12% in absolute ethanol) was added and the mixture was shaken for 5 min. The absorbance of the mixture was read at 510 nm. A blank was run, consisting of 2 mL of dichloromethane, 1 mL of 1,10-phenanthroline reagent and 1 mL of ferric chloride reagent. The above described procedure was applied to sample solutions of dewaxed lipids. The TTC in the dewaxed lipids were calculated using the calibration curve (linear regression equation obtained experimentally by the standard α-tocopherol). The results were expressed as α-tocopherol equivalent in mg/(g of lipids).

Determination of the total sterol content TSC

This method is based on spectrophotometric absorption according to the Liebermann-Burchard test (or acetic anhydride test) [36, 37], based on a specific coloured reaction of the 3 β-hydroxysteroids having a double bond in position 5–6. The sterols form a stable complex with the β-acetic anhydride in an acid medium which absorbs in the visible at a wavelength of 550 nm (the Liebermann spectral reagent consists of 60 mL of acetic anhydride and 10 mL of concentrated sulfuric acid and 30 mL of acetic acid).

From a chloroform solution of cholesterol with a concentration of 1 g/L, a series of solution dilutions were prepared to plot a calibration curve linking the optical density to the concentration. 1 mL of each diluted solution was mixed with 2 mL of the Liebermann reagent, then kept for 25 min to allow reagent colour to fully develop and stabilize.

The above-described procedure was applied to dewaxed lipid fractions. The TSC in the dewaxed lipids were calculated from the regression equation of the standard curve. The results were expressed as cholesterol equivalent in mg/(g of lipids) and in µg/(g leaves "d.w.").

Antioxidant activity

Radical-scavenging activity (DPPH assay)

The antioxidant activity was determined by the DPPH method, which is based on the evaluation of the free-radical scavenging capacity. Briefly, 0.5 mL of the sample (dewaxed lipids) diluted in absolute ethanol was mixed with 0.5 mL of 250 µM DPPH$^{\cdot}$ prepared in absolute ethanol. The reaction mixture was well shaken and incubated in the dark at room temperature for a period time of 30 min. The absorbance of the resulting solution was read at 517 nm against a blank. The antiradical activity was expressed as IC_{50} (mg/mL): the concentration required to scavenge (inhibit) 50% of free DPPH$^{\cdot}$ initially introduced. The inhibitory percentage of DPPH$^{\cdot}$ was calculated according to the following equation:

$$I\%(Inhibition\%) = \left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100\%$$

where A_0 and A are the absorbance values of control and the tested sample, respectively.

Antioxidants of reference (vitamin E and ascorbic acid) were used for comparison purposes. All experiments were performed in triplicate.

Bleaching ability of β-carotene in linoleic system

The inhibition of β-carotene bleaching by the lipid fractions was determined according to the slightly modified method described in literature [38]. A volume of 5 mL of a dichloromethane solution of β-carotene at an initial concentration of 0.1 mg/mL was added to a round flask containing 20 mg of acid linoleic and 200 mg of Tween 80. Dichloromethane was completely removed at 40 °C under reduced pressure in Rotavap, and then 50 mL of distilled water was slowly added and vigorously shaken. Aliquots (40 µL) of various solutions concentrations were added to 1 mL of β-carotene/linoleic acid emulsion. A control preparation was obtained by adding 40 µL of ethanol to 1 mL of β-carotene/linoleic acid emulsion. The absorbance of the preparations was measured at 490 nm initially and after 2 h of incubation in a water bath at 50 °C. Antioxidative activity (AA%) in percent was calculated using the following formula:

$$AA\% = \frac{\left(As_{120} - Ac_{120}\right)}{\left(Ac_0 - Ac_{120}\right)} \times 100$$

where Ac_0 is the absorbance of the control measured initially, at t = 0 min (just before the incubation). As_{120} and Ac_{120} are the absorbance of the tested samples and the control, respectively, measured after 2 h of incubation.

Results expressed in AA% were based on extract solutions of initial concentrations of 2 mg/mL. The results were also expressed in AA_{50}, which is the concentration providing 50% β-carotene bleaching inhibition). Vitamin E was used as a positive control. All trials were performed in triplicate.

Statistical analysis

Data analysis

Statistical analysis was carried out using XLSTAT Version 2016.02.27444. Experiments were conducted with three

Author's personal copy

replicates. The results were expressed as the mean ± SD of three repetitions of the experiments.

Raw data obtained were analyzed through analysis of variance (ANOVA) combined (as a post-test procedure) with Tukey's post-hoc (HSD) multiple range tests. p values of less than <5% ($p < 0.05$), were considered to be significant. Correlations were determined using Pearson coefficient at a level of significance of $p < 0.05$.

Cluster analysis

Cluster analysis was performed using Agglomerative Hierarchical Clustering AHC (using Ward's technique) with Euclidean distance measure. The calculus was performed using a set of composed of 19 different fatty acids samples (different plants from the region of Zeralda overspread at four months of the collection). The total number of adopted variables was 9 (representing simply the major identified FAs components in all represented individuals, or the most influencing parameters that could make a difference i.e. some minor compounds).

Results and discussion

Lipids and waxes contents

The lipid contents and their range variations obtained from different individuals of *P. lentiscus* leaves harvested during four months are shown in Table 1. Besides, their range variations specific to each season and for the whole year plant cycle (data presented statistically) are summarized in Table 2. The waxes content percentage was found to be very high (9.47–68.96%) in comparison with lipids content (1.33–4.12%). Although the values of lipids contents were low, it was observed that their monthly mean yields could be considered roughly constant (Table 2, Fig. 1). No significant difference ($p < 0.05$) was found between lipids mean yields and months of collection.

The waxes content mean value for each month (season) increased slightly, gradually and linearly from mid-spring (April) to mid-winter (January) (Fig. 1). But when considering its corresponding ANOVA + Tukey's analysis, no significant differences were obtained between the monthly mean values. This was expected since randomly collected samples, presented a considerably large range of variation for each season, an exception was made for January (winter) where the range variation was relatively narrow. The range variation for the overall samples was 9.47–68.96%, which corresponded to a mean value of 52.60 ± 18.15%.

For comparison purposes, if we consider other species of this plant, the lipid content could be considered very interesting when compared with other parts (especially fruits) rich in oils and provided by literature. The maximum obtained yield value of 4.12% was only about 3 to 8 times lower than the yields obtained by the fruits of *P. lentiscus* from Algeria reported by Charef et al. [29], in which they found 11.7% and 32.8% for red and black fruits, respectively. Moreover, the obtained yield was not far different from both of *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. in which they exhibited identical yield values of 9.0% (from the parts of the fruits), and were also reported by Charef et al. [29].

Fatty acids composition

The results of gas chromatography GC and gas chromatography coupled to the mass spectroscopy GC–MS analysis of the FAMEs of *P. lentiscus* leaves obtained during different harvest months (seasons) are shown in Table 1. Their statistical representations are also summarized in Table 2. The identification of the FAMEs showed some clear variability of the compositions. For whole investigated samples (throughout a year), the percentages ranges of main saturated fatty acids SFA detected were: myristic acid (C14:0 = 2.94–16.61%), palmitic acid (C16:0 = 5.31–15.98%), capric acid (C10:0 = 0–13.88%), lauric acid (C12:0 = 0–8.09%), and arachidic acid (C20:0 = 0–7.07%). On the other hand, the main unsaturated fatty acids USFA were α-linolenic acid (C18:3 = 5.04–48.92%), followed by linoleic acid (C18:2 = 5.49–16.99%), oleic acid (C18:1 = 3.42–14.90%) and (C20:1 = 0–6.56%). Other compounds were found to be of low overall abundance. In both SFA and USFA classes, the range of variation extent was very considerable and very important, which reflects the existence of a considerable variability of the composition within this plant part metabolite. Based on a quick literature survey [32–34], serval minor FA compounds (C15:1, C17:1, C22:0 and C24:0) were reported for the first time herein this investigation.

For the entire samples, USFA fraction composition showed the highest percentages, that were ranging from 33.58 to 68.93%, and which were mostly represented by high amounts of polyunsaturated fatty acids PUFA in the range of (18.54–65.27%). Alternatively, the SFA range variation was varying from 21.96 to 45.57%.

When the average season percentage value of each FA class was examined, the result (schemed in Fig. 2a) showed that pairs of MUFA & SFA were presenting a pretty similar pattern of decrease over the seasons (April–January). In return, PUFA & ∑USFA were presenting also pretty similar evolution pattern, but this time of increase during the same period.

The results of ANOVA combined with Tukey's tests showed a significant difference in MUFA content between January and both months of April and August. Alternatively, no significant difference was spotted between these two consecutive periods (April and August). For PUFA, a significant

Author's personal copy

Table 1 Seasonal variation of identified fatty acid compositions of the lipid fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Fatty acids components	Fatty acids composition (%)																		
	April				August					October					January				
	Z-Apr(1)	Z-Apr(2)	Z-Apr(3)	Z-Apr(4)	Z-Aug(1)	Z-Aug(2)	Z-Aug(3)	Z-Aug(4)	Z-Aug(5)	Z-Oct(1)	Z-Oct(2)	Z-Oct(3)	Z-Oct(4)	Z-Oct(5)	Z-Jan(1)	Z-Jan(2)	Z-Jan(3)	Z-Jan(4)	Z-Jan(5)
C10:0	**7.29**	4.79	2.74	–	**9.49**	**7.37**	**8.25**	**10.18**	1.71	**9.58**	5.12	**10.56**	**9.57**	3.85	2.49	**11.74**	**13.88**	3.18	2.57
C11:0	2.32	–	3.34	–	–	3.13	4.76	5.28	1.94	2.60	1.06	2.26	3.24	–	0.80	1.64	2.86	–	–
C12:0	1.65	–	4.45	3.75	–	3.09	3.49	**8.09**	3.15	2.29	1.25	4.61	2.8	–	0.87	2.42	2.16	–	–
C13:0	1.69	–	1.39	3.05	2.45	2.15	–	1.83	–	2.00	–	1.62	–	–	0.94	1.32	–	–	1.62
C14:0	**8.67**	**9.57**	**9.32**	**16.61**	**7.42**	**10.11**	**8.78**	3.58	5.54	**8.69**	5.72	2.94	4.36	**10.07**	6.43	**8.19**	**7.38**	4.71	**9.12**
C14:1w5	–	–	1.34	–	2.27	–	–	1.43	–	–	1.08	0.75	–	1.71	–	–	1.77	–	–
C15:0	–	–	1.93	2.91	–	–	–	1.23	–	–	–	–	–	2.08	0.73	1.32	1.54	–	1.35
C15:1w5-*cis*	–	–	1.55	2.57	–	–	–	–	–	1.70	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C16:0	**15.98**	**14.55**	**11.85**	**13.56**	**11.93**	**9.46**	**10.73**	**7.83**	**10.8**	**8.12**	**9.96**	**7.02**	**10.11**	**8.56**	**7.49**	**8.05**	**6.90**	5.31	**9.03**
C16:1w9	1.74	2.53	–	2.74	3.38	–	–	–	–	1.78	–	–	–	–	–	–	–	–	–
C17:0	–	–	–	–	2.19	–	–	–	1.51		–	–	–	–	0.54	–	–	–	–
C17:1w7-*cis*	1.43	2.89	–	–	–	–	–	–	2.46	1.89	–	–	–	1.42	–	–	–	–	–
C18:0	2.80	4.17	2.80	3.14	3.13	1.79	2.59	1.36	2.61	1.66	1.98	1.76	2.03	2.92	0.88	1.53	1.79	–	–
C18:1w9	**10.34**	**14.9**	**8.02**	**10.15**	**11.59**	**9.48**	**12.74**	**7.18**	**12.77**	**8.97**	**9.9**	**8.11**	**9.35**	**8.79**	3.66	4.11	4.66	3.42	4.85
C18:2w6	**9.52**	**13.92**	**9.47**	**9.15**	**5.49**	**7.74**	**11.35**	**6.50**	**10.24**	**9.00**	**11.06**	**9.38**	**12.72**	**10.82**	**14.73**	**11.25**	**10.94**	**12.38**	**16.99**
C18:3w3	**9.14**	**16.73**	**11.8**	**7.93**	5.04	**16.94**	**28.29**	**16.92**	**18.6**	**18.27**	**38.25**	**14.71**	**22.82**	**20.04**	**48.92**	**27.71**	**25.07**	**20.92**	**33.94**
C20:0	1.58	–	2.11	2.55	2.27	1.60	3.41	1.19	1.82	–	1.19	1.04	1.85	1.94	0.79	1.36	2.07	7.07	1.96
C20:1w9	–	–	–	–	–	–	–	–	1.8	–	1.21	–	–	–	–	1.35	2.19	6.56	–
C20:2	3.46	–	1.39	–	2.71	3.45	–	1.55	–	2.76	–	1.15	–	3.56	0.74	1.61	1.47	4.90	1.92
C20:3w6	–	–	–	–	2.85	1.97	–	–	1.53	2.32	–	–	–	1.58	–	–	1.52	3.27	1.72
C20:3w3	–	2.84	–	–	–	–	–	–	2.14	–	–	1.06	–	–	–	–	–	–	–
C20:5w3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.83	–	–	–	1.55	–	–	–
C22:0	–	–	–	–	2.41	–	–	–	–	–	–	–	–	2.70	–	–	–	–	–
C22:2	2.02		2.57	2.94	2.45	1.77	–	–	2.19	–	1.24	1.49	–	2.21	0.88	1.30	1.56	3.34	1.46
C23:0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.73	–
C24:0	–	–	–	–	2.93	3.89	–	1.79	–	–	–	1.97	–	3.28	–	–	–	–	–
Total identified (%)	**79.63**	**86.89**	**76.07**	**81.05**	**77.07**	**80.05**	**94.39**	**74.15**	**80.81**	**81.63**	**89.02**	**69.29**	**78.85**	**82.25**	**90.89**	**86.45**	**87.76**	**77.79**	**86.53**
∑SFA (%)	41.98	33.08	39.93	45.57	44.22	42.59	42.01	42.36	29.08	34.94	26.28	33.78	33.96	35.40	21.96	37.57	38.58	23.00	25.65
∑MUFA (%)	13.51	20.32	10.91	15.46	17.24	9.48	12.74	8.61	17.03	14.34	12.19	8.86	9.35	11.92	3.66	5.46	8.62	9.98	4.85
∑PUFA (%)	24.14	33.49	25.23	20.02	18.54	31.87	39.64	24.97	34.7	32.35	50.55	28.62	35.54	38.21	65.27	43.42	40.56	44.81	56.03
∑USFA (%)	37.65	53.81	36.14	35.48	35.78	41.35	52.38	33.58	51.73	46.69	62.74	37.48	44.89	50.13	68.93	48.88	49.18	54.79	60.88

Author's personal copy

Table 1 (continued)

Fatty acids components	Fatty acids composition (%)																	
	April				August					October					January			
	Z-Apr(1)	Z-Apr(2)	Z-Apr(3)	Z-Apr(4)	Z-Aug(1)	Z-Aug(2)	Z-Aug(3)	Z-Aug(4)	Z-Aug(5)	Z-Oct(1)	Z-Oct(2)	Z-Oct(3)	Z-Oct(4)	Z-Oct(5)	Z-Jan(1)	Z-Jan(2)	Z-Jan(3)	Z-Jan(4)	Z-Jan(5)
USFA/SFA (%)	0.90	1.63	0.91	0.78	0.81	0.97	1.25	0.79	1.78	1.34	2.39	1.11	1.32	1.42	3.14	1.30	1.27	2.38	2.37
Lipids yield (%) dw	1.83	1.74	3.32	3.44	1.88	1.33	1.90	1.68	3.37	2.67	2.80	1.54	3.96	3.53	2.76	1.94	2.50	4.12	3.49
Waxes in lipids (%) mass	60.64	57.89	54.50	9.47	45.39	62.33	66.75	11.53	68.09	68.96	60.66	51.07	23.03	66.17	54.08	59.85	59.92	52.39	66.63

$\sum SFA$ sum of saturated fatty acids, $\sum MUFA$ sum of mono-unsaturated fatty acids, $\sum PUFA$ sum of poly-unsaturated fatty acids, $\sum USFA$ sum of unsaturated fatty acids, *USFA/SFA* ratio "unsaturated/saturated" fatty acids

difference was found between April and both months of October and January. In conclusion, there is a significant difference between the winter (end of the year) and the spring (beginning of the year) for MUFA and PUFA contents.

The unsaturated fatty acids to saturated fatty acids ratio USFA/SFA (mean value) of was not steady, it increased slightly from April (1.05 ± 0.39%) to August (1.12 ± 0.41%) "In fact mean values were pretty close", then increased steeply to reach a maximum value of (2.09 ± 0.80%) in January "which was almost double to April" (Fig. 2b). These values reflected the oil beneficial best properties in the first stage of development (January). Finally, and due to the large variability of the USFA/SFA ratio in each season, no significant difference was observed between the investigated months. Similarly, no significant difference was obtained for SFA and ∑USFA during the season.

The overall values of USFA/SFA are suggested to vary from moderate to good values, and these values give the oils a good character of prevention to oxidation. In a more specific way, the MUFA are important because of their nutritional implications and their effect on the oxidative stability of the oil. These results suggested that the *P. lentiscus* oil leaves may serve as a potential dietary source of MUFA and PUFA. According to literature, it has been recognized that a diet rich in MUFA may be an alternative choice to a low-fat diet, which may lower blood cholesterol levels, modulates immune function decrease susceptibility of oxidation of LDL and improve the fluidity of HDL [39]. The PUFA-enriched diet may also be important for the structure and function of many membrane proteins, including receptors, enzymes, and active transport molecules [40].

In the case where the mean season values were considered for the evolution patterns of α-linolenic acid (C18:3), linoleic acid (C18:2), and oleic acid (C18:1), and when referring to Fig. 3, it is obvious that C18:3 is steeply increasing throughout the seasons (from spring until winter). For C18:2, the evolution pattern was a little bit different, starting with a slight decrease from spring to summer, then switching to steadily increasing toward winter. On the other hand, C18:1 took a different evolution course with the highest values recorded during April, August and October, and then a noticeable decrease in January. This state of evolution was consolidated by ANOVA analysis in which a significant difference between January and the rest of the months for C18:1 was confirmed. On the opposite side, and for C18:2, a significant difference was obtained this time between January and August. For the case of C18:3, a significant difference was obtained between April and January.

For C16:1 and C18:0, moderate decreases of mean values were observed from April until January. For C10:0 and C12:0 similar trends were observed (curved evolution), but maximum values differed according to the months for each component (October and August for C10:0 and C12:0,

Author's personal copy

Table 2 Range variation (statistic analysis) of fatty acid compositions of the lipids fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Fatty acids components	Fatty acids composition range variation (%)																			
	April				August				October				January				Studied season			
	Min.[a]	Max.[a]	Mean[a]	SEM[a]	Min.b	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.b	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.[b]	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.[b]	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]
C10:0	0.0	7.29	3.71	3.09	1.71	10.18	7.40	3.36	3.85	10.56	7.74	3.03	2.49	13.88	6.77	5.57	0.0	**13.88**	6.55	3.93
C11:0	0.0	3.34	1.42	1.69	0.0	5.28	3.02	2.15	0.0	3.24	1.83	1.29	0.0	2.86	1.06	1.21	0.0	5.28	1.85	1.67
C12:0	0.0	4.45	2.46	2.03	0.0	8.09	3.56	2.90	0.0	4.61	2.19	1.73	0.0	2.42	1.09	1.16	0.0	**8.09**	2.32	2.09
C13:0	0.0	3.05	1.53	1.25	0.0	2.45	1.29	1.19	0.0	2.00	0.72	1.00	0.0	1.62	0.78	0.75	0.0	3.05	1.06	1.02
C14:0	8.67	16.61	11.04	3.73	3.58	10.11	7.09	2.59	2.94	10.07	6.36	2.97	4.71	9.12	7.17	1.69	2.94	**16.61**	7.75	3.09
C14:1w5	0.0	1.34	0.34	0.67	0.0	2.27	0.74	1.06	0.0	1.71	0.71	0.73	0.0	1.77	0.35	0.79	0.0	2.27	0.54	0.79
C15:0	0.0	2.91	1.21	1.45	0.0	1.23	0.25	0.55	0.0	2.08	0.42	0.93	0.0	1.54	0.99	0.63	0.0	2.91	0.69	0.93
C15:1w5-*cis*	0.0	2.57	1.03	1.26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.70	0.34	0.76	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.57	0.31	0.75
C16:0	11.85	15.98	13.99	1.74	7.83	11.93	10.15	1.56	7.02	10.11	8.75	1.30	5.31	9.03	7.36	1.39	5.31	**15.98**	9.85	2.78
C16:1w9	0.0	2.74	1.75	1.25	0.0	3.38	0.68	1.51	0.0	1.78	0.36	0.80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.38	0.64	1.15
C17:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.19	0.74	1.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.54	0.11	0.24	0.0	2.19	0.22	0.60
C17:1w7-*cis*	0.0	2.89	1.08	1.38	0.0	2.46	0.49	1.10	0.0	1.89	0.66	0.92	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.89	0.53	0.96
C18:0	2.80	4.17	3.23	0.65	1.36	3.13	2.30	0.71	1.66	2.92	2.07	0.50	0.0	1.79	0.84	0.84	0.0	4.17	2.05	1.06
C18:1w9	8.02	14.90	10.85	2.90	7.18	12.77	10.75	2.40	8.11	9.90	9.02	0.66	3.42	4.85	4.14	0.62	3.42	**14.9**	8.58	3.29
C18:2w6	9.15	13.92	10.52	2.28	5.49	11.35	8.26	2.48	9.00	12.72	10.60	1.48	10.94	16.99	13.26	2.56	5.49	**16.99**	10.67	2.77
C18:3w3	7.93	16.73	11.40	3.90	5.04	28.29	17.16	8.26	14.71	38.25	22.82	9.11	20.92	48.92	31.31	10.92	5.04	**48.92**	21.16	10.85
C20:0	0.0	2.55	1.56	1.11	1.19	3.41	2.06	0.85	0.0	1.94	1.20	0.78	0.79	7.07	2.65	2.52	0.0	**7.07**	1.88	1.50
C20:1w9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.36	0.80	0.0	1.21	0.24	0.54	0.0	6.56	2.02	2.70	0.0	**6.56**	0.69	1.59
C20:2	0.0	3.46	1.21	1.64	0.0	3.45	1.54	1.56	0.0	3.56	1.49	1.62	0.74	4.90	2.13	1.61	0.0	4.90	1.61	1.50
C20:3w6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.85	1.27	1.25	0.0	2.32	0.78	1.10	0.0	3.27	1.30	1.37	0.0	3.27	0.88	1.14
C20:3w3	0.0	2.84	0.71	1.42	0.0	2.14	0.43	0.96	0.0	1.06	0.21	0.47	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.84	0.32	0.81
C20:5w3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.83	0.17	0.37	0.0	1.55	0.31	0.69	0.0	1.55	0.13	0.39
C22:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.41	0.48	1.08	0.0	2.70	0.54	1.21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.70	0.27	0.81
C22:2	0.0	2.94	1.88	1.31	0.0	2.45	1.28	1.20	0.0	2.21	0.99	0.97	0.88	3.34	1.71	0.95	0.0	3.34	1.44	1.07
C23:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.73	0.55	1.22	0.0	2.73	0.14	0.63
C24:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.89	1.72	1.74	0.0	3.28	1.05	1.51	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.89	0.73	1.32
Total identified (%)	76.07	86.89	80.91	4.50	74.15	94.39	81.29	7.78	69.29	89.02	80.21	7.16	77.79	90.89	85.88	4.87	69.29	94.39	82.14	6.24
∑SFA (%)	33.08	45.57	40.14	5.25	29.08	44.22	40.05	6.19	26.28	35.4	32.87	3.75	21.96	38.58	29.35	8.08	21.96	45.57	35.37	7.33
∑MUFA (%)	10.91	20.32	15.05	3.98	8.61	17.24	13.02	4.06	8.86	14.34	11.33	2.25	3.66	9.98	6.51	2.67	3.66	20.32	11.29	4.39
∑PUFA (%)	20.02	33.49	25.72	5.65	18.54	39.64	29.94	8.29	28.62	50.55	37.05	8.35	40.56	65.27	50.02	10.35	18.54	65.27	36.21	12.18
∑USFA (%)	35.48	53.81	40.77	8.74	33.58	52.38	42.96	8.77	37.48	62.74	48.39	9.26	48.88	68.93	56.53	8.49	33.58	68.93	47.50	10.18
USFA/SFA (%)	0.78	1.63	1.05	0.39	0.79	1.78	1.12	0.41	1.11	2.39	1.51	0.50	1.27	3.14	2.09	0.80	0.78	3.14	1.47	0.66
Lipids yield (%) dw	1.74	3.44	2.58	0.92	1.33	3.37	2.03	0.78	1.54	3.96	2.90	0.93	1.94	4.12	2.96	0.85	1.33	4.12	2.62	0.88

Author's personal copy

Table 2 (continued)

Fatty acids components	Fatty acids composition range variation (%)																							
	April				August				October				January				Studied season			
	Min.[a]	Max.[a]	Mean[a]	SEM[a]	Min.b	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.b	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.[b]	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]	Min.[b]	Max.[b]	Mean[b]	SEM[b]
Waxes in lipids (%) mass	9.47	60.64	45.62	24.23	11.53	68.09	50.82	23.76	23.03	68.96	53.98	18.60	52.39	66.63	58.57	5.63	9.47	68.96	52.60	18.15

∑*SFA* sum of saturated fatty acids, ∑*MUFA* sum of mono-unsaturated fatty acids, ∑*PUFA* sum of poly-unsaturated fatty acids, ∑*USFA* sum of unsaturated fatty acids, *USFA/SFA* ratio "unsaturated/saturated" fatty acids

[a]Number of samples used: n = 4

[b]Number of samples used: n = 5

respectively). C14:0 and C16:0 presented mostly similar trends of decreasing patterns. An exception was made for January, where a little increasing of C14:0 was observed.

On the opposite side of both C16:0 and C18:0, the following FA compounds C10:0, C12:0, C14:0, C16:1, C20:0 and C20:1, did not present any significant difference throughout the season. C16:0 showed significant differences between pairs made from April, August and January, whereas C18:0 showed a significant difference in January versus both April and August.

The identification of the FAMEs showed some clear variability of the composition of the leaves during the seasons. It should be noted that PUFA are essential to human development and health, moreover, they are highly important in cancer risk reduction, and also required to improve cardiovascular illnesses [41] and, due to their role in preventing inflammation and cerebrovascular diseases; they were also studied as potential therapeutic agents for neuroprotective effects [42].

It should be highlighted that α-linolenic acid was the dominant USFA in winter where it presented a maximum mean value of $31.31 \pm 10.92\%$, It is worth noticing that α-linolenic acid shows many protective effects (cardiovascular-protective, anti-cancer, neuroprotective, anti-osteoporotic, anti-inflammatory, and antioxidative effects) against a myriad of diseases [43]. Oleic acid was also present in relatively high amount in comparison with other MUFAs identified. More specifically, the highest average values of oleic acid were obtained for April and August with mean values of $10.85 \pm 2.90\%$ and $10.75 \pm 2.40\%$, respectively. According to a previous study, the oxidative stability of *P. atlantica* fruit oil was associated with a high content of oleic acid [44].

Regarding the saturated fatty acids SFA, and for all analysed samples, palmitic acid showed its highest mean value in spring ($13.99 \pm 1.74\%$), followed by myristic acid detected with a slightly lower mean percentage ($11.04 \pm 3.73\%$).

It was noted with interest that the significant proportion of α-linolenic acid found in the leaves was much more higher than those reported in previously published studies; thus, Yousfi et al. [45] and Benhassaini et al. [44] recorded 0.8%, and 0.42% respectively for *P. atlantica* fruit from Algeria. Samani et al. [46], reported 1.09% for Atlas pistachio seeds from Iran. Trabelsi et al. [22], registered 13.18% and 0.68% at the first and last stages of maturation for *P. lentiscus* fruit from Tunisia. Belyagoubi-Benhammou et al. [47], obtained 0.44% for *P. lentiscus* fruit from Algeria Belyagoubi-Benhammou et al. [47].

For a better understanding of similarities and/or differences between the studied samples in terms of FAs compositions, cluster analysis was performed using Agglomerative Hierarchical Clustering AHC. The results of AHC schemed in the dendrogram of Fig. 4, showed four clearly distinguished clusters (cluster 1: Z-Jan(1,5), Z-Oct(2)), (cluster 2:

Author's personal copy

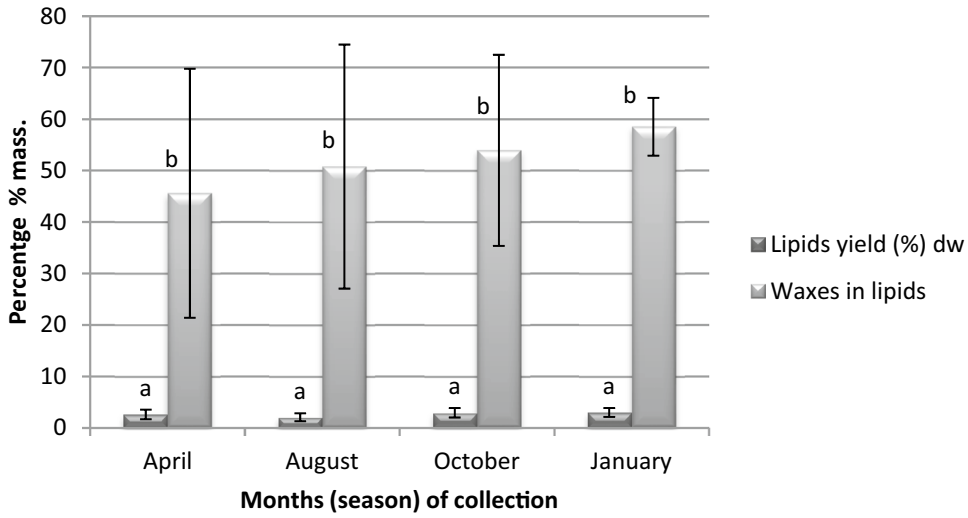


Fig. 1 Variation in lipids and waxes contents (mean value ± SEM of each season) of *Pistacia lentiscus* leaves. Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

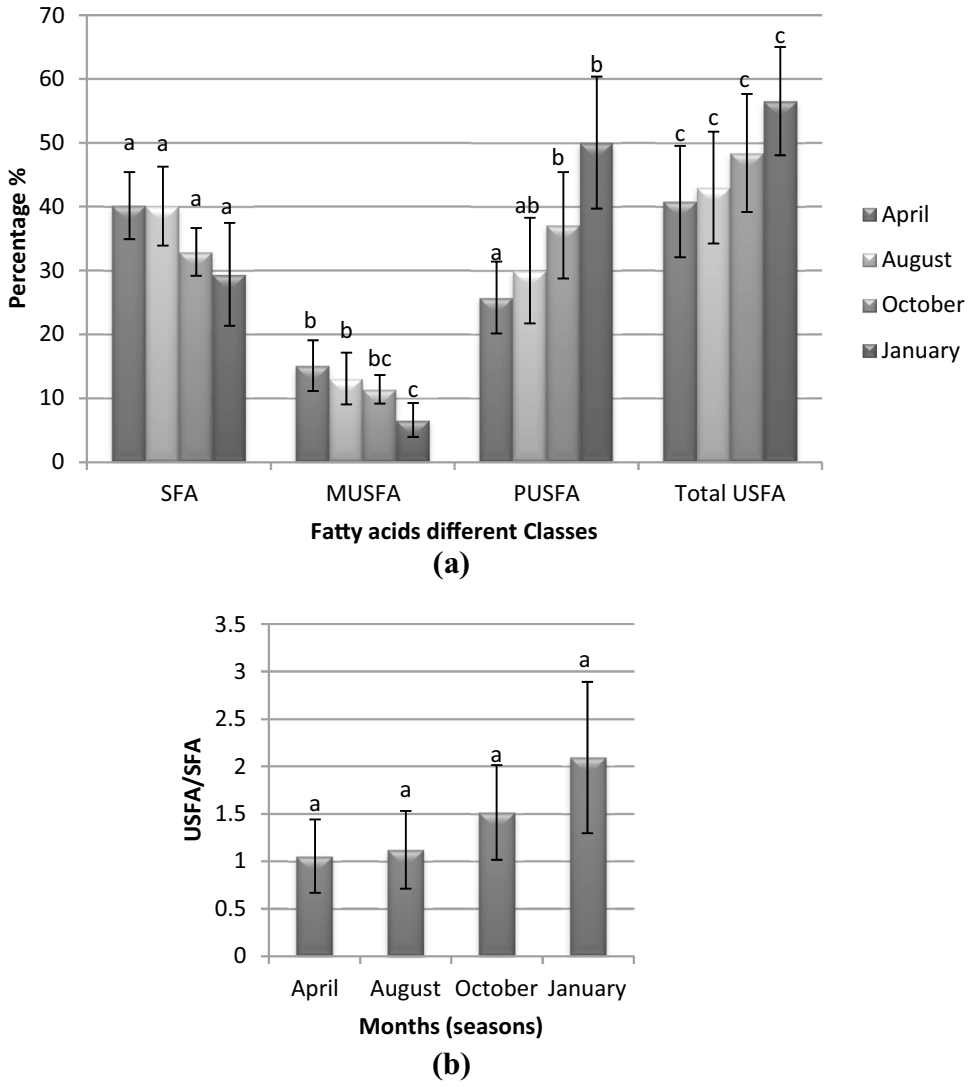


Fig. 2 Bars representation of the variation in different classes of fatty acids compositions of the *Pistacia lentiscus* leaves during different seasons (mean values ± SEM were considered). Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

Author's personal copy

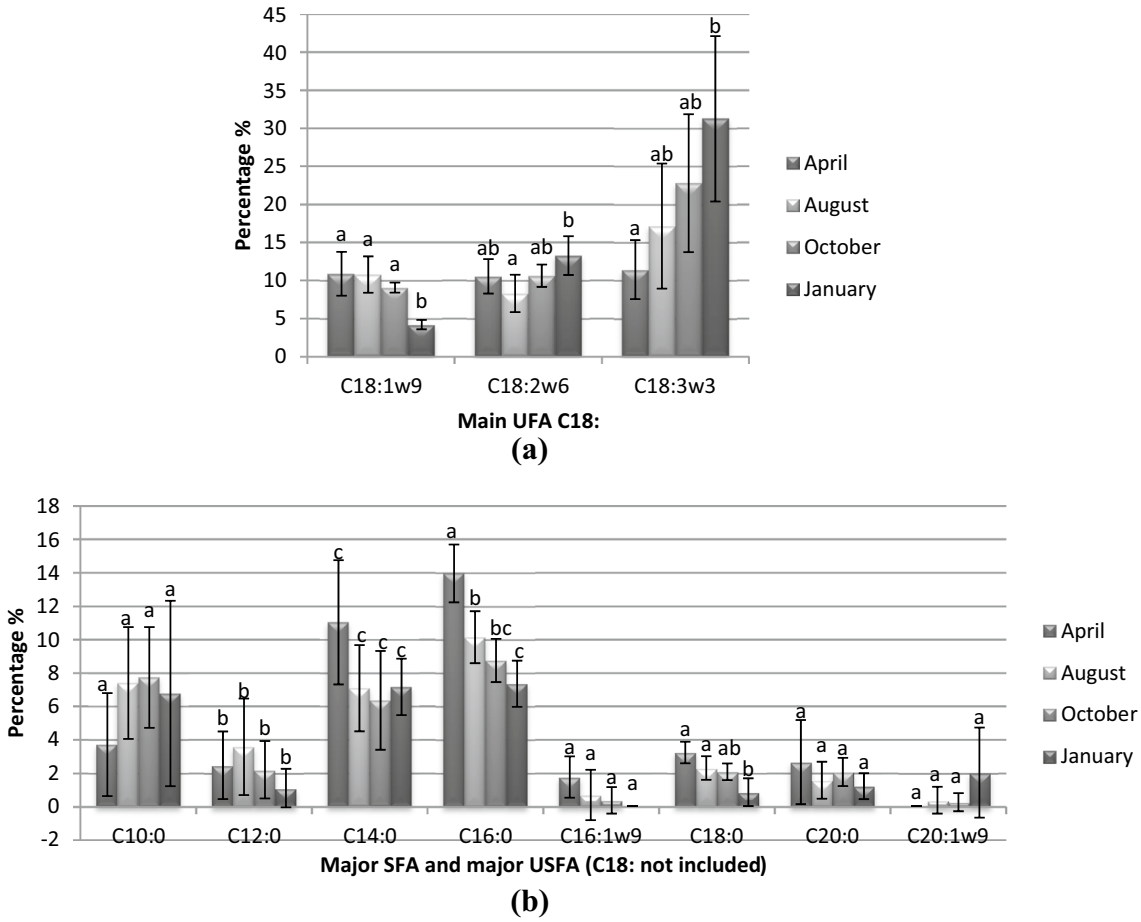


Fig. 3 Bars representation of the variation in main identified fatty acids compositions of *Pistacia lentiscus* leaves during different seasons (mean values ± SEM were considered). Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

Z-Jan(2,3,4), Z-Aug(3), Z-Oct(4)), (cluster 3: Z-Apr(1,3,4), Z-Aug(1)) and (cluster 4: Z-Apr(2), Z-Aug(2,4,5), Z-Oct(1,3,5)). Which indicated an existing dissimilarity of the studied samples (provide some evidence for the existence of some variability of the chemical composition). The variance decomposition for the optimal classification was: 35.03% within-class and 64.97% between-class. The different obtained clusters showed that there was no clear distinction between the different seasons for obtained classification, which endorsed the variability hypothesis and the biodiversity of the compositions for the FAs in this plant part.

Cluster 1 was characterized by the highest mean value of C18:3 (40.37 ± 7.71%), then this mean value decreased in the following order: cluster-2 > cluster-4 > cluster-3, with respective means values of 24.96 ± 3.15%, 17.46 ± 1.70% and 8.48 ± 2.80%. A similar trend was observed for C18:3, but in this case the differences of the mean percentage values between classes were quiet narrow: 14.26 ± 2.99%, 11.73 ± 0.77%, 9.66 ± 2.38% and 8.41 ± 1.95%, for clusters 1, 2, 4 and 3, respectively. Alternatively, both pairs of clusters 1 and 2 and 3 and 4 were presenting similar mean values of C18:1. For clusters 1 and 2, the values were 6.14 ± 3.31% and 6.86 ± 4.03%, respectively. The mean percentage value of C18:1 was a little higher for clusters 3 and 4: 10.03 ± 1.48% and 10.03 ± 2.77%, respectively. For C16:0 and C14:0, the three clusters 1, 2 and 4 were exhibiting similar percentages (C16:0 = 8.22–9.48%, C14:0 = 6.68–7.21%) which were a little bit lower than registered for cluster 3 (C16:0 = 13.33 ± 1.93%, C14:0 = 10.51 ± 4.15%). Finally, cluster 3 was distinguished with its higher percentage of C10:0 (9.32 ± 4.05%) in comparison with the rest of the clusters (3.39 ± 1.50%, 4.88 ± 4.30% and 6.86 ± 3.47% for clusters 1, 2, and 4, respectively).

Tocopherols and sterols

Tocopherols composition analysis

Tocopherols (vitamin E isoforms) are well known natural antioxidants whose presence in oils is often correlated with

Author's personal copy

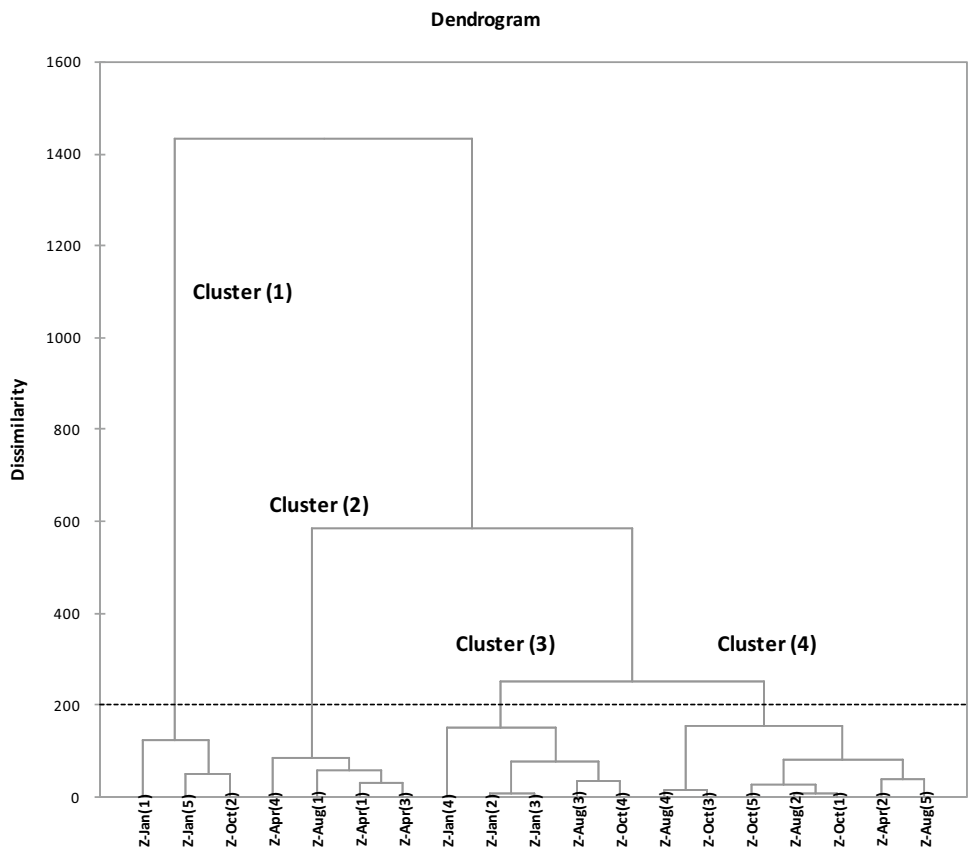


Fig. 4 Dendrogram obtained from a cluster analysis of nineteen samples of fatty acids of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves. Samples are clustered using Ward's technique with a Euclidean distance measure

a relatively high abundance of USFA. The result of the tocopherol percentages determined by HPLC analysis was exposed in Table 3. The data revealed that all investigated lipid samples contained a substantial amount of α-tocopherol "most important and requested vitamin", ranging from 30.97 to 97.57% (with "mean value" $\pm$ SD = 62.24 $\pm$ 19.57%). Furthermore, the γ-tocopherol was completely absent in all samples. For most investigated samples, the percentage of β-tocopherol was low (0.0–9.8% "minor compound"), except for samples Z-Jan(5), Z-Apr(3,4), where its percentage was relatively significant (13.93–28.18%). For δ-tocopherol, its percentage was moderately significant in the majority of studied samples (7.59–65.17%), except for sample Z-Apr(1) where its percentage was very low (2.43%).

For the three tocopherol isoforms, it seems that the standard variation boundary was very narrow for January (Winter) and August (Summer), which was the opposite for April (Spring) and October (Autumn) where the standard variation became sustainably larger (Fig. 5). For α-tocopherol, the variation of the mean percentage value seems to be constant for winter and spring, then decreased to reach similar values in summer and autumn (Fig. 5). This pattern was exactly the opposite of the case of δ-tocopherol. As a result, the maximum content of α-tocopherol was available in winter and spring, but the highest content of δ-tocopherol was reached in summer and autumn. The percentages of determined large arrays of tocopherols (isoforms) suggested the presence of some perceptible variability of the composition that in some cases overlaid the perception of the evolution throughout the seasons. The results ANOVA analysis showed that only δ-tocopherol presented a significant difference between August and both January & April.

Quantification of total tocopherol contents

The results of the quantification of total tocopherol content TTC in the dewaxed lipid fractions obtained from the leaves of *P. lentiscus* are summarized in Table 3. The total content for individuals varied widely from 1.75 to 9.49 mg/g, with a mean value of 3.93 $\pm$ 1.66 mg/g. This confirms the existence of some noticeable variability of the composition for the tested individuals. On the other side, the TTC mean value for investigated seasons showed pretty close values which were ranging from 3.71 to 4.42 mg/g, which was thereafter confirmed by statistical analysis (No significant differences was found between seasons) (Fig. 6). Similar trends were observed for the SD of waxes, and which were previously discussed above. In reality, no significant difference was obtained for TTC during the season.

Author's personal copy

Table 3 Tocopherols and sterols contents in the lipids fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Months of collection	Lipid samples codes	Total sterols content				Total tocopherols content				Tocopherols composition percentage (%)[a]		
		(mg/g lipids)		(µg/g leaves "d.w.")		(mg/g lipids)		(µg/g leaves "d.w.")		*α*-Toc	*β*-Toc	*δ*-Toc
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			
April	Z-Apr(1)	202.74	7.81	3715.12	0.14	3.30	0.06	100.7	10.5	97.57	nd	2.43
	Z-Apr(2)	245.01	0.47	4264.63	0.01	3.30	0.15	126.5	2.5	69.20	5.69	25.11
	Z-Apr(3)	263.85	20.75	8756.03	0.69	4.05	0.25	164.3	8.3	66.52	13.93	19.55
	Z-Apr(4)	295.00	6.72	10138.65	0.23	4.18	0.15	175.6	5.0	54.04	28.18	17.79
August	Z-Aug(1)	281.84	4.77	5305.66	0.09	9.49	0.17	245.7	3.2	65.28	2.72	32.00
	Z-Aug(2)	200.17	6.67	2659.72	0.09	4.49	0.04	59.7	0.5	67.80	nd	32.20
	Z-Aug(3)	200.47	3.92	3807.82	0.07	2.09	0.14	39.7	2.6	43.09	6.13	50.78
	Z-Aug(4)	228.83	1.72	3852.05	0.03	1.75	0.26	26.9	4.4	30.97	3.86	65.17
	Z-Aug(5)	232.77	13.62	7836.03	0.46	4.26	0.16	143.5	5.5	49.98	nd	50.02
October	Z-Oct(1)	188.47	6.07	5026.93	0.16	4.37	0.21	106.9	5.6	36.02	9.80	54.19
	Z-Oct(2)	171.13	9.33	4796.75	0.26	3.87	0.09	103.8	2.5	54.86	7.08	38.06
	Z-Oct(3)	203.66	2.86	3133.84	0.04	1.94	0.07	27.3	1.1	33.64	5.12	61.23
	Z-Oct(4)	177.33	4.13	7026.89	0.16	3.03	0.19	110.2	7.4	44.96	6.59	48.44
	Z-Oct(5)	147.70	2.04	5214.61	0.07	5.36	0.21	148.7	7.4	87.93	3.55	8.52
January	Z-Jan(1)	149.97	3.87	4132.83	0.11	4.54	0.32	125.0	8.9	75.99	3.90	20.10
	Z-Jan(2)	175.61	11.88	3404.18	0.23	4.61	0.19	89.4	3.7	89.17	3.24	7.59
	Z-Jan(3)	171.84	9.55	4302.18	0.24	3.20	0.16	80.1	4.0	79.06	4.34	16.60
	Z-Jan(4)	167.40	7.48	6897.34	0.31	3.70	0.10	152.4	4.3	77.97	4.35	17.68
	Z-Jan(5)	143.37	6.83	4997.30	0.24	3.15	0.10	110.0	3.5	58.51	14.02	27.47

nd not detected

[a]Percentages determined by integration of surface area using HPLC analysis technique

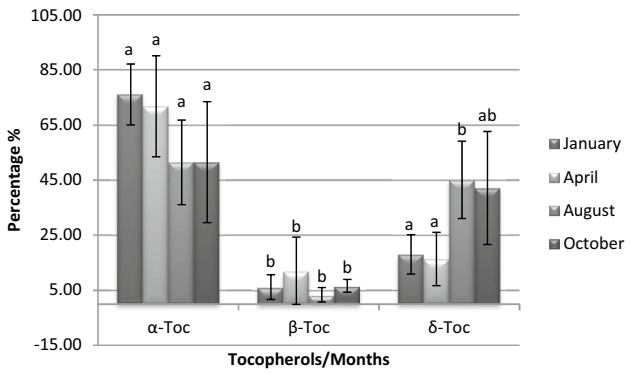


Fig. 5 Bars representation of the variation in identified tocopherol isomers compositions of *Pistacia lentiscus* leaves during different seasons (mean values ± SEM were considered). Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

Quantification of total sterol contents

Recently, the cosmetic, drug and alimentary/nutraceutical industries have focused attention on low-cost renewable resources, rich in lipid-related compounds such as phytosterols which are an important part of the unsaponifiable matter of vegetable oils. The analysis of the sterols provides rich information about the quality and the identity of the oil investigated, and for the detection of oil and mixtures not recognized by their fatty acids profile [21].

The results of the quantification of total sterol content TSC in the dewaxed lipid fractions obtained from the leaves of *P. lentiscus* are presented in Table 3. The leaves were very rich in TSC, since their content was by far more important than those of TTC. The total content changed notably from the lowest value of 173.7 to the highest one of 295.0 mg/g, with a mean value of 202.48 ± 44.73 mg/g.

The TTC mean values, corresponding to each month were decreasing gradually from April until January, with almost similar pace each season (Fig. 6). Moreover, it was observed that larges ranges of variations were recorded for the investigated seasons; besides, the corresponding standard deviation was decreasing from April to January. Finally, and at the opposite case of TTC, a significant difference between April-August and October-January was determined.

Author's personal copy

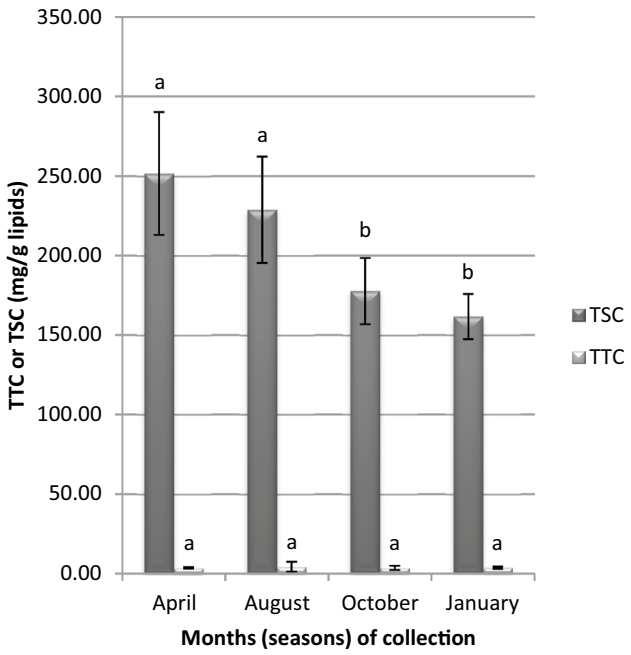


Fig. 6 Bars representation of the variation of total sterols and total tocopherols contents of *Pistacia lentiscus* leaves during different seasons (mean values ± SEM were considered). Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

Antioxidant activity

DPPH assay (*free radical scavenging activity)*

The antioxidant activity of the lipid fractions was determined in vitro using DPPH· (1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl) assay. The results are summarized in Table 4. The obtained values of IC_{50} suggested low antioxidant activity when compared to antioxidants of reference (vitamins C and E), but the overall values were very interesting in comparison with the majority of common lipid fractions. Besides, and since there was a low variability of the IC_{50} values for the different investigated samples, the overall range of IC_{50} values was tight (2.31–7.28 mg/mL), with a mean and an SEM of 4.09 ± 1.37 mg/mL.

Among tested samples, the minimum IC_{50} value recorded belonged to the sample Z-Aug(5) which exhibited the highest antioxidant activity. At the opposite side, the maximum IC_{50} value (reflecting this time the lowest antioxidant power) was registered for Z-Oct(3) sample.

Regarding the evolution of IC_{50} mean value during each month, it was noticed that August month presented the highest IC_{50} value (lowest activity). On the opposite side, the rest of the months which by the way were characterized by close activities, were exhibiting the highest activities (Fig. 7). In reality, no significant variation ($p < 0.05$) of the antioxidant power was obtained between the four months, which is logic, since SEM values were highly important for both August and October months and also since the difference between the minimum and maximum IC_{50} values was not substantial.

β-carotene bleaching test

The result of the *β*-carotene bleaching test was summarized in Table 4. The antioxidants of reference showed different responses in terms of their activity AA% (efficiency for 2 mg/mL extract). Explicitly, vitamin C presented very weak activity in comparison with the rest of the antioxidants, whereas BHA and BHT were very effective antioxidants. Furthermore, vitamin E was also exhibiting practically lower but close activity to both BHA and BHT. The range variation of AA% was noticeable, and was varying from 24.89 to 75.65%, which corresponds to a mean value of 47.65 ± 16.95%. The activities values were also expressed in terms of AA_{50}. In this case the the antioxidant activity AA_{50} of the lipid samples showed some variability of this efficiency ranging from 1.11 to 3.37 mg/mL; the lowest value (higher activity) was recorded for sample Z-Aug(2), whereas the highest one was registered for sample Z-Apr(3). Although, lipids presented very weak activity (AA%) in comparison with vitamin E, BHA and BHT, they presented close but higher than recorded for vitamin C.

Regarding the evolution of the mean AA_{50} value during the season, initially we could notice that the standard variations were this time very large for all studied months (large variability) in comparison with the previous case of DPPH assay. Second, the evolution trend was very similar to a fluctuation curve (sinusoidal). The AA_{50} values were alternating from a month to another, with the highest and similar mean activities for both August and January, then lowest and also similar activities for both April and October (Fig. 7). In reality, no significant variation of the antioxidant activity was obtained during the season.

Correlations

To determine possible existing correlations between the following variables: antioxidant activities (two assays), TTC, TSC, compositions of C18:1,2,3 and tocopherol isoforms (*α*, *β*, *δ*-Toc), a matrix correlation based on Pearson coefficient ($p < 0.05$) was determined using XLSTAT software. The results were gathered in Table 5. No significant correlation was obtained between the DPPH and *β*-carotene assays. A medium significant negative correlation was found between *α*-tocopherol and both DPPH (− 51.7%) and *β*-carotene (− 51.6%) assays. *β*-tocopherol exhibited medium but positive correlation with *β*-carotene (52.3%). The same case observed for *δ*-tocopherol with DPPH assay (54.7%). Besides, both isoforms *α*-tocopherol and *δ*-tocopherol were

Author's personal copy

Table 4 Seasonal variation of antioxidant activity (DPPH assay and β-carotene test) of the lipid fractions obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus*

Months of collection	Antioxidant activity						
	DPPH assay			β-carotene test			
	Sample codes	IC_{50} (mg/mL)		AA_{50} (mg/mL)		AA% (2 mg/mL)	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Lipid extract samples							
April	Z-Apr(1)	3.70	0.10	1.62	0.10	71.31	0.10
	Z-Apr(2)	4.38	0.30	2.63	0.08	36.31	0.08
	Z-Apr(3)	3.16	0.08	3.37	0.22	24.89	0.22
	Z-Apr(4)	3.88	0.05	2.97	0.10	31.55	0.10
August	Z-Aug(1)	3.72	0.03	1.23	0.04	75.65	0.04
	Z-Aug(2)	4.91	0.28	1.11	0.06	75.33	0.06
	Z-Aug(3)	6.11	0.12	2.83	0.01	33.49	0.01
	Z-Aug(4)	6.85	0.23	2.85	0.02	32.03	0.02
	Z-Aug(5)	2.31	0.05	2.08	0.01	47.82	0.01
October	Z-Oct(1)	2.61	0.04	2.25	0.11	43.57	0.11
	Z-Oct(2)	3.33	0.15	2.67	0.06	36.29	0.06
	Z-Oct(3)	7.28	0.32	3.22	0.51	26.40	0.51
	Z-Oct(4)	4.37	0.16	2.02	0.07	49.52	0.07
	Z-Oct(5)	2.44	0.08	1.63	0.03	61.80	0.03
January	Z-Jan(1)	3.62	0.35	1.53	0.04	61.61	0.04
	Z-Jan(2)	3.30	0.14	1.43	0.04	71.72	0.04
	Z-Jan(3)	3.87	0.30	2.59	0.07	37.24	0.07
	Z-Jan(4)	3.49	0.30	2.47	0.04	42.43	0.04
	Z-Jan(5)	4.44	0.02	2.21	0.02	46.40	0.02
Antioxidants of reference	Vitamin E	0.0110	0.0023	0.0021	0.0001	85.14	
	Vitamin C	0.0057	0.0007	–		0.71	
	BHA	–		–		96.00	
	BHT	–		–		96.62	

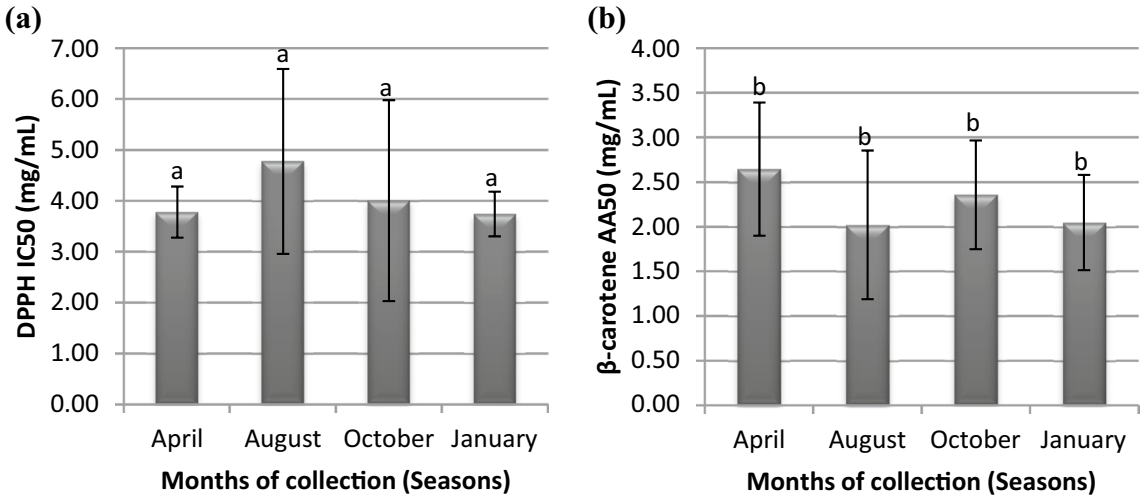


Fig. 7 Bars representation of the variation of antianxidant activity of lipids of *Pistacia lentiscus* leaves during different seasons (mean values ± SEM were considered). **a** DPPH assay; **b** β-carotene assay. Mean values followed by the same letter over experimental points are not significantly different ($p > 0.05$) according to Tukey's (Multiple Range Test)

Author's personal copy

Table 5 Correlation matrix (Pearson coefficient at $p < 0.05$) between antioxidant activities (DPPH assay and β-carotene test), C18:, tocopherol isomers (isoforms), TTC and TSC

	DPPH (IC_{50})	β-carontene (AA_{50})	α-Toc (%)	β-Toc (%)	δ-Toc (%)	TTC (mg /g lipids)	TSC (mg/g lipids)	C18:1w9 (%)	C18:2w6 (%)	C18:3w3 (%)
DPPH (IC_{50})	**1**	0.372	**− 0.517**	− 0.038	**0.547**	**− 0.547**	0.094	0.041	− 0.145	− 0.063
β-carontene (AA_{50})		**1**	**− 0.516**	**0.523**	0.352	**− 0.601**	0.282	0.081	0.038	− 0.107
α-Toc (%)			**1**	− 0.263	**− 0.942**	0.348	− 0.242	− 0.274	0.211	0.057
β-Toc (%)				**1**	− 0.075	− 0.088	0.357	− 0.020	0.129	− 0.120
δ-Toc (%)					**1**	− 0.329	0.127	0.290	− 0.263	− 0.017
TTC (mg /g lipids)						**1**	0.067	0.155	− 0.179	− 0.322
TSC (mg/g lipids)							**1**	**0.573**	**− 0.595**	**− 0.738**
C18:1w9 (%)								**1**	− 0.296	**− 0.457**
C18:2w6 (%)									**1**	**0.687**
C18:3w3 (%)										**1**

TTC total tocopherols content, *TSC* total sterols content, *Toc* tocopherol

Values in bold are different from 0 with a significance level $\alpha = 0.05$

negatively and strongly correlated (− 94.2%). Furthermore, TTC was correlated at a medium rate but negatively with both β-carotene (− 60.1%) and DPPH (− 54.7%). For TSC, it presented a good negative correlation with C18:3 (− 73.8%), and medium negative correlation with C18:2 (− 59.5%). Inversely, TSC showed also a medium but positive correlation with C18:1 (57.3%). Finally, C18:3 and C18:2 were mutually correlated with a good a coefficient (68.7%).

Conclusion

One of the objectives of the food industry is to provide the nutrients required for health (termed nutritional quality of food). Another important goal of this industry is to extend the period during which a food remains wholesome (the shelf life) by preservation techniques that inhibit microbiological or biochemical changes. For human health, fats and particularly vegetable oils are considered as an important source of energy when glucose is not available. Besides, the search for effective, natural compounds with antioxidant activity has been intensified in recent years to replace synthetic products with natural ones. The lipids of leaves of *P. lentiscus* were rich in different and very important USFAs: C18:2&3, but presented large variability of their composition: linoleic (2.94–16.99%), linolenic (5.04–48.92%) and oleic acid (3.42–14.90%), these FAs are known for their multiple dietary, pharmaceutical and clinical benefits. The naturally occurring fatty acid: conjugated linoleic acid (C18:2), presents different proprieties such as anti-atherogenic and anti-carcinogenic [48]. In the same context and besides its role in reducing cardiovascular disease risk, α-linolenic acid (C18:3) presents also dietary effects such as anti-inflammatory and antiatherogenic [49].

The evolution and the variability of lipids metabolites composition of leaves of *P. lentiscus* was investigated during several months representing mid-seasons of spring, summer, autumn and winter. Generally, this investigation results confirmed that the season has a significant effect on the present material metabolites (especially for some fatty acids components and δ-tocopherol isoform). PUFA reached their maximum content in autumn and winter. At the opposite of C18:1&2 which was significantly constant during the whole season, C18:3 percentage reached its highest value in winter. For palmitic acid, its percentage was the lowest in winter but rose to its highest value in spring. Besides, TSC reached also its highest content in spring. For tocopherols, it seems that the highest value of δ-Toc is obtained in summer. For α,β-Toc, it seems that their percentages were steady, although they presented large variability of their percentage compositions. Finally, TSC presented the highest average value in spring.

The large variability of metabolites compositions and their contents was recorded for each period of plant collection throughout a year (four seasons). This large variability overtook on the seasonal variation, which means that seasonal variation was less determining parameter in comparison with the variability for the majority of parameter variations studied. Finally, four different clusters fingerprinted the FA composition of the studied populations; these clusters were independent of the season of the collection.

The main result of this study illustrates the nutritional potential of the oil of *P. lentiscus* leaves, and gives valuable information about the optimal harvesting time of the lipid metabolites, which can provide opportunities for rational exploitation for medicinal purposes and in the food industries.

Author's personal copy

References

1. A. Rauf, S. Patel, G. Uddin, B.S. Siddiqui, B. Ahmad, N. Muhammad, Y. Mabkhot, T.B. Hadda, Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. Biomed. Pharmacother. **86**, 393–404 (2017)
2. A. Abidi, N. Aissani, H. Sebai, R. Serairi, N. Kourda, S. Ben Khamsa, Protective effect of *Pistacia lentiscus* oil against bleomycin-induced lung fibrosis and oxidative stress in rat. Nutr Cancer. **69**, 490–497 (2017)
3. M. Gündoğdu, F. Akdeniz, F.E. Özbek, S. Demirci, V. Adıgüzel, A promising method for recovery of oil and potent antioxidant extracts from *Pistacia khinjuk* Stocks seeds. Ind. Crops Prod. **83**, 515–521 (2016)
4. M.S. Naouar, L.Z. Mekki, L. Charfi, J. Boubaker, A. Filali, Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. Biomed. Pharmacother. **83**, 577–583 (2016)
5. A. Andreadou, S. Mitakou, S. Paraschos, P. Efentakis, P. Magiatis, L. Kaklamanis, M. Halabalaki, L. Skaltsounis, E.K. Iliodromitis, "*Pistacia lentiscus* L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. Phytomedicine **23**, 1220–1226 (2016)
6. J. Costa, I. Silva, A.A. Vicente, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Pistachio nut allergy: an updated overview. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **59**, 546–562 (2019)
7. D. Beghlal, K. El Bairi, I. Marmouzi, L. Haddar, B. Mohamed, Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). Asian Pac. J. Trop. Dis. **6**, 305–310 (2016)
8. N. Kalogeropoulos, A. Chiou, M.S. Ioannou, V.T. Karathanos, Nutritional evaluation and health promoting activities of nuts and seeds cultivated in Greece. Int. J. Food Sci. Nutr. **64**, 757–767 (2013)
9. I.I. Hacıbekiroğlu, P.K. Yılmaz, N. Hąimi, E. Kılınç, V. Tolan, U. Kolak, *In vitro* biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. Nat. Prod. Res. **29**, 444–446 (2015)
10. E. Hadjimbei, G. Botsaris, V. Goulas, V. Gekas, Health-promoting effects of Pistacia resins: recent advances, challenges, and potential applications in the food industry. Food Rev. Int. **31**, 1–12 (2015)
11. M. Yemmen, A. Landolsi, J. Ben Hamida, F. Megraud, M. Trabelsi Ayadi, Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia. Cell Mol. Biol. **63**, 87–95 (2017)
12. R.M. Ojeda-Amador, G. Fregapane, M.D. Salvador, Composition and properties of virgin pistachio oils and their by-products from different cultivars. Food Chem. **240**, 123–130 (2018)
13. L. Pantano, G. Lo Cascio, A. Alongi, G. Cammilleri, A. Vella, A. Macaluso, N. Cicero, A. Migliazzo, V. Ferrantelli, Fatty acids determination in *Bronte pistachios* by gas chromatographic method. Nat. Prod. Res. **30**, 2378–2382 (2016)
14. M. Lo-Presti, D. Sciarrone, M.L. Crupi, R. Costa, S. Ragusa, G. Dugo, L. Mondello, Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. Flavour Frag. J. **23**, 249–257 (2008)
15. H. Yıldırım, Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants. Sci. Hortic. **137**, 29–35 (2012)
16. D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam, A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod. Process. **89**, 217–233 (2011)
17. I.S. Nahida, A. Siddiqui, *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. **4**, 16–20 (2012)
18. S. Landau, H. Muklada, A. Markovics, H. Azaizeh, in Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East, ed. by Yaniv, Z. and Dudai, N. (Yaniv, Z. and Dudai, N., 2014), pP. 163–180
19. B. Kıvçak, S. Akay, Quantitative determination of α-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. Fitoterapia **76**, 62–66 (2005)
20. F. Mezni, C. Aouadhi, M.L. Khouja, A. Khaldi, A. Maaroufi, *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. Nat. Prod. Res. **29**, 565–570 (2015)
21. H. Trabelsi, F. Sakouhi, J. Renaud, P. Villeneuve, M.L. Khouja, P. Mayer, S. Boukhchina, Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (*Pistacia lentiscus*) fruits. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **114**, 968–973 (2012)
22. H. Trabelsi, O.A. Cherif, F. Sakouhi, P. Villeneuve, J. Renaud, N. Barouh, S. Boukhchina, P. Mayer, 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 (2012)
23. I. Mizi, S. Djedaia, Physico-chemical and biochemical properties of oil extracted from *Pistacia lentiscus*. Asian J Chem. **22**, 646–650 (2010)
24. N. Mekni, GC/MS chemical analysis of *Pistashia lentiscus* fatty oil from the north of Tunisia. Int. J. PharmTech Res. **3**, 2245–2248 (2011)
25. F. Mezni, A. Khaldi, A. Maaroufi, L. Hamrouni, M. Msallem, M. Boussaid, M.L. Khouja, Fatty acid composition and biological properties of the fixed oil of the fruits of *Pistacia lentiscus* L. Acta Hortic. **997**, 219–224 (2013)
26. F. Mezni, M.L. Khouja, S. Gregoire, L. Martine, A. Khaldi, O. Berdeaux, Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of *Pistacia lentiscus* edible oil. Nat. Prod. Res. **28**, 1225–1230 (2014)
27. F. Mezni, A. Labidi, M. Msallem, M. Boussaid, M. Khouja, A. Khaldi, Influence of harvest date on fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oils. J. Mater. Environ. Sci. **5**, 1703–1708 (2014)
28. I. Haouli, R. Seridi, S. Djemli, O. Bourdjiba, Contribution to the analysis of *Pistacia lentiscus* extracted oil. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. **15**, 1075–1081 (2015)
29. M. Charef, M. Yousfi, M. Saidi, P. Stocker, Determination of the fatty acid composition of acorn (Quercus), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. J. Am. Oil Chem. Soc. **85**, 921–924 (2008)
30. W. Dhifi, N. Jelali, E. Chaabani, M. Beji, S. Fatnassi, S. Omri, W. Mnif, Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. Afr. J. Agric. Res. **8**, 1395–1400 (2013)
31. F. Mezni, A. Labidi, M.L. Khouja, L. Martine, O. Berdeaux, A. Khaldi, Diversity of sterol composition in tunisian *Pistacia lentiscus* seed oil. Chem. Biodivers. **13**, 544–548 (2016)
32. O.F. Akdemir, E. Tilkat, A. Onay, C. Keskin, M. Bashan, F.M. Kilinç, V. Kizmaz, V. Süzerer, Determination of the fatty acid composition of the fruits and different organs of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). J. Essent. Oil Bear Plants **18**, 1224–1233 (2015)
33. S. Diamantoglou, M. Meletiou-Christou, Das jahresperiodische Verhalten des Rohfetts und der Fettsäuren in Rinden und Bläuern von *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* und *Pistacia vera*: The Lipid Content and Fatty Acid Composition of Barks and Leaves of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera* During the Course of a Year. Z. Pflanzenphysiol. **93**, 219–228 (1979)
34. M. Harrat, M. Benalia, N. Gourine, M. Yousfi, Variability of the chemical compositions of fatty acids, tocopherols and lipids antioxidant activities, obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria. Med. J. Nutr. Metab. **11**, 199–215 (2018)
35. I. Emmerie, C. Engel, Colorimetric determination of α-tocopherol (vitamin E). Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. **57**, 1351–1355 (1938)

Author's personal copy

36. M. Naudet, A. Hautfenne, Standardized method for the determination of total sterols in oils and fats (including the results from a collaborative study). Rev. Fr. Corps Gras. **33**, 167–170 (1986)
37. M.C. Barreto, Lipid extraction and cholesterol quantification: a simple protocol. J. Chem. Educ. **82**, 103 (2005)
38. A. Dib, M.-L. Fauconnier, M. Sindic, F. Belmekki, A. Assaidi, M. Berrabah, H. Mekhfi, M. Aziz, A. Legssyer, M. Bnouham, Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. BMC Complement. Altern. Med. **17**, 82 (2017)
39. B. Villa, L. Calabresi, G. Chiesa, P. Risè, C. Galli, C.R. Sirtori, Omega-3 fatty acid ethyl esters increase heart rate variability in patients with coronary disease. Pharmacol. Res. **45**, 475–478 (2002)
40. P. Yaqoob, Monounsaturated fatty acids and immune function. Eur. J. Clin. Nutr. **56**, S9–S13 (2002)
41. B. Chen, D.J. McClements, E.A. Decker, Design of foods with bioactive lipids for improved health. Annu. Rev. Food Sci. Technol. **4**, 35–56 (2013)
42. M. Walters, K. Hackett, E. Caesar, R. Isaacson, L. Mosconi, Role of nutrition to promote healthy brain aging and reduce risk of Alzheimer's disease. Curr. Nutr. Rep. **6**, 63–71 (2017)
43. K.-B. Kim, Y.A. Nam, H.S. Kim, A.W. Hayes, B.-M. Lee, α-Linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. Food Chem Toxicol. **70**, 163–178 (2014)
44. H. Benhassaini, M. Bendahmane, N. Benchalgo, The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. atlantica from Algeria. Chem. Nat. Compd. **43**, 121–124 (2007)
45. M. Yousfi, B. Nedjemi, R. Belal, D.B. Bertal, Étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien. Ol. Corps Gras Lipides **10**, 425–427 (2003)
46. H. Samani, H. Zareiforoush, Z. Lorigooini, B. Ghobadian, S. Rostami, E. Fayyazi, Ultrasonic-assisted production of biodiesel from *Pistacia atlantica* Desf. oil. Fuel **168**, 22–26 (2016)
47. N. Belyagoubi-Benhammou, L. Belyagoubi, A. El Zerey-Belaskri, A. Zitouni, N. Ghembaza, H. Benhassaini, F. Atik-Bekkara, A. Piras, D. Falconieri, A. Rosa, Fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. fruit fatty oil from Algeria. J. Food Meas. Charact. **12**, 1408–1412 (2018)
48. K.L. Houseknecht, J.P.V. Heuvel, S.Y. Moya-Camarena, C.P. Portocarrero, L.W. Peck, K.P. Nickel, M.A. Belury, Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the zucker diabetic Fattyfa/faRat. Biochem. Biophys. Res. Commun. **244**, 678–682 (1998)
49. G. Zhao, T.D. Etherton, K.R. Martin, S.G. West, P.J. Gillies, P.M. Kris-Etherton, Dietary α-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. J. Nutr. **134**, 2991–2997 (2004)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Cinquième séminaire international, les plantes aromatiques et médicinales , Djerba, Tunisie, 16-18 Décembre 2016

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES DES FEUILLES DU *Pistacia Lentiscus* L.

Mohamed HARRAT*, Sara BOUKHAKHAL, Nadhir GOURINE, Mohamed YOUSFI

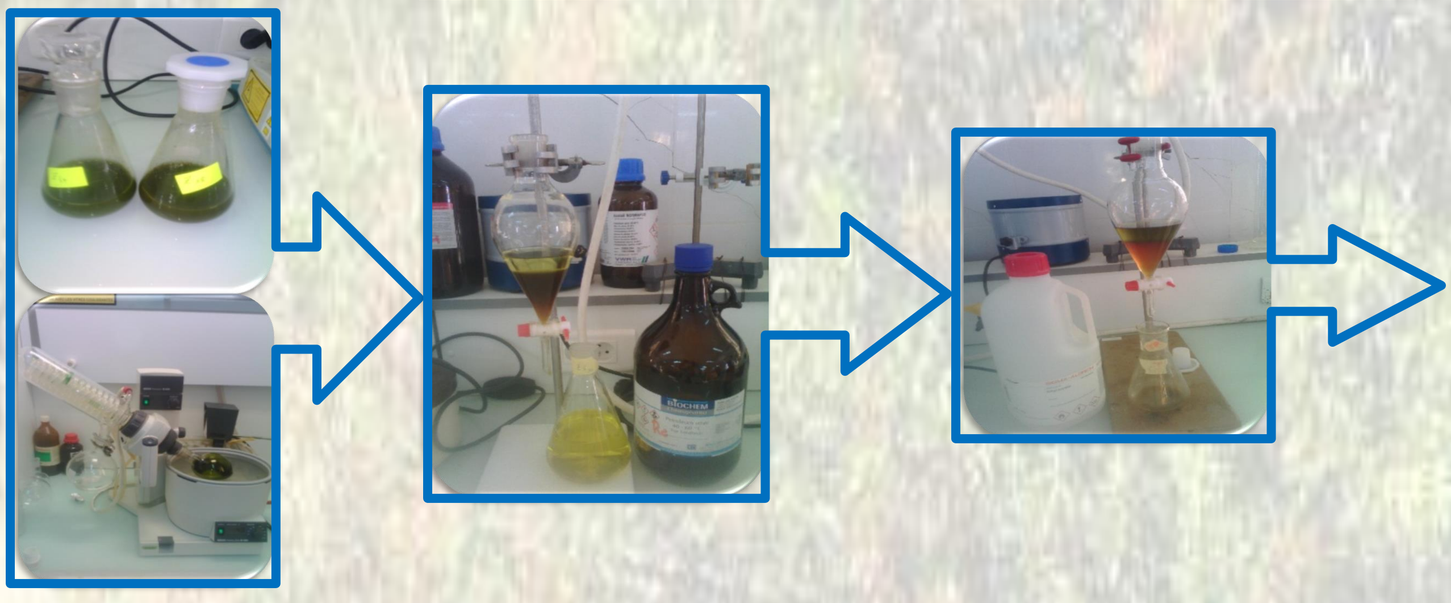
Laboratoire des Sciences Fondamentales à l'Université Amar TÉLIDJI, de Laghouat, Algérie
Adresse: Laboratoire : LSF, B.P. 37G, Université Amar TÉLIDJI, Laghouat, (03000) Algérie
Tél. & Fax: +213 29 92 00 66 E-mail : m.harrat@lagh-univ.dz*

Le lentisque est un arbuste qui pousse principalement autour du bassin méditerranéen:
Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte.
Europe : Portugal, Espagne, France, Corse, Sardaigne, Italie, Croatie, Albanie, Grèce, Turquie.
Asie : Iran, Irak, Syrie, Liban, etc. ,
à l'état sauvage dans les garrigues, les lieux boisés, le maquis, et les sols en friche. Cet arbre peut mesurer de 2 à 5 mètres de haut. Les feuilles de ce petit ligneux sont persistantes, paripennées, avec 4 à 10 folioles elliptiques, coriaces et luisantes et le pétiole est nettement ailé. On trouve des pieds mâles et femelles distincts (espèce dioïque) qui fleurissent en grappes denses en mois de Mai.

***Pistacia Lentiscus* est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. Les feuilles sont pourvues d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato-protective, expectorante et stimulante. Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires.**

Résultats

Macération → **Dépigmentation** → **Extraction liquide-liquide**



Etat physique, couleurs et rendements des extraits phénoliques

Échant	Aspect	Odeur	Couleur	Rendement d'extraction (%)	Concentration (g/l)
Z_{11}	Pate	Agréable	Vert	5.33	53.3
Z_{21}	Pate	Agréable	Vert	6.0	60.0
Z_{31}	Pate	Agréable	Vert	7.66	76.6
Z_{41}	pate	Agréable	vert	5.66	56.6
Z_{14}	Pate	Agréable	Vert	55.66	556.6
Z_{24}	Pate	Agréable	Vert	5.66	56.6

ÉVALUATION DE POUVOIR ANTIOXYDANT

L'activité antioxydante a été déterminée *in vitro* en utilisant deux essais différents : le test DPPH• (piégeage du radical libre *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) et le test PPM (la réduction des molybdates en Molybdène).

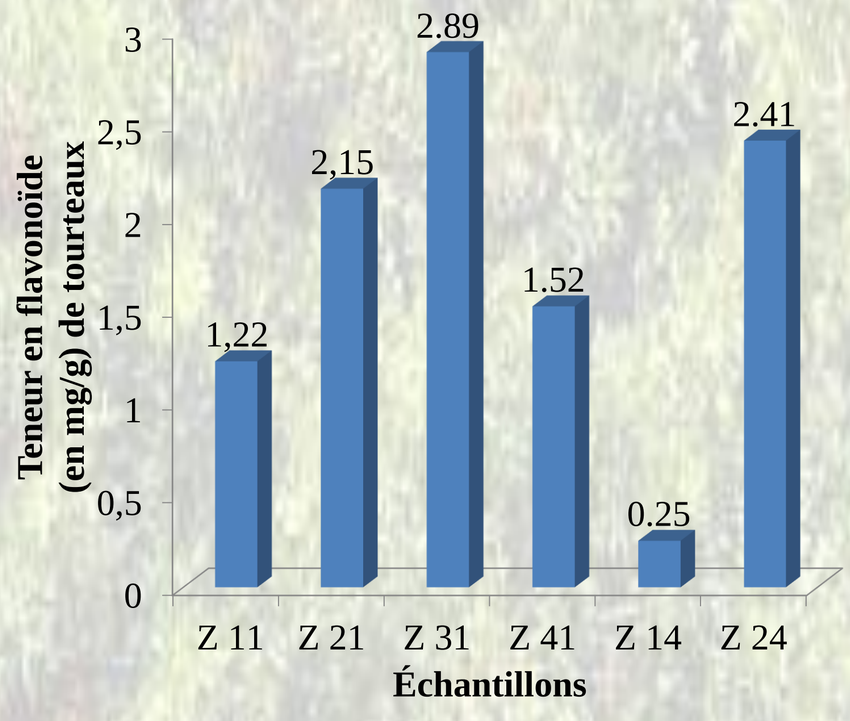
Les valeurs d'EC_{50} et de l'ARP des différents extraits dans les tests du DPPH

Échantillons	EC_{50} (g/L)	ARP (L/g)
Z_{11}	2.86	1.17
Z_{21}	0.72	1.38
Z_{31}	1.06	0.95
Z_{41}	0.47	2.13
Z_{14}	5.28	0.19
Z_{24}	1.43	0.70
Vitamin C	0.01	88.13
Vitamin E	0.02	47.45

Les valeurs d'EC_{50} et du l'ARP des différents extraits dans le test du PPM

Échantillons	EC_{50} (g/L)	ARP (L/g)
Z_{11}	2.6	0.19
Z_{21}	2.48	0.20
Z_{31}	2.18	0.22
Z_{41}	2.68	0.18
Z_{14}	37.06	0.03
Z_{24}	2.55	0.18
Vitamin C	0.09	11.25
Vitamin E	0.33	2.99

Teneur en flavonoïdes des différentes feuilles étudiées en mg/g de tourteaux



Conclusion

Les résultats obtenus montrent la richesse des feuilles du *Pistacia Lentiscus* en flavonoïdes, exprimés en équivalent de quercétine et qui varie dans l'intervalle (0,25-2,88)mg/g. Les résultats des tests de l'activité antioxydante (deux techniques DPPH et PPM) montrent que tous les extraits des échantillons étudiés présentaient des pouvoirs antioxydants assez importants. L'évaluation quantitative du pouvoir piégeur des extraits *vis-à-vis* du radicaux DPPH• montre que l'extrait Z_{41} est le plus actif, avec un EC_{50} de l'ordre de 0,47 g/L. En contre partie, le test de la capacité réductrice des ions (molybdène hexavalent) a montré que l'extrait Z_{14} est le meilleur réducteur avec une activité de l'ordre de 2,18 g/L.

Cinquième Séminaire International, Aridotech 2016 , Djerba, Tunisie, 19-21 Décembre 2016

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DES FEUILLES DU *Pistacia Lentiscus* L.

Mohamed HARRAT*, Sara BOUKHAKHAL, Nadhir GOURINE, Mohamed YOUSFI

Laboratoire des Sciences Fondamentales à l'Université Amar TÉLIDJI, de Laghouat, Algérie
Adresse: Laboratoire LSF, B.P. 37G, Université Amar TÉLIDJI, Laghouat, (03000) Algérie
Tel. & Fax: +213 29 90 00 66 E-mail : m.harrat@lagh-univ.dz*

Noms communs : Lentisque, arbre au mastic, pistachier lentisque, restincle

Nom Latin : *Pistacia lentiscus*

Famille : Anacardiacées (Anacardiaceae)

Nom Anglais : Mastic tree, lentisc, cyprus sumac, lentisk

Type de végétation: Arbuste ornemental à baies rustique jusqu'à -10°C

Sous-classe : Rosidae

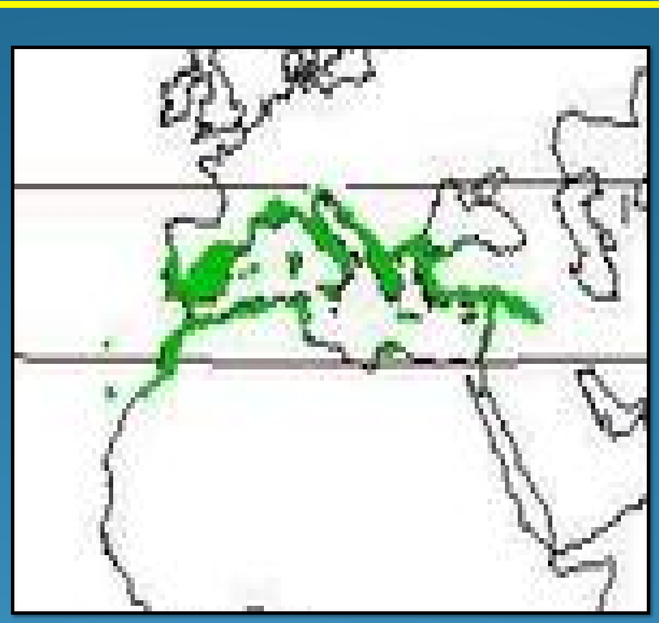
Mode de multiplication: Semis et bouturage

Destination: Jardin d'agrément, bac, haie libre

Ordre : Sapindales

Embranchement : Tracheobionta–plantes vasculaires

Nom commun en arabe : Darow



Répartition géographique :

Le lentisque est un arbuste qui pousse principalement autour du bassin méditerranéen :

Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye.

Égypte;

Europe : Portugal, Espagne, France, Corse, Sardaigne;

Italie, Croatie, Albanie, Grèce, Turquie;

Asie : Iran, Irak, Syrie, Liban, etc.;

à l'état sauvage dans les garrigues, les lieux boisés, le maquis, et les sols en friche.

Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques

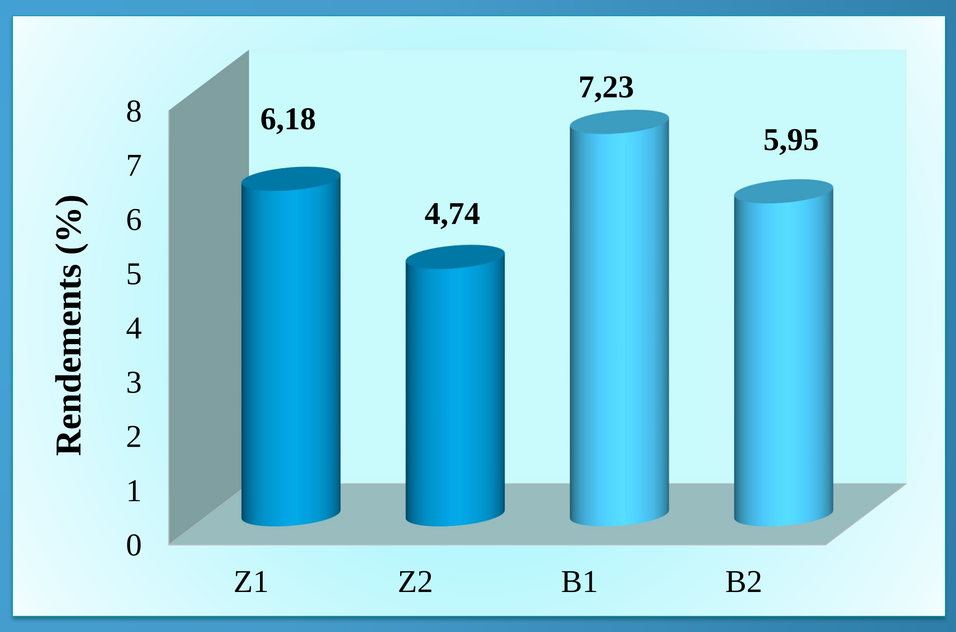
Pistacia lentiscus est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère. La partie aérienne de *Pistacia Lentiscus* est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques.

Les feuilles sont pourvues d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato-protective, expectorante et stimulante .

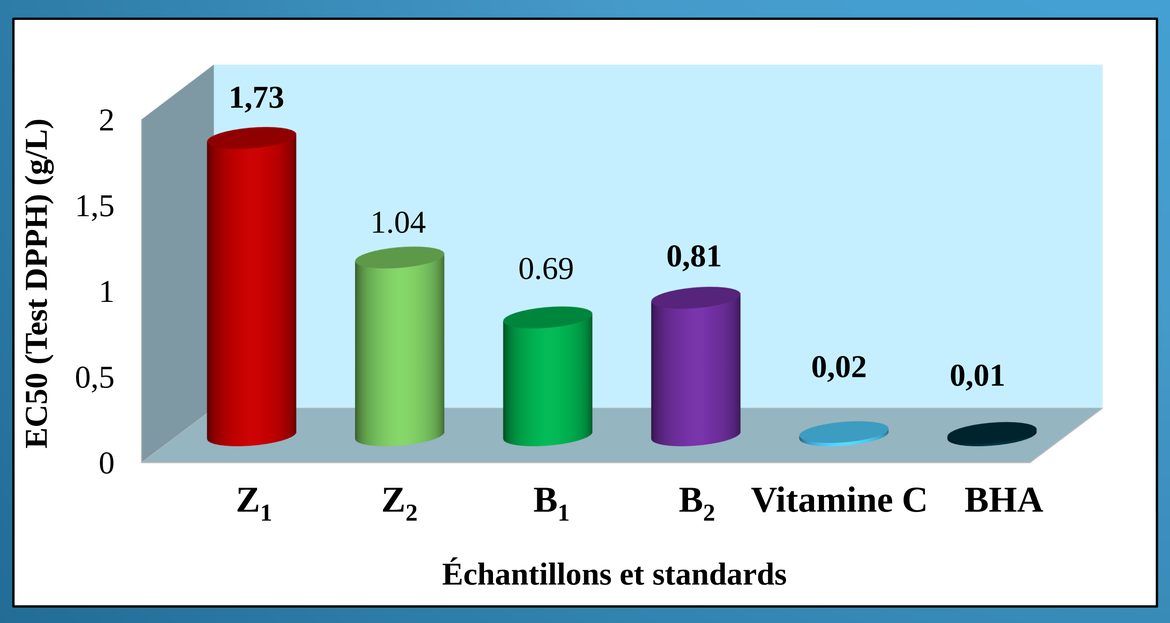
Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires.

Caractérisation des huiles extraites

Échantillons	Aspect	Couleur	I.A.	I.S.
Z_1	Visqueux	Jaune-marrant	10.01	196.97
Z_2	Visqueux	Jaune-marrant	9.13	197.21
B_1	Visqueux	Jaune-marrant	7.25	202.83
B_2	Visqueux	Jaune-marrant	6.21	205.26



Rendement de l'extraction des lipides.

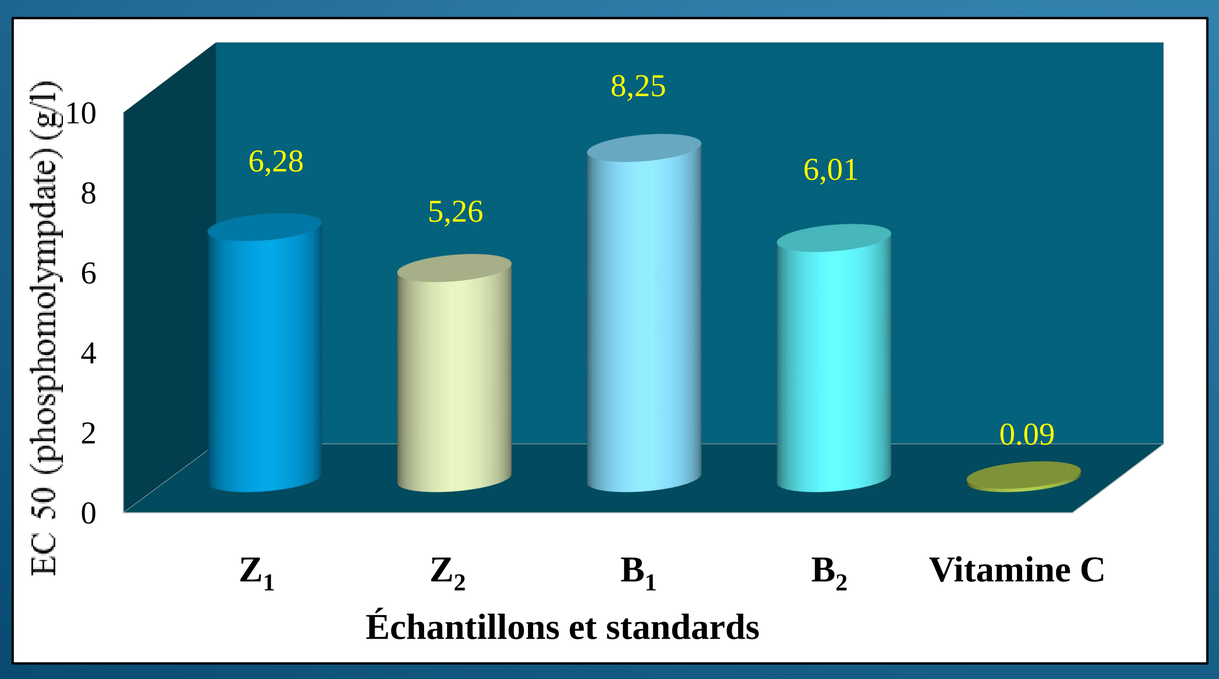


Comparaison des valeurs d'EC_{50} des extraits et des standards dans le test de DPPH

Conclusion

Pour le cas du test DPPH, les extraits lipidiques des feuilles en provenance de la région du Zéralda ont montré un pouvoir antiradicalaire assez important, avec des valeurs d'EC_{50} allant de 1,04 à 1,73 g/L. En plus, pour ceux qui concerne la région de Berrouaghia, les valeurs étaient meilleures, avec un EC_{50} varient entre 0,69 et 0,80 g/L; sachant que B_1 était l'extrait le plus efficace (EC_{50}=0,69g/L). Cependant, nous avons constaté que nos extraits se présentent comme des agents antioxydants relativement puissants par rapport à d'autres extraits de plantes déjà étudiés.

L'effet réducteur de nos extraits a été mis en évidence par une évaluation de leurs propriétés donatrice d'électrons pour faire passer l'ion molybdène du degré d'oxydation VI (Mo^{6+}) à un degré d'oxydation V (Mo^{5+}). A l'issue ce test, il apparaît que ces extraits, présentent des propriétés antioxydantes intéressantes et plus particulièrement pour l'extrait Z_2 (EC_{50} = 5.25g/L).



Comparaison des valeurs d'EC_{50} des extraits et des standards dans le test de PPM