

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Amar Telidji – Laghouat  
Faculté des Sciences



جامعة عمار تليدجي - الأغواط  
كلية العلوم

# Thèse de Doctorat

Présentée par

**HEFIED Fatiha**

Pour obtenir le diplôme de

**Doctorat en Sciences**

Spécialité : Biologie

THÈME

Etude de l'effet inhibiteur des extraits lipidiques et  
phénoliques des galles du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia  
atlantica* Desf.) sur quelques enzymes de l'hydrolase

Soutenue publiquement devant un jury composé de :

M. OUINTEN Mohamed	Pr	Université Amar Telidji-Laghouat	Président
M. KAMELI Abdelkrim	Pr	Ecole Normale Supérieure-Kouba-Alger	Examineur
M. HAKEM Ahcène	Pr	Université Ziane Achour/ CRAPast-Djelfa	Examineur
M. BOUTAIBA Saad	Pr	Université Ziane Achour-Djelfa	Examineur
M <sup>me</sup> ELHOUITI Fatiha	MCA	Université Amar Telidji-Laghouat	Examinatrice
M. YOUSFI. Mohamed	Pr	Université Amar Telidji-Laghouat	Directeur de thèse
M. BENAHMED. Ziyad	MCA	Université Amar Telidji-Laghouat	Co-Directeur de thèse

Année Universitaire 2021/2022

## *Dédicaces*

**A** mes très chers **parents**, aucune dédicace ne saurait exprimer  
l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour eux.

Qu'Allah le Tout-Puissant accorde à mon **père** sa sainte  
miséricorde et l'accueille dans son vaste Paradis.

**A** mes deux **frères** : Mohamed et Yacine, puissent nos liens  
fraternels se consolider et durer toute notre vie.

## Remerciements

Ce travail a atteint son terme grâce à l'assistance, la générosité, la bonne humeur et la collaboration de nombreuses personnes.

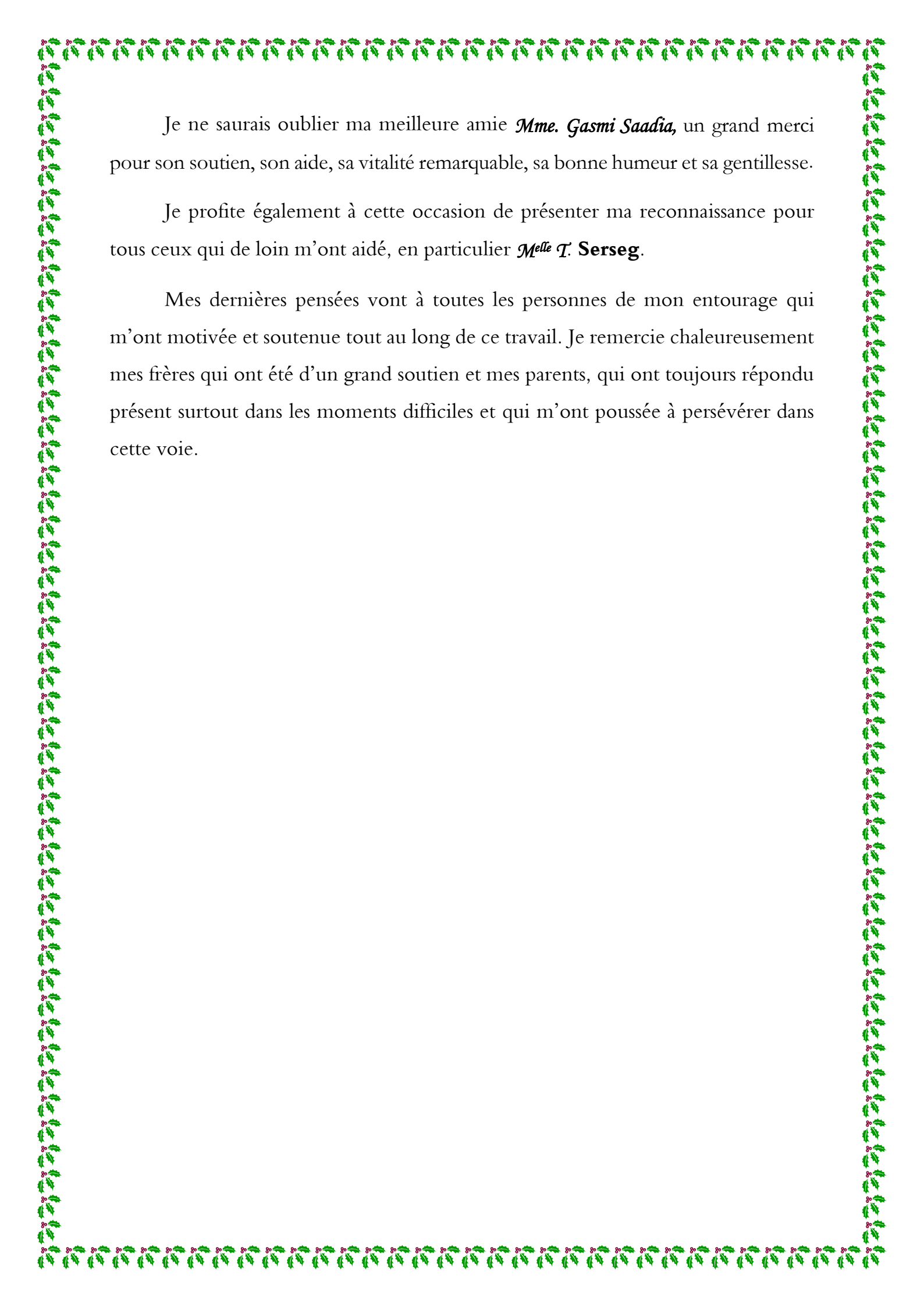
En premier lieu, je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse *Pr. M. Yousfi*, directeur de laboratoire de recherche des sciences fondamentales de l'Université de Laghouat, pour son inestimable aide, sa rigueur pour le travail bien fait, sa disponibilité aussi souvent que possible malgré ses multi tâches, ses précieux conseils et pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire.

Mes vifs remerciements et ma gratitude vont également au *Dr. Z. Ben-Ahmed*, co-directeur de thèse, pour avoir accepté de codiriger cette thèse, de m'avoir accordé toute la liberté nécessaire à l'accomplissement de ce travail et pour son aide précieuse.

Je tiens à remercier vivement chaque membre du jury d'avoir consacré leur temps à la lecture de cette thèse et m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mon respect.

Mon travail de recherche au laboratoire des sciences fondamentales a été particulièrement facilité, grâce aux deux personnes qui sont *M. M. Harrat et Melle M. Chelghoum*. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour leurs conseils pertinents, leur disponibilité et leur bonne humeur.

Je souhaite remercier aussi *M. K. Khalifa*, Directeur de l'Etablissement Public de santé de Proximité de Djelfa (EPSP), pour m'avoir autorisée à accéder au laboratoire de la polyclinique de Djelfa, afin d'utiliser le lecteur microplaques ELISA.



Je ne saurais oublier ma meilleure amie *Mme. Gasmi Saadia*, un grand merci pour son soutien, son aide, sa vitalité remarquable, sa bonne humeur et sa gentillesse.

Je profite également à cette occasion de présenter ma reconnaissance pour tous ceux qui de loin m'ont aidé, en particulier *M<sup>lle</sup> T. Serseg*.

Mes dernières pensées vont à toutes les personnes de mon entourage qui m'ont motivée et soutenue tout au long de ce travail. Je remercie chaleureusement mes frères qui ont été d'un grand soutien et mes parents, qui ont toujours répondu présent surtout dans les moments difficiles et qui m'ont poussée à persévérer dans cette voie.

## **Abstract**

The aim of this study is to evaluate the effects of gender, harvest period, growing region, and shapes of *P. atlantica* galls on the antioxidant activities and ability to inhibit the  $\alpha$ -amylase and acetylcholinesterase enzymes. A total of 24 samples, 10 divided into two groups (male and female galls) collected in 2010 and 14 samples of two shapes (spherical and semi-circular) of galls collected in 2016 in Laghouat region (Algeria) were used in this study. Thus, the fatty acid composition; the determination of sterols and tocopherols; the quantitative and qualitative analysis of phenolic compounds; the evaluation of antioxidant activities (DPPH<sup>\*</sup>, FRAP and ABTS<sup>+</sup>) and the  $\alpha$ -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity were carried out.

All the methanolic, lipids extracts and unsaponifiable fractions showed antioxidant and inhibitory activity of both enzymes. According to the results of the 2010 samples, phenolic compounds contents and antioxidant activity were high in September. While the 2016 samples, most of phenolics compounds, sterols and tocopherols contents and antioxidant activity were high in August. Also, methanolic extracts from spherical galls have a higher antioxidant activity than those from semi-circular galls. Whereas, in lipid extracts, the observation is reversed. The results of the *in vitro* study on the  $\alpha$ -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity allowed to identify the molecules by HPLC-MS and to perform a molecular docking in order to test the inhibitors on the two enzymes studied. Thus, the study of the nature of the interactions and the structure-activity relationship was carried out using the Autodock vina tool of five compounds identified from *P. atlantica* galls. In addition, molecular docking results revealed a difference in binding affinity of the five compounds with  $\alpha$ -amylase (from -9.5 kcal / mol to -5.7 kcal / mol) and with acetylcholinesterase (from -9.1 kcal / mol to -5.1 kcal / mol).

**Keywords:** Galls, *Pistacia atlantica*, Phenolic compounds, Lipids, Unsaponifiable fractions, Antioxidant activity, Inhibitory activity,  $\alpha$ -amylase, acetylcholinesterase, Molecular docking.

## الملخص

يهدف هذا العمل لدراسة مدى تأثير الجنس وتاريخ القطف والموقع الجغرافي وكذلك الأشكال لعفص البطم الاطلسي *P. atlantica* على النشاط المضادة للأكسدة وعلى تثبيط نشاط الإنزيمات الفا-الاميلاز والاسيتيل كولين استريز. تم في هذه الدراسة جمع 24 عينة مقسمة إلى مجموعتين (ذكور وإناث) تم قطفها عام 2010 و 14 عينة مقسمة إلى مجموعتين (كروية الشكل وشبه دائرية) تم قطفها عام 2016 في منطقة الأغواط (الجزائر). حيث تم تحديد التركيب من الأحماض الدهنية وحساب كمية المحتوى الكلي من الستيرولات والتوكوفيرولات و التحليل الكمي والنوعي للمركبات الفينولية كما تم دراسة النشاط المضادة للأكسدة باستعمال (اختبار DPPH<sup>•</sup>، اختبار FRAP، اختبار ABTS<sup>•+</sup>) والنشاط التثبيطي ل- الفا- الاميلاز والاسيتيل كولين استريز.

أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات الميثانولية والدهنية والمواد غير القابلة للتصبن تملك فعالية مضادة للأكسدة ونشاط تثبيطي لكلا الإنزيمين. وفقاً لنتائج عينات 2010، محتوى المركبات الفينولية والانشطة المضادات للأكسدة تكون مرتفعة في شهر سبتمبر. اما فيما يخص عينات 2016 سجلت أحسنها في شراوت. في حين اظهرت تشير العفصات الكروية نشاط اقوى بالمقارنة مع العفصات شبه دائرية الشكل. بينما، في المستخلصات الدهنية، تتعكس الملاحظة.

تم تحديد المركبات الكيميائية للمستخلصات الفينولية باستعمال تقنية HPLC-MS وإجراء الالتحام الجزيئي من أجل اختبار المثبطات على الإنزيمين. من خلال هذا العمل قمنا بدراسة طبيعة الروابط المتشكلة وطريقة التفاعل بين المركبات وانزيمات باستخدام برنامج Autodock vina. بالإضافة إلى ذلك ، تحصلنا على فوارق في ألفة هذه المثبطات اتجاه الفا- الاميلاز (تتراوح قيمها بين -9.5 كيلو كالوري / مول و -5.7 كيلو كالوري / مول) واتجاه الاسيتيل كولين استريز (تتراوح قيمها بين -9.1 كيلو كالوري / مول و -5.1 كيلو كالوري / مول).

**الكلمات المفتاحية:** عفصة، *Pistacia atlantica*، المركبات الفينولية ، الدهون ، المواد غير القابلة للتصبن ، النشاط المضاد للأكسدة ، التثبيط الانزيمي، الفا-الاميلاز، الاسيتيل كولين استريز، الالتحام الجزيئي.

## Résumé

Le présent travail a pour objectif d'étudier les effets du genre, la période de récolte, les différentes localités et la forme des galles de *P. atlantica* sur l'activité antioxydante et sur la capacité à inhiber les deux enzymes  $\alpha$ -amylase et acétylcholinestérase. Un total de 24 échantillons a été utilisé dans cette étude, 10 divisés en deux groupes (galles mâles et galles femelles) récoltés en 2010 et 14 autres divisés en deux groupes selon la forme des galles (sphérique et semi-circulaire) récoltés en 2016 dans la région de Laghouat (Algérie). Ainsi, l'analyse de la composition en acides gras ; le dosage des stérols et tocophérols ; l'analyse quantitative et qualitative des composés phénoliques ; l'évaluation des activités antioxydantes par le biais des trois tests (DPPH<sup>•</sup>, FRAP et ABTS<sup>•+</sup>) et l'activité inhibitrice de  $\alpha$ -amylase et l'acétylcholinestérase ont été réalisées.

Tous les extraits étudiés ont présenté une activité antioxydante et inhibitrice des deux enzymes. D'après les résultats des échantillons 2010, les teneurs en composés phénoliques et les activité antioxydante ont été élevées au mois de septembre. Tandis que les échantillons de 2016, la plupart des teneurs en composés phénoliques, stérols, tocophérols et activité antioxydante ont été élevées au mois d'août. Également, les extraits méthanoliques des galles sphériques présentent une activité antioxydante plus élevée que celles des galles semi-circulaires. Alors que, chez les extraits lipidiques, le constat est inversé. Les résultats de l'étude *in vitro* sur l'activité inhibitrice de  $\alpha$ -amylase et l'acétylcholinestérase ont incité à identifier les molécules par HPLC-MS et d'effectuer une modélisation par amarrage moléculaire afin de tester les inhibiteurs sur les deux enzymes étudiées. Ainsi, l'étude de la nature des interactions et la relation structure-activité ont été effectuées à l'aide de l'outil Autodock vina de cinq composés identifiés à partir des galles de *P. atlantica*. De plus, les résultats de l'amarrage moléculaire ont révélé une différence d'affinité de liaison de ces cinq composés avec l' $\alpha$ -amylase (de -9,5 kcal / mol à -5,7 kcal / mol) et avec l'acétylcholinestérase (de -9,1 kcal / mol à -5,1 kcal / mol).

**Mots-clés** : Galles, *Pistacia atlantica*, Composés phénoliques, lipides, Fractions insaponifiables, Activité antioxydante, Activité inhibitrice,  $\alpha$ -amylase, acétylcholinestérase, Amarrage moléculaire.

## Liste des travaux scientifiques achevés dans le cadre de cette thèse de Doctorat

### Publications internationales

---

-**Fatiha Hefied**, Ziyad Ben Ahmed, Mohamed Yousfi. In vitro antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of methanolic and lipid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. Galls. Journal of food processing and preservation, 2020, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14956>.

-Ziyad Ben Ahmed, **Fatiha Hefied**, Mohamed Yousfi, Kristiaan Demeyer, Yvan Vander Heyden. Study of the antioxidant activity of *Pistacia atlantica* Desf. Gall extracts and evaluation of the responsible compounds. Biochemical Systematics and Ecology, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104358>.

### Communications internationales

---

-**F. HEFIED**, Z. Ben Ahmed, M. Yousfi. Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante des galls de Pistachier de l'Atlas. SIPM-2018 (Séminaire International sur les Plantes Médicinales), organisé du 17 au 18 janvier 2018 à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued.

-**F. HEFIED**, Z. Ben Ahmed, M. Yousfi. Influence of Harvest Date on the Total Phenol Content and the Antioxidant Activity of *Pistacia atlantica* galls. III AIAC-2018-Algeria (the Third Africa International Allelopathy Congress, Blida, Algeria, 24-26 November, 2018).

-M. Chelghoum, H. Guenane, **F. HEFIED**, M. Yousfi. Total tocopherols and carotenoids composition of *Pistacia atlantica* Desf. leaves crude oils and their antioxidant activity from two different regions in Laghouat-Algeria". The 3<sup>rd</sup> International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) organized in University of Larbi Tebessi-Tebessa (Algeria) on February 25 to 27, 2020.

# Liste des abréviations

## A

---

**AA** : Acide aminé  
**ABTS**: 2,2'Azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid  
**A $\beta$**  :  $\beta$ -amyloïde  
**AC** : Anhydride acétique  
**ACh**: Acétylcholine  
**AChE**: Acétylcholinestérase  
**ACP**: Analyse des composants principaux  
**ADN**: Acide désoxyribonucléique  
**AG** : Acide gras  
**AGE** : Produits avancées de glycation  
**AGI** : Acide gras insaturés  
**AICD** : App Intracellular Domain  
**AlCl<sub>3</sub>**: Chlorure d'aluminium  
**ALH**: Accepteurs de liaisons hydrogène  
 **$\alpha$ -TH**:  $\alpha$ -tocophérol  
**AMPA**:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
**ANOVA**: Analysis of variance  
**APP**: Amyloid Precursor Protein  
**Apo**: Apolipoprotéine  
**ATP**: Adénosine triphosphate

## B

---

**BCh**: Butyrylcholine  
**BchE**: Butyrylcholinestérase  
**BHA**: Butylhydroxyanisole  
**BHT**: Butylhydroxtoluène  
**BDNF**: Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau

## C

---

**CA** : Capacité antioxydante  
**CLHP/HPLC**: Chromatographie Liquide à Haute Performance/ High Performance Liquid Chromatography)  
**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse  
**CPT**: Composés phénoliques totaux  
**Car** : caroténoïdes

## D

---

**DAG** : diacylglycérols  
**DLH** : Donneurs de liaisons hydrogène  
**DNF** : Dégénérescences neurofibrillaires  
**DNS**: Acide 3,5-dinitrosalicylique  
**DPPH**: 2, 2- Diphényl-1-Picrylhydrazyl  
**DTNB**: 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid

## E

---

**EAAT**: Transporteurs d'acides aminés excitateurs  
**EeAChE**: Acétylcholinestérase de l'*Electrophorus electricus*  
**EL** : Energie de liaison  
**ELB** : Extrait lipidique brute  
**EMAG** : Esters méthyliques d'acides gras  
**ERA** : Espèce réactive d'azote  
**ERO**: Espèce réactive d'oxygène  
**ESI**: Electrospray ionization  
**eV** : électron-Volt

## F

---

**FeCl<sub>3</sub>**: Chlorure de fer  
**FI**: Fraction insaponifiable  
**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power  
**FT**: Flavonoïdes totaux

## G

---

**GLUT4**: Transporteur de glucose 4  
**GSH**: Glutathion réduit  
**GSSG**: Glutathione disulfide

## H

---

**HbA1C** : Hémoglobine glyquée  
**Hcl**: Acide chlorhydrique  
**HDL**: High-density lipoprotein  
**HuAChE**: Acétylcholinestérase humaine  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

## I

---

**IAA:** Inhibition de l'activité  $\alpha$ -Amylase  
**IAAChE:** Inhibition de l'activité Acétylcholinestérase  
**IC50:** Concentration inhibitrice à 50%  
**IFN:** Interférons  
**IRM:** Imagerie par Résonance Magnétique

## L

---

**LCR:** Liquide Céphalo Rachidien  
**LDL:** Low-density lipoprotein  
**LOOH:** Hydroperoxyde  
**LR:** Liaisons rotatives

## M

---

**MA:** Maladie d'Alzheimer  
**mGluR:** metabotropic Glutamate Receptors  
**MS:** Mass spectrometry

## N

---

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Bicarbonate de sodium  
**NADH:** Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NaOH:** Hydroxyle de sodium  
**NF- $\kappa$ B:** Facteurs inflammatoires des cytokines  
**NMDA:** N-méthyl-D-aspartate  
**NO•:** Oxyde nitrique  
**NO<sub>2</sub>:** Dioxyde d'azote  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** peroxydinitrite

## O

---

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxygène singulet  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Anions superoxyde  
**OGT:** O-GlcNAc transférase (OGT) : O-Glycosyl N-acetylglucosamine transférase  
**OH•:** radical hydroxyle  
**OMS:** Organisation mondiale de santé

## P

---

**PDB:** Protein Data Bank  
**PI:** Pourcentage d'inhibition  
**pg/ml :** picogramme par millilitre  
**PKC:** Protéine kinase C  
**PM:** Poids moléculaire

## Q

---

**Q-TOF:** Quadrupole time-of-flight

## R

---

**RAGE:** Récepteurs de produits avancés de glycation  
**RE:** Réticulum endoplasmique  
**RO5:** Règle de cinq de Lipinski  
**ROO•:** Radical peroxyde

## S

---

**SNC:** Système nerveux central  
**SNP:** Système nerveux périphérique  
**SOD:** Superoxyde dismutase  
**ST:** Stéroïds totaux

## T

---

**TEP:** Tomographie par émission de positrons  
**TC:** Tanins condensés  
**TG:** Triglycérides  
**TNB :** 2-nitro-5-thiobenzoic acid  
**TNF $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha  
**TPTZ :** 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine  
**TT:** Tocophérols totaux

## U

---

**UDP N-acetyl-glucosamine:** Uridine diphosphate N- N-acetyl-glucosamine  
**UPLC:** Ultra performance liquid chromatography  
**UV:** Ultra-violet

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01</b>	Classification botanique de <i>Pistacia atlantica</i> Desf. (Benaradj, 2017).	<b>7</b>
<b>Tableau 02</b>	Travaux antérieurs d'intérêt médicale sur l'espèce <i>Pistacia atlantica</i>	<b>17</b>
<b>Tableau 03</b>	Les caractéristiques des échantillons de galles de <i>P. atlantica</i> récoltés en 2010.	<b>82</b>
<b>Tableau 04</b>	Les caractéristiques des échantillons de galles de <i>P. atlantica</i> récoltés en 2016.	<b>83</b>
<b>Tableau 05</b>	Rendement des extraits hexaniques (lipides) des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>98</b>
<b>Tableau 06</b>	Rendement des extraits méthanoliques brutes des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2010.	<b>99</b>
<b>Tableau 07</b>	Rendement des extraits méthanoliques brutes des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>100</b>
<b>Tableau 08</b>	Pourcentage des acides gras constitutifs des extraits lipidiques des galles de <i>P. atlantica</i> .	<b>102</b>
<b>Tableau 09</b>	Teneurs en tocophérols totaux (TT) et stérols totaux (ST) dans les différents extraits des galles de <i>P. atlantica</i> récoltés en 2016.	<b>104</b>
<b>Tableau 10</b>	Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes totaux (FT) et tanins condensés totaux (TCT) dans les différents extraits des galles de <i>P. atlantica</i> récoltés en 2010 et en 2016.	<b>108</b>
<b>Tableau 11</b>	Activités antioxydantes des extraits méthanoliques de galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2010.	<b>110</b>
<b>Tableau 12</b>	Activités antioxydantes des extraits méthanoliques et hexaniques des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>112</b>
<b>Tableau 13</b>	Données UPLC-ESI-QTOF-MS pour les composés phénoliques identifiés pour l'extrait analysé de galles de <i>P. atlantica</i> .	<b>116</b>
<b>Tableau 14</b>	Les paramètres cinétiques de $\alpha$ 'amylase d' <i>Aspergillus oryzae</i> .	<b>117</b>
<b>Tableau 15</b>	Les concentrations inhibant 50% de l'activité $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2010.	<b>118</b>
<b>Tableau 16</b>	Les concentrations inhibant 50% de l'activité $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques et hexaniques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016.	<b>120</b>
<b>Tableau 17</b>	Les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2010.	<b>123</b>
<b>Tableau 18</b>	Les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques et hexaniques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016.	<b>125</b>
<b>Tableau 19</b>	Corrélation par le test Pearson entre les teneurs, les activités antioxydantes et les activités inhibitrices enzymatiques des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2010.	<b>128</b>
<b>Tableau 20</b>	Corrélation par le test Pearson entre les teneurs, les activités antioxydantes et les activités inhibitrices enzymatiques des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>128</b>
<b>Tableau 21</b>	Données cristallographiques des deux enzymes.	<b>145</b>
<b>Tableau 22</b>	Résultats de la règle de Lipinski des molécules testées.	<b>152</b>
<b>Tableau 23</b>	Résultats du docking moléculaire pour l' $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA).	<b>156</b>
<b>Tableau 24</b>	Résultats du docking moléculaire pour HuAChE (PDB : 6O4W).	<b>163</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	L'arbre de Pistachier de l'Atlas.	7
<b>Figure 02</b>	Les feuilles de <i>P. atlantica</i>	8
<b>Figure 03</b>	Les fleurs de <i>P. atlantica</i> , <b>(a)</b> Mâle et <b>(b)</b> Femelle	9
<b>Figure 04</b>	Les fruits du <i>P. atlantica</i>	10
<b>Figure 05</b>	Espèce <i>Forda riccobonii</i> sur <i>Pistacia atlantica</i> Desf.	11
<b>Figure 06</b>	Les galles du Pistachier de l'Atlas	12
<b>Figure 07</b>	Carte de la répartition mondiale 2021 de <i>Pistacia atlantica</i> .	13
<b>Figure 08</b>	Carte de répartition de <i>Pistacia atlantica</i> en Algérie ( <b>Benaradj, 2017; Monjauze, 1980</b> )	14
<b>Figure 09</b>	Acide cis-9-octadécénoïque (Acide oléique)	24
<b>Figure 10</b>	Acide ricinoïque <b>(a)</b> et acide nervonique 2 hydroxy <b>(b)</b>	25
<b>Figure 11</b>	Acide tuberculostéarique (acide 10-méthylstéarique)	25
<b>Figure 12</b>	Acide gorlique 28	26
<b>Figure 13</b>	1,2-Dioléoyl-3-palmitoylglycérol (Triglycéride OOP)	27
<b>Figure 14</b>	1,2-Distearoyl-sn-3-glycérophosphoserine	28
<b>Figure 15</b>	1, 2-diacyl-3-galactosyl-sn-glycérol	28
<b>Figure 16</b>	Structure chimique de la sphingomyéline	29
<b>Figure 17</b>	Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes	30
<b>Figure 18</b>	Structure chimique des principaux phytostérols d'origine végétale.	31
<b>Figure 19</b>	Structure des différents isomères tocophérols et tocotriénols.	32
<b>Figure 20</b>	Structure chimique de l'hydroquinone, catéchol et tyrosol.	36
<b>Figure 21</b>	Structure chimique de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.	36
<b>Figure 22</b>	Structure chimique de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.	37
<b>Figure 23</b>	Structure chimique de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.	37
<b>Figure 24</b>	Structure chimique du noyau coumarine (benzo- $\alpha$ -pyrone).	38
<b>Figure 25</b>	Squelette de base du Xanthone.	38
<b>Figure 26</b>	Structure chimique du resvératrol.	39
<b>Figure 27</b>	Structure chimique de base des flavonoïdes (Flavane).	40
<b>Figure 28</b>	Structure chimique de quelques flavonoïdes.	40
<b>Figure 29</b>	Structure chimique des monomères, du lignane classique et du néolignane.	41
<b>Figure 30</b>	Structure chimique de l'acides gallique, de l'acide ellagique et des deux tanins hydrosolubles.	43
<b>Figure 31</b>	Structure chimique des proanthocyanidines.	44
<b>Figure 32</b>	Structure chimique de l'acutissimine A.	44
<b>Figure 33</b>	Structure chimique du phloroglucinol et du tetrafulcol A.	45
<b>Figure 34</b>	Attaque des radicaux libres sur une cellule : Etat de stress oxydant ( <b>Durand, 2018</b> ).	47
<b>Figure 35</b>	Principales espèces réactives de l'oxygéné ( <b>Guillouty, 2016</b> ).	48
<b>Figure 36</b>	Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux ( <b>Valko et al., 2006</b> ).	56
<b>Figure 37</b>	Structure chimique de $\beta$ -carotène.	57
<b>Figure 38</b>	Equilibre glycémique (homéostasie du glucose) ( <b>Durand, 2018</b> ).	61
<b>Figure 39</b>	Schéma représentatif du dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1 ( <b>Boyer, 2016</b> ).	62
<b>Figure 40</b>	Schéma représentatif du dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2 ( <b>Boyer, 2016</b> ).	63
<b>Figure 41</b>	L'ensemble des voies activées par l'hyperglycémie( <b>Boyer, 2016</b> ).	64
<b>Figure 42</b>	Photographies d'un cerveau sain (à gauche en haut) et d'un cerveau atteint de la MA (à droite) et d'une coupe coronale des deux cerveaux ( <b>Carret-Rebillat, 2014</b> ).	70

<b>Figure 43</b>	Formation de plaques séniles (amyloïdes) et de dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer ( <b>Viaules, 2016</b> ).	<b>70</b>
<b>Figure 44</b>	Le clivage de l'APP par l'enzymes $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ et $\epsilon$ sécrétase générant les peptides P3, AICD et A $\beta$ (40 et 42) ( <b>Mokhtar et al., 2013</b> ).	<b>71</b>
<b>Figure 45</b>	Représentation de la protéine tau à l'intérieur d'un neurone sain et malade	<b>72</b>
<b>Figure 46</b>	Structure chimique de la molécule l'acétylcholine.	<b>73</b>
<b>Figure 47</b>	Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase en acide acétique et choline ( <b>Tetu, 2005</b> ).	<b>74</b>
<b>Figure 48</b>	Structure chimique de la molécule donépézil.	<b>75</b>
<b>Figure 49</b>	Structure chimique de la molécule rivastigmine.	<b>75</b>
<b>Figure 50</b>	Structure chimique de la molécule galantamine.	<b>76</b>
<b>Figure 51</b>	Structure chimique de la molécule physostigmine.	<b>76</b>
<b>Figure 52</b>	Structure chimique de la molécule huperzine A.	<b>76</b>
<b>Figure 53</b>	Structure chimique de la molécule mémantine	<b>77</b>
<b>Figure 54</b>	Emplacement géographique des sites de récolte des galles de <i>Pistacia atlantica</i> de la région de Laghouat (Google Earth Pro, 2021)	<b>81</b>
<b>Figure 55</b>	Galles de <i>Pistacia atlantica</i> récoltées en 2010.	<b>81</b>
<b>Figure 56</b>	Forme sphérique ( <b>a</b> ) et semi-circulaire ( <b>b</b> ) de <i>Pistacia atlantica atlantica</i> (photos prises par Hefied fatiha).	<b>82</b>
<b>Figure 57</b>	Organigramme de la démarche expérimentale pour les galles de <i>P. atlantica</i> .	<b>83</b>
<b>Figure 58</b>	Protocole de séparation des fractions saponifiable et insaponifiable de l'extrait lipidique.	<b>85</b>
<b>Figure 59</b>	Protocole de préparation des EMAG.	<b>86</b>
<b>Figure 60</b>	Formation du complexe stable 1,10-phénanthroline-fer.	<b>87</b>
<b>Figure 61</b>	La dérivatisation du cholestérol selon la réaction de Liebermann-Burchard ( <b>Burke et al., 1974</b> ).	<b>87</b>
<b>Figure 62</b>	Formation du complexe flavonoïde-trichlorure d'aluminium ( <b>Amorim et al., 2008</b> ).	<b>89</b>
<b>Figure 63</b>	Formation du complexe tanin condensé-vanilline ( <b>Schofield et al., 2001</b> ).	<b>89</b>
<b>Figure 64</b>	Réduction du radical libre DPPH $^{\bullet}$ ( <b>Molyneux, 2004</b> ).	<b>90</b>
<b>Figure 65</b>	Réduction du fer ferrique (Fe $^{3+}$ -TPTZ) en fer ferreux (Fe $^{2+}$ -TPTZ) en présence d'antioxydant ( <b>Xiao et al., 2020</b> ).	<b>91</b>
<b>Figure 66</b>	Réduction du radical cationique ABTS $^{+\bullet}$ ( <b>Becker et al., 2019</b> ).	<b>92</b>
<b>Figure 67</b>	Réduction du DNS par le biais de sucre réducteur.	<b>94</b>
<b>Figure 68</b>	Principe de la méthode d'Ellman ( <b>Pohanka, 2014</b> ).	<b>95</b>
<b>Figure 69</b>	Les activités antioxydantes (DPPH, FRAP et ABTS) des extraits méthanoliques de galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2010.	<b>111</b>
<b>Figure 70</b>	Les activités antioxydantes (DPPH, FRAP et ABTS) des extraits méthanoliques de galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>113</b>
<b>Figure 71</b>	Le test DPPH des extraits lipidiques brutes (ELB) et de la fraction insaponifiable (FI) des galles de <i>P. atlantica</i> récoltées en 2016.	<b>114</b>
<b>Figure 72</b>	Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2010.	<b>112</b>
<b>Figure 73</b>	Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques (EM) et lipidiques (ELB et FI) des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016.	<b>121</b>
<b>Figure 74</b>	Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2010.	<b>123</b>
<b>Figure 75</b>	Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques (EM) et lipidiques (ELB et FI) des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016.	<b>125</b>
<b>Figure 76</b>	Distribution de 10 extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2010 par rapport à la position des paramètres étudiés (CPT, FT, TCT, DPPH, FRAP, ABTS, IAA et IAChE) réalisée par ACP.	<b>130</b>

<b>Figure 77</b>	Distribution de 14 extraits méthanoliques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016 par rapport à la position des paramètres étudiés (CPT, FT, TCT, DPPH, FRAP, ABTS, IAA et IAChE) réalisée par ACP.	<b>131</b>
<b>Figure 78</b>	Distribution de 14 extraits lipidiques des galles de <i>P. atlantica</i> collectés en 2016 par rapport à la position des paramètres étudiés (TT, ST, DPPH (ELB), DPPH (FI), IAA (ELB), IAA (FI), IAChE (ELB) et IAChE (FI)) réalisée par ACP	<b>133</b>
<b>Figure 79</b>	Principe du docking moléculaire	<b>137</b>
<b>Figure 80</b>	Exemple de liaison hydrogène entre l'hydrogène du groupement hydroxyle du ligand (en vert) et l'oxygène d'un acide aminé du récepteur (en bleu).	<b>140</b>
<b>Figure 81</b>	Exemple de de deux interactions électrostatiques, entre le noyau benzénique du ligand (en vert) et deux atome (O et N) de deux acides aminés du récepteur (en bleu).	<b>141</b>
<b>Figure 82</b>	Exemple de deux interactions hydrophobes, (a) entre le cycle du ligand (en vert) et un second cycle d'un acide aminé du récepteur (en bleu) et (b) entre deux cycles du ligand (en vert) et l'atome carbone d'un acide aminé du récepteur (en bleu).	<b>141</b>
<b>Figure 83</b>	Les superpositions existantes entre deux cycles aromatiques (Desaphy, 2013).	<b>142</b>
<b>Figure 84</b>	Etapas de la procédure du docking moléculaire (Grosdidier, 2007).	<b>144</b>
<b>Figure 85</b>	Le nombre de chaque acide aminé (a) et le pourcentage molaire (b) de $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA)	<b>146</b>
<b>Figure 86</b>	Structure tridimensionnelle et les acides aminés du site catalytique de de $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA).	<b>147</b>
<b>Figure 87</b>	Mécanisme d'action de l' $\alpha$ -amylase (Davies et Henrissat, 1995).	<b>147</b>
<b>Figure 89</b>	Le nombre de chaque acide aminé (a) et le pourcentage molaire (b) de HuAChE (code PDB: 6O4W).	<b>148</b>
<b>Figure 90</b>	Structure tridimensionnelle et les acides aminés du site catalytique de HuAChE (code PDB: 6O4W).	<b>199</b>
<b>Figure 91</b>	Mécanisme d'action de l'Acétylcholinestérase (Benamar, 2016; Bennion et al., 2015).	<b>150</b>
<b>Figure 92</b>	Data mining des ligands à partir du le logiciel Knime.	<b>150</b>
<b>Figure 93</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide quinique au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i> .	<b>157</b>
<b>Figure 94</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de gallate de méthyle au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i> .	<b>158</b>
<b>Figure 95</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de digallate de méthyle au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i>	<b>158</b>
<b>Figure 96</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide digalloylquinique au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i>	<b>159</b>
<b>Figure 97</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide valoneique dilactone au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i> .	<b>160</b>
<b>Figure 98</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acarbose au site actif de l' $\alpha$ -amylase d' <i>Aspergillus Aryzae</i>	<b>160</b>
<b>Figure 99</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide quinique au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>164</b>
<b>Figure 100</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de gallate de méthyle au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>164</b>
<b>Figure 101</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de digallate de méthyle au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>165</b>
<b>Figure 102</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide digalloylquinique au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>166</b>
<b>Figure 103</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide valoneique dilactone au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>166</b>
<b>Figure 104</b>	Représentation en 2D et 3D du mode de liaison du donépézil au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).	<b>167</b>

# Sommaire

Introduction .....	1
<b>Partie I : Présentation bibliographique</b>	
<b>Chapitre 01 : Généralités sur <i>Pistacia atlantica</i></b>	
1 Présentation du genre <i>Pistacia</i> .....	6
2 Description morphologique et systématique de l'espèce .....	6
-Feuilles .....	8
-Fleurs .....	8
-Fruits .....	9
-Galles .....	10
3 Répartition écologique du Pistachier de l'Atlas .....	12
4 Utilisation traditionnelle .....	14
5 Travaux antérieurs .....	16
<b>Chapitre 02 : Généralités sur les lipides</b>	
1 Généralités sur les lipides .....	22
2 Composition des lipides .....	22
2.1 Acides gras .....	22
2.1.1 Classification des acides gras .....	23
2.1.1.1 Acides gras saturés et insaturés .....	23
2.1.1.2 Acides gras hydroxyles .....	24
-Acides gras hydroxylés .....	24
-Acides gras ramifiés .....	25
-Acides gras cycliques .....	25
2.1.2 Rôle des acides gras .....	26
2.2 Lipides simples .....	26
2.3 Lipides complexes .....	27
2.3.1 Phosphoacylglycérols .....	28
2.3.2 Glycéroglycolipides .....	28
2.3.3 Sphingolipides .....	29
2.4 Fraction insaponifiable .....	29
2.4.1 Stéroïdes .....	29
2.4.1.1 Stérols .....	30
2.4.1.2 Phytostérols .....	30

-Rôle des phytostérols .....	31
2.4.2 Tocophérols .....	32
-Rôle des tocophérols .....	32
2.4.3 Cires .....	33

### **Chapitre 03 : Généralités sur les composés phénoliques**

1 Généralités sur les composés phénoliques.....	35
2 Classification des composés phénoliques .....	35
2.1 Phénols simples .....	36
2.2 Acides phénoliques.....	36
2.3 Coumarines .....	38
2.4 Xanthones .....	38
2.5 Stilbénes.....	39
2.6 Flavonoïdes.....	39
2.7 Lignanes et lignines .....	41
2.8 Tanins .....	41
2.8.1 Tanins hydrolysables.....	42
2.8.2 Tanins condensés.....	43
2.8.3 Tanins complexes.....	44
2.8.4 Phlorotanins.....	44

### **Chapitre 04 : Stress oxydatif**

1 Stress oxydatif et radicaux libres .....	47
2 Principaux espèces réactives.....	48
2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	48
2.1.1 ERO radicalaires .....	49
2.1.1.1 Radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ .....	49
2.1.1.2 Radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ .....	49
2.1.1.3 Radical peroxy $ROO^{\bullet}$ .....	49
2.1.2 ERO non radicalaires .....	50
2.1.2.1 Oxygène singulet $^1O_2$ .....	50
2.1.2.2 Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ .....	50
2.2 Espèces réactives de l'azote (ERA).....	51
3 Effet du stress oxydatif sur l'organisme .....	51
3.1 Conséquences biochimiques.....	51
3.1.1 Oxydation des lipides .....	51

3.1.2	Oxydation des protéines .....	52
3.1.3	Oxydation des glucides .....	52
3.1.4	Oxydation de l'ADN .....	52
4	Antioxydants et système de défense .....	53
4.1	Antioxydants.....	53
4.2	Systèmes de défense .....	53
4.2.1	Systèmes de défense endogènes .....	53
4.2.1.1	Superoxyde dismutase (SOD) .....	53
4.2.1.2	Catalase.....	54
4.2.1.3	Glutathion peroxydase (GPx) .....	54
4.2.1.4	Antioxydants endogènes non enzymatiques.....	54
4.2.2	Système de défense exogène .....	55
4.2.2.1	Vitamine C.....	55
4.2.2.2	Vitamine E.....	56
4.2.2.3	Caroténoïdes .....	56
4.2.2.4	Composés phénoliques .....	57

## **Chapitre 05 : Diabète**

1	Diabète .....	60
2	Homéostasie du glucose.....	60
3	Principaux types de Diabète.....	62
3.1	Diabète de type 1 .....	62
3.2	Diabète de type 2 .....	63
3.3	Diabète gestationnel .....	63
4	Complications du diabète.....	64
4.1	Formation des produits avancés de glycation.....	64
5	Traitement du diabète .....	65

## **Chapitre 06 : Maladie d'Alzheimer**

1	Maladie d'Alzheimer .....	69
2	Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer .....	69
2.1	Protéine $\beta$ amyloïde .....	70
2.2	Dégénérescences neurofibrillaires .....	71
2.3	Stress oxydatif .....	72
2.4	Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs .....	73
2.4.1	Voie cholinergique .....	73
3	Traitements de la MA .....	74

3.1	Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase .....	74
3.2	Antagoniste du glutamate .....	76

## **Partie II : Partie expérimentale**

### **Chapitre 01 : Etudes *in vitro* (dosage, identification des molécules, évaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice sur $\alpha$ -amylase et AchE)**

1	Matériel et Méthodes .....	80
1.1	Matériel végétal .....	80
1.2	Méthodes expérimentales .....	83
1.2.1	Extraction des lipides .....	83
1.2.2	Séparation des fractions lipidiques (saponifiable et insaponifiable).....	84
1.2.3	Préparation d'esters méthyliques d'acides gras.....	85
1.2.4	Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	86
1.2.5	Dosage des tocophérols totaux (TT) .....	86
1.2.6	Dosage des stérols totaux (ST).....	87
1.2.7	Extraction des composés phénoliques.....	88
1.2.8	Dosage des composés phénoliques totaux (CPT) .....	88
1.2.9	Dosage des flavonoïdes totaux (FT).....	88
1.2.10	Dosage des tanins condensés (TC).....	89
1.2.11	Evaluation de l'activité antioxydante.....	90
1.2.11.1	Test du DPPH <sup>*</sup> (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl).....	90
1.2.11.2	Test de FRAP .....	91
1.2.11.3	Test d'ABTS <sup>++</sup> .....	91
1.2.12	Analyses des composés phénoliques par CLUP .....	92
1.2.12.1	Spectrométrie de masse (MS) .....	93
1.2.13	Tests d'inhibition enzymatique .....	93
1.2.13.1	Inhibition de l'activité $\alpha$ -Amylase (IAA) .....	93
1.2.13.2	Inhibition de l'activité Acétylcholinestérase (IAAChE).....	95
1.2.14	Analyse statistique.....	96

### **Chapitre 02 : Résultats et Discussion des études *in vitro***

1	Résultats et discussion .....	98
1.1	Rendement d'extraction.....	98
1.2	Analyse des acides gras par CPG .....	100
1.3	Teneurs en tocophérols totaux (TT) .....	103
1.4	Teneurs en stérols totaux .....	103
1.5	Teneurs en composés phénoliques totaux .....	104

1.6	Teneurs en flavonoïdes totaux.....	105
1.7	Teneurs en tanins condensés totaux.....	106
1.8	Activités antioxydantes.....	108
1.9	Profils chromatographiques des composés phénoliques (récoltés en 2010).....	115
1.10	Tests d'inhibition enzymatique .....	117
1.10.1	Inhibition de l'activité $\alpha$ -Amylase (IAA).....	117
1.10.2	Inhibition de l'activité Acétylcholinestérase (IAAChE).....	122
1.11	Corrélation entre les différents paramètres étudiés .....	126
1.12	Analyse des données par ACP.....	129

### **Chapitre 03 : Etude *in silico* (docking moléculaire)**

1	Introduction.....	135
2	Docking moléculaire.....	135
3	Algorithmes de docking.....	137
4	Fonctions de score.....	139
5	Interaction protéine-ligand.....	139
5.1	Liaisons d'hydrogène .....	140
5.2	Interactions ioniques.....	140
5.3	Interactions hydrophobes.....	141
6	Autres paramètres importants dans la réalisation du docking moléculaire.....	142
6.1	Importance de la structure des protéines .....	142
6.2	Importance du solvant .....	143
7	Logiciel utilisé « AutoDock Vina ».....	143
8	Matériels et Méthodes.....	144
8.1	Etape de docking moléculaire.....	144
8.1.1	Détermination des structures .....	145
8.1.1.1	Protéines cibles (Récepteurs).....	145
8.1.1.2	Composition des acides aminés des deux enzymes.....	145
8.1.1.2.1	$\alpha$ -amylase .....	145
8.1.1.2.2	Acétylcholinestérase .....	148
8.1.1.3	Ligands .....	150
8.1.2	Préparation des structures.....	153
8.1.2.1	Préparation des protéines cibles .....	153
8.1.2.2	Préparation des ligands .....	153
8.1.3	Analyse et visualisation du docking moléculaire.....	153

### **Chapitre 04 : Résultats et discussion de l'étude *in silico***

1	Résultats et discussion .....	155
1.1	Simulation d'amarrage moléculaire .....	155
1.1.1	Amarrage moléculaire pour $\alpha$ -amylase .....	155
1.1.2	Amarrage moléculaire pour HuAChE.....	162
1.2	Évaluations de la règle de cinq de Lipinski (RO5) sur les ligands sélectionnés .....	167
	Conclusion .....	170
	Références bibliographiques .....	174
	Annexes.....	201

# ***Introduction***

---

## Introduction

A travers les siècles, les plantes ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique et préventif de l'homme (**Benhammou, 2012**). Toutefois, la recherche de ces plantes qui constituent la base de la médecine traditionnelle (**Gurib-Fakim, 2006**) s'est concentré sur eux que vers le début du 20<sup>ème</sup> siècle (**Djenidi, 2012**). D'autre part, l'apparition de plus en plus d'effets secondaires graves causés par les médicaments synthétiques et même la cherté et l'indisponibilité de ces médicaments dans certaines grandes populations ont eu pour conséquence la mise en évidence de ces produits végétales ainsi que leurs composants bioactifs (**Nair et al., 2013**). En effet, les plantes médicinales ont eu un rôle crucial, en tant que précurseurs dans le développement des médicaments modernes (**Nair et al., 2013; Sofowora, 1982**). Des données récentes de l'industrie pharmaceutique ont révélées que pour certaines maladies complexes, les produits naturels sont considérés comme une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques (**Boldi, 2004; Clardy et Walsh, 2004; Koehn et Carter, 2005; Muanda, 2010**). De même, un sondage a montré que les principes actifs provenant des plantes représentent environ 25% des médicaments prescrits (**Benguechoua, 2016**).

Le continent africain est l'un des continents favorisés par sa biodiversité végétale, l'Algérie fait partie des pays africains ayant une flore diversifiée et la plus originale du bassin méditerranéen (**Benamar, 2016**). Cette flore compte 3744 espèces réparties dans près de 150 familles (**Benamar, 2016**), dont 7,9% sont endémiques (**Ben-Ahmed, 2016**). Ces ressources présentent un potentiel pour le développement de divers secteurs (**Sifi, 2016**) et constituent un axe scientifique important dans le domaine pharmaceutique. Une des espèces végétales algériennes qui n'a pas encore livré tous ces secrets est le *Pistacia atlantica* Desf. qui est une espèce de grande valeur en raison de ses divers utilisations mentionnées dans le chapitre 1 de la présentation bibliographique.

De nos jours, il y a une demande croissante d'antioxydants naturels (**Benabed, 2018**). Un tel intérêt est dû à la recrudescence des maladies liées à l'oxydation des molécules biologiques (**Guenane, 2017**). Des preuves récentes suggèrent l'implication du stress oxydatif dans la pathogenèse de diverses maladies (telles que le diabète et la maladie d'Alzheimer...etc.) et ont attiré l'attention des scientifiques sur le rôle des antioxydants dans la prévention, le traitement des maladies et le maintien de la santé humaine (**Ramakrishna et al., 2012**). En effet, les altérations biochimiques (oxydation des lipides, des protéines, de l'ADN...) causées par le

stress oxydatif l'implique soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une des causes de complications (Durand, 2018). Les espèces radicalaires peuvent participer à l'installation du diabète (Mongens, 2013), en causant soit une sensibilité des cellules à l'action de l'insuline, soit une inhibition de la sécrétion d'insuline ou de la transduction de son signal contribuant ainsi à l'installation de l'insulino-résistance (Baraka-Vidot, 2014; Boyer, 2016). De plus, le système nerveux central est sensible aux radicaux libres à cause de sa grande consommation d'oxygène (Barouki, 2006), sa richesse en acide gras polyinsaturés, sujets à la peroxydation lipidique (Mongens, 2013) et sa faible quantité en enzymes antioxydants (Barouki, 2006). De surcroît, certaines parties du cerveau sont constituées de tissus riches en fer ce qui augmente la probabilité de production d'ERO (Mongens, 2013; Tissier, 2011). Entre-temps, l'une des stratégies thérapeutiques adoptées pour le traitement du diabète de type 2 ou encore de la maladie d'Alzheimer repose sur l'inhibition des deux enzymes l' $\alpha$ -amylase et l'AChE, respectivement. Effectivement, l'inhibition des enzymes digestives telles que  $\alpha$ -amylase permet de diminuer la glycémie postprandiale (Senthil et al., 2019). De même, l'inhibition de l'AChE qui est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en acide acétique (Furqan et al., 2020) permet d'augmenter les taux d'ACh et ainsi d'améliorer la transmission cholinergique. De ce fait, le but est de trouver des extraits contenant non seulement des antioxydants naturels mais aussi des inhibiteurs de ces deux enzymes. La recherche de ces nouvelles molécules naturelles s'appuie sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques, phytochimiques et pharmacologiques. Ainsi, la valorisation des ressources naturelles est un domaine qui devient de plus en plus important dans de nombreux pays (Muanda, 2010).

Dans ce contexte, la présente étude est réalisée dans le cadre de la valorisation de bioressources Algériennes, visant à évaluer le pouvoir antioxydant, l'activité inhibitrice contre l' $\alpha$ -amylase et l'acétylcholinestérase des extraits méthanoliques et hexaniques (lipides) des galles de Pistachier de l'Atlas. Les raisons de choix de cette plante ont été d'une part les données ethnopharmacologiques soulevant le potentiel de *Pistacia atlantica* contre divers maladies et d'autres parts, les récentes travaux effectués sur les différentes parties de cette plante, cités dans le **chapitre 1**. Une partie de cette étude est une continuité de travail précédent réalisé dans le même laboratoire des Sciences fondamentales, Université Amar Telidji, Laghouat dans le cadre d'obtention de mon diplôme de magister.

Le manque de travaux concernant l'évaluation des activités antioxydante et inhibitrice sur  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques des galles de *Pistacia atlantica* (sphériques et semi-

circulaires) et l'absence des études de l'effet inhibiteur des extraits hexaniques (lipides) sur  $\alpha$ -amylase ainsi que sur l'acétylcholinestérase et le mécanisme d'action des inhibiteurs potentiels d'origine phénolique contre  $\alpha$ -amylase et AChE, nous ont amené à réaliser : i) :une étude du contenu et de la composition des extraits huileux et méthanoliques des galles de *Pistacia atlantica*, ii) une étude *in vitro* de la capacité antioxydante et de l'effet inhibiteur des extraits méthanoliques et hexaniques sur les deux enzymes, iii) une simulation de l'amarrage moléculaire (interaction entre inhibiteurs et enzymes, énergie de liaison, nombre de liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et électrostatiques). Une telle étude pourrait apporter un supplément de connaissance utile, contribuant à valoriser plus les activités biologiques des extraits des galles de *P. atlantica*.

Dans la littérature, nous avons remarqué qu'il n'y a pas d'études concernant la variation du contenu des extraits (méthanoliques et hexaniques) ainsi que les activités biologiques des galles en fonction de leurs formes, du genre et du mois de récolte. Ainsi, cette étude pourrait nous permettre de démontrer l'influence de chaque facteur sur la composition des extraits et sur les activités biologiques étudiées.

La thèse est structurée en deux parties :

-La première partie qui est répartie en six chapitres, est relatif à un aperçu bibliographique, dans lequel, il y a un rappel sur la description et l'intérêt de *Pistacia atlantica*, suivi des généralités sur les lipides, les composés phénoliques, le stress oxydatif, le diabète et la maladie d'Alzheimer.

-La deuxième partie est divisée en quatre chapitres, le première est consacré à l'ensemble des études *in vitro* ; à savoir l'extraction des lipides et de leur fractions insaponifiables, l'extraction des composés phénoliques, l'identification des constituants chimiques des EMAG et des composés phénoliques, l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits en adoptant trois tests : le test DPPH<sup>\*</sup>, le test ABTS<sup>++</sup> et le test FRAP et l'évaluation de l'effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase et l'acétylcholinestérase. Le second chapitre est consacré à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats de l'ensemble des études *in vitro*. Le troisième chapitre est centré sur l'étude *in silico*, la modélisation moléculaire d'amarrage des molécules inhibitrices dans les sites actifs des deux enzymes : l' $\alpha$ -amylase d'origine fongique et l'acétylcholinestérase humaine par le biais de logiciels de traitement des structures. Enfin, le quatrième chapitre est consacré à l'ensemble des résultats de l'étude *in silico* avec la discussion.

***Partie I :***  
***Présentation bibliographique***

---

*Chapitre*

---

1

***Généralités sur Pistacia atlantica***

## 1 Présentation du genre *Pistacia*

Le genre *Pistacia* appartient à la famille des *Anacardiaceae* qui comprend environ 70 genres et plus de 600 espèces (Mitchell et Mori, 1987). La première classification complète de ce genre a été publiée par (Zohary, 1952). Sur la base de leur morphologie, Zohary a reconnu 11 espèces et les a divisées en quatre sections : *Lentiscella* Zoh. (*P. Mexicana* HBK. et *P. texana* Swingle); *Eu Lentiscus* Zoh. (*P. lentiscus* L., *P. saportae* Burnat et *P. weinmannifolia* Poisson) ; *Butmela* Zoh. (*P. atlantica* Desf.) et *Eu Terebinthus* Zoh. (*P. chinensis* Bunge., *P. khinjuk* Stocks, *P. palaestina* Bois., *P. terebinthus* et *P. vera* L.) (Al-Saghir, 2006; Ben Ahmed et al., 2021; Zohary, 1952). En Algérie, quatre espèces de *Pistacia* à savoir; *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia atlantica* et *Pistacia vera* ont été signalées (Ghalem et Mohamed, 2009). Ce genre est xérophyte, pouvant s'adapter dans des zones arides grâce au développement avancé des tissus de la palissade et la croissance extensive des racines (Al-Saghir, 2006). De plus, il est économiquement important compte tenu de l'espèce *Pistacia vera* L., qui est la seule espèce cultivée et commercialisée (Samavati et Adeli, 2014), les autres espèces sont valorisées pour leurs produits naturels (Toul et al., 2017). En effet, la plupart donnent des composés phénoliques. Cependant, seuls deux espèces, *P. atlantica* et *P. lentiscus* sont les principales sources de composés phénoliques (Yousfi et al., 2009). *Pistacia atlantica* est l'une des espèces sauvages les plus répandues en Afrique du Nord (Ben Ahmed et al., 2021; Toul et al., 2017). En Algérie, il est l'espèce la plus caractérisée des régions arides et semi-arides (Gourine et al., 2010). Il a longtemps été utilisé en médecine traditionnelle par les peuples d'Afrique du Nord (Yousfi et al., 2009).

## 2 Description morphologique et systématique de l'espèce

Le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) (Figure 1) connu sous le nom vernaculaire El Betoum, Botma en langue arabe local et Iggh ou Tismelal en berbère (Benaradj, 2017) est une espèce dioïque, ligneuse et spontanée pouvant atteindre 10 à 20 m de hauteur (Benabdallah, 2012) avec un diamètre de 1 m (Benamar, 2016), à tronc bien individualisé et à frondaison hémisphérique ; le port est arrondi et à ramifications étalées (Benabdallah, 2012). Il a été décrit pour la première fois par Desfontaines en 1789 (Benaradj, 2017; Monjauze, 1980) et connu aussi sous le nom de faux Pistachier (Guenane, 2017). Le Pistachier de l'Atlas est le plus ubiquiste des arbres du Nord de l'Afrique et du Proche-Orient. A l'état adulte, sa silhouette est impressionnante (Monjauze, 1980).



**Figure 01** : L'arbre de Pistachier de l'Atlas<sup>1</sup>.

La classification botanique de Pistachier de l'Atlas est présentée dans le **Tableau 01** (Benaradj, 2017).

**Tableau 01** : Classification botanique de *Pistacia atlantica* Desf. (Benaradj, 2017).

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Phanérogames
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Anacardiaceae
<b>Genre</b>	<i>Pistacia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pistacia atlantica</i> Desf.

D'après (Crete, 1965), Une connaissance précise de la classification des espèces végétales est surtout basée sur les aspects morphologiques externes et accessoirement sur leur anatomie. D'ailleurs, les caractéristiques des feuilles et la morphologie des fruits étaient les principaux caractères utilisés par (Zohary, 1952) pour faire la distinction entre les différentes espèces qu'il a reconnu.

<sup>1</sup><http://ecotourisme.geoparcjbelbani.com/>

### -Feuilles

Les feuilles de *P. atlantica* (**Figure 2**) sont caduques, composées, stipulées, à rachis finement ailé (**Yaaqobi et al., 2009**). Elles sont imparipennées, de cinq à neuf folioles, lancéolées (**Ben Ahmed et al., 2021**). De plus, elles ont environ 8 à 20 cm de longue (**Boulos, 2000; Ziane, 2014**), leur pétiole est non ailé et mesure 3 à 5 cm de long (**Belhadj et al., 2007**).



**Figure 02** : Les feuilles de *P. atlantica*<sup>1</sup>

### -Fleurs

Les fleurs sont dioïques et unisexuées (**Ben Ahmed et al., 2021**), il est donc difficile d'en distinguer le sexe avant la première floraison (**Benaradj, 2017**). Elles sont petites et apétales (**Figure 3**) (**Yaaqobi et al., 2009**). Chez la pistache de l'Atlas, la pollinisation est effectuée par le vent (anémophile) (**Benaradj, 2017**). De même, la floraison a lieu avant le développement végétatif et les mâles ont tendance à fleurir avant les femelles (**Ben Ahmed et al., 2021**). Les fleurs mâles sont disposées en inflorescence terminale (**Benaradj, 2017**), portant des sacs polliniques jaunes (**Figure 3, a**) (**Ben Ahmed et al., 2021**). Chaque fleur est constituée d'un calice de 3 à 5 sépales pubescents et d'un androcée composé de 5 à 8 étamines opposés à filaments très courts (**Benaradj, 2017; Pesson et Louveaux, 1984**). Par contre, les fleurs femelles sont réunies en grappes paniculées (**Figure 3, b**) (**Benaradj, 2017**), portant des ovaires à ovule unique (**Ben Ahmed et al., 2021; Padulosi et Hadj-Hassan, 1998**). Chaque fleur présente un petit calice composé de 3 à 5 sépales, qui entourent 3 carpelles concrescents et dont une est fertile (**Benaradj, 2017**).

<sup>1</sup><http://atlas-sahara.org/>



**Figure 03** : Les fleurs de *P. atlantica*, (a) Mâle et (b) Femelle<sup>1</sup>.

### -Fruits

L'appellation vernaculaire des fruits de *P. atlantica* diffère selon la région (**Benaradj, 2017**), appelés Elkhodiri par la population locale en raison de la prédominance de la couleur verte foncée à la maturité (**Benabdallah, 2012**), on trouve aussi le nom Godhime dans la région de Bechar (**Benaradj, 2010**) ou encore Tikouaouèche ou Goddime au Maroc (**Yaaqobi et al., 2009**). Ce sont des drupes ovoïdes (**Benaradj, 2017**) à épiderme qui se ride en séchant (**Benabdallah, 2012**) et à mésocarpe résineux de 6 à 8 mm de long (**Benaradj, 2017**). Le fruit possède un seul noyau osseux contenant une graine (**Benaradj, 2017; Ozenda, 1977**). La fructification débute vers la fin du mois de mars et s'achève au mois de septembre. Au cours du processus de maturation, les fruits prennent une couleur jaune, puis change progressivement en rouge puis en bleu et en fin en vert foncé (**Figure 4**) (**Yaaqobi et al., 2009**). Ils sont récoltés pour leur consommation, la phytothérapie locale mais aussi pour leur intérêt médical (**Benaradj, 2017**).

<sup>1</sup><http://www.floramaroccana.fr/>

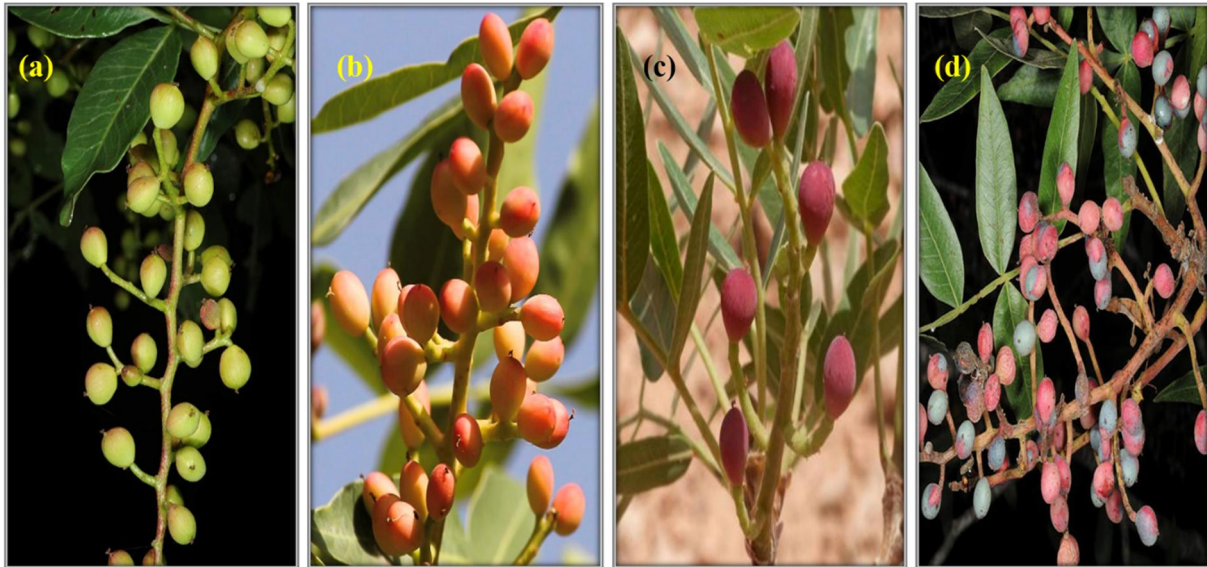


Figure 04 : Les fruits du *P. atlantica* (a<sup>1</sup>, b<sup>2</sup>, c<sup>3</sup> et d<sup>1</sup>)

### -Galles

Il existe plusieurs définitions de galle, parmi elles, on cite la définition proposée par (Felt, 1940) qui est : « les galles sont des structures végétales induites par un organisme parasite, généralement un insecte, qui modifie les schémas de développement normaux des tissus végétaux », ou encore celle de (Meyer, 1987) qui définit les galles comme étant : « toutes les manifestations de croissance, qu'elles soient positives ou négatives, et de différenciation anormale, provoquées sur une plante par des parasites animaux ou végétaux » et plus récemment la définition mentionnée par (Dauphin, 2012) qui est : « une galle est une déformation structurée d'une plante provoquée par un parasite ». Les organismes qui provoquent la formation de galle sont nommés galligènes et peuvent être : des bactéries (qui forment des bactériocécidies, exemple : *Agrobacterium tumefaciens*,); des champignons (mycocécidies causant généralement des déformations peu structurées, exemple : au sein des rouilles (Urédinales) ); des animaux (zoocécidies ou cécidozoaires appartenant tous à un vaste ensemble hétérogène des invertébrés). Les principaux cécidozoaires restent des arthropodes (acariens, hémiptères, diptères, hyménoptères, et quelques coléoptères et lépidoptères).

<sup>1</sup><http://www.plantsoftheworldonline.org/>

<sup>2</sup><http://atlas-sahara.org/>

<sup>3</sup><https://www.teline.fr>

Ces organismes causent des altérations anatomiques et métaboliques, probablement en réponse aux sécrétions injectées par les larves lors de l'alimentation ou par la femelle lors de la ponte (Dias *et al.*, 2013).

L'hypertrophie cellulaire, l'hyperplasie tissulaire, l'inhibition de certains programmes de développement et les changements cytologiques se produisent pendant le développement des galles (Ferreira et Isaias, 2013). En effet, les galles fournissent à leurs habitants une meilleure nutrition, une protection contre les conditions abiotiques difficiles telles que la température et les radiations mais aussi une défense contre les agents pathogènes de ces galligènes (Inbar *et al.*, 2010; Weis *et al.*, 1988). C'est pour ces raisons que les tissus des galles contiennent des niveaux plus élevés de métabolites secondaires défensifs par rapport aux tissus végétaux hôtes (Hartley, 1998; Yoram et Inbar, 2011). Chez la famille des Anacardiaceae, deux types d'insectes gallicoles peuvent être distingués (Martinez, 2008; Sifi, 2016): la tribu *Fordini* qui produit des galles en forme de pois ou des galles qui se forment sur la marge des feuilles (Exemple : l'espèce *Forda riccobonii* sur *Pistacia atlantica* Desf. (Figure 5) et la tribu des *Baizongiini* qui produisent des galles bourgeonnantes prenant la forme d'une banane (Exemple : l'espèce *Baizogia pistaciae* L. sur le *Pistacia palaestina* Boiss.).



**Figure 05** : Espèce *Forda riccobonii* sur *Pistacia atlantica* Desf<sup>1</sup>.

Selon (Mehrnejad, 2010), *P. atlantica* développe des galles (Figure 6) causées par des attaques d'insectes, en particulier les pucerons (*Slavum wertheimae* et *Baizogia pistaciae* L) et les guêpes chalcidés.

<sup>1</sup><https://www.biodiversidadvirtual.org/>



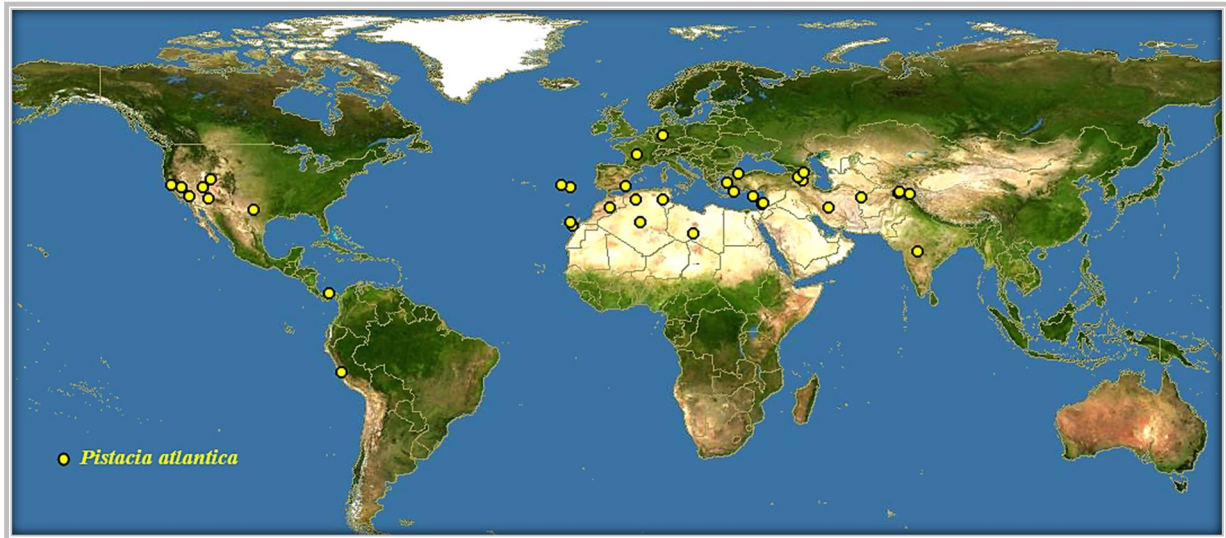
Figure 06 : Les galles du Pistachier de l'Atlas<sup>1</sup>.

### 3 Répartition écologique du Pistachier de l'Atlas

*Pistacia atlantica* est une espèce xérophYTE thermophile (Benamar, 2016), connu pour sa plasticité exceptionnelle à la sécheresse comme caractéristique (Monjauze, 1980). Il peut s'adapter dans les zones semi-arides, arides et voir même sahariennes, cette adaptation au manque d'eau pourrait s'expliquer par l'absence totale de stomates au niveau de la face supérieure des feuilles ainsi que la présence de stomates de type paracytique mésopérigène au niveau de la face inférieure de la feuille (Smail-Saadoun, 2005). Cet arbre est considéré comme un constituant dominant dans la formation des forêts et parcs des régions steppiques (Zohary, 1952). L'espèce pousse dans les collines rocheuses, aux bords de champs, aux bords de routes, dans les sols argileux ou limoneux et même sur les roches calcaires où les racines se développent à l'intérieur des fissures (Tzakou *et al.*, 2007). De plus, Elle peut être solitaire (Rowshan *et al.*, 2013) ou en association avec *Ziziphus lotus* L. et *Pinus halepensis* Mill. (Benabderrahmane *et al.*, 2009). Le pistachier de l'Atlas est considéré comme une espèce irano-turaniennE avec une large aire géographique (Zohary, 1952) (Figure 7), pouvant s'étendre de l'Asie du Sud-Ouest au Nord-Ouest de l'Afrique (Maroc) (Tzakou *et al.*, 2007). *P. atlantica* est une espèce la plus réparties que l'on rencontre depuis les Iles Canaries jusqu'aux montagnes du Pamir (Zohary, 1952). On signale sa présence en Afrique du Nord, au Sahara septentrional, en Libye, en Chypre, en Chio, en Rhodes, en Grèce, en Turquie, en Bulgarie, en Crimée, en Caucase, en Transcaucasie, en Arménie, en Palestine, en Syrie, en Jordanie, en Iran, en Iraq, en Arabie, en Baloutchistan et en Afghanistan (Benaradj, 2017; Monjauze, 1980; Somon, 1987) ainsi que d'autres auteurs le qualifie d'endémique du Nord-africain.

<sup>1</sup><http://atlas-sahara.org/>

Pour Zohary (1996)(Benaradj, 2017) , le grand Maghreb est concerné par une sous-espèce à part entière : *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica*.



**Figure 07** : Carte de la répartition mondiale 2021 de *Pistacia atlantica*<sup>1</sup>.

En Algérie, le *P. atlantica* s'étend de l'Atlas tellien à étage humide jusqu'aux régions arides et même sahariennes (Benaradj, 2017) (Figure 8). Il est localisé à l'Est de l'Algérie dans les montagnes des Aurès jusqu'au Sud de Batna, au Nord dans l'Atlas Blidéen (Mitidjien), notamment entre Bouira et Mchedallah et dans les gorges de Kherrata au Sud-ouest de Béjaïa, à l'Ouest entre les wilayas telles que Maghnia et Tlemcen, Saïda et Tiaret, Sidi Bel Abbès et Mascara ainsi que dans la plaine du Chélif. Quant au Sud, il est trouvé dominant dans l'Atlas Saharien, distribue dans Ain Sefra, Laghouat, Mzab (Guenane, 2017; Monjauze, 1968). Par contre, Il existe à l'état disséminé dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussera, Messaad), Laghouat (partie Sud) et Ghardaia (dans l'ouest du M'zab), sa limite extrême se trouve en plein cœur du Hoggar où il est à l'état de relique (Monjauze, 1980).

<sup>1</sup> <https://www.discoverlife.org/mp>, 2021



**Figure 08:** Carte de répartition de *Pistacia atlantica* en Algérie (Benaradj, 2017; Monjauze, 1980).

#### 4 Utilisation traditionnelle

Les parties aériennes de *P. atlantica* ont longtemps été utilisées dans la médecine populaire mais aussi dans d'autres domaines par différents groupes ethniques (Chief, 1914; Padulosi et Hadj-Hassan, 1998).

Sur le plan économique, le Pistachier de l'Atlas présente des qualités. C'est un excellent porte-greffe pour le Pistachier vrai (*Pistacia vera*) (Sifi, 2016) ou un support pour la vigne (Ben Ahmed *et al.*, 2021) grâce à son système racinaire qui est très vigoureux (Sifi, 2016). Certaines populations bédouines utilisent son bois pour fabriquer le "Mehbaj" qui est un vieil outil employé pour mouliner le café (Ben Ahmed *et al.*, 2021; Miara *et al.*, 2019; Padulosi et Hadj-Hassan, 1998). Le bois est également utilisé pour le chauffage dans les régions reculées (Sifi, 2016). En raison de sa rusticité et sa capacité à fixer les sables, le Pistachier de l'Atlas a une place importante dans le reboisement dans les régions à climat aride, permettant ainsi la lutte contre l'érosion et la désertification (Benabdallah, 2012; Benaradj, 2017). La résine du Pistachier a été utilisée autrefois par les pharaons pour l'embaumement de leurs momies (Benaradj, 2017). De nos jours, elle est utilisée dans la production de colle, la restauration des œuvres d'art en verre, en porcelaine, en bois et en métal. Elle est même utilisée dans la fabrication des produits cosmétiques et en parfumerie (Guenane, 2017). Les fruits, les feuilles

et les galles sont utilisés pour le tannage (**Ben Ahmed et al., 2021; Benamar, 2016; Sifi, 2016**). Également, le fruit constitue un apport en fourrage pour l'alimentation du bétail (**Ben Ahmed et al., 2021; Benamar, 2016**).

De point de vue alimentaire, le pistache sauvage est consommé dans diverses préparations. Les Touaregs algériens et libyens récoltent les fruits, les torréfient pour une consommation directe (**Abdelkrim et al., 2014; Miara et al., 2019**). Tandis que dans d'autres régions, l'huile de ces fruits est souvent mélangée aux dattes écrasées et consommée avec du petit lait (**Ziane, 2014**). Également, les fruits verts sont utilisés pour faire de la confiture (**Benamar, 2016**). Les graines de pistachier de l'atlas sont riches en lipides notamment en acides gras insaturés (oléique et linoléique) et en phytostérols, présentant des intérêts diététiques et nutritionnels (**Benabdallah, 2012**). Celles-ci sont fréquemment moulues, mélangées à une solution sucrée, séchées et consommées comme des arachides ou encore mélangés avec des dattes moulues (**Belhadj, 1999; Ben Ahmed et al., 2021**). Mais encore, les jeunes feuilles de *P. atlantica* sont consommés comme aliment cuit dans les régions méditerranéennes et anatoliennes orientales de la Turquie (**Peksel et al., 2010**). La résine est aussi utilisée dans certaines populations nomades des zones steppiques ou dans certains pays tels que l'Iran comme chewing-gum naturel (**Ben Ahmed et al., 2021; Benaradj, 2017**).

En ce qui concerne la médecine traditionnelle, cette plante a été exploitée dans divers traitements et cela dans plusieurs régions. Elle a été utilisée dans le traitement de l'eczéma, la paralysie, les diarrhées, les infections de la gorge, les calculs rénaux, l'asthme (**Benamar, 2016**), le soulagement des maux abdominaux supérieurs, les maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (**Hosseini et al., 2013**). Elle a été également recommandée pour ces propriétés hypoglycémiantes (**Al-Aboudi et Afifi, 2011; Tzakou et al., 2007**), et diurétiques mais aussi pour traiter la toux, l'hypertension et la jaunisse (**Hosseini et al., 2013**). Au Maroc, les feuilles de *P. atlantica* sont préparées en décoction pour traiter les infections oculaires (**Ben Ahmed et al., 2021**).

Le fruit ainsi que son huile sont employés comme anti-diarrhéique (**Yousfi et al., 2002**) et pour traiter les maux d'estomac (**Lev et Amar, 2002**). Quant à l'écorce du tronc, elle est utilisée par la population de la région de Bechar (Algérie) pour traiter les maux d'estomac et des douleurs gastriques (**Benaradj et al., 2015**).

La résine a pareillement été employée comme antiseptique pour voies respiratoires (**Benabderrahmane et al., 2009**), comme cicatrisant des plaies et pour le traitement des maladies de l'estomac (**Altundag et Ozturk, 2011; Sifi, 2016**). En outre, l'oléorésine a été utilisé

traditionnellement comme adoucissant, diurétique, agent cicatrisant, tonique de l'estomac, du foie et des reins, dans le traitement de l'inflammation viscérale, gale, troubles gastro-intestinaux, mal des transports, douleurs articulaires et maux de dents (**Rahman, 2018**). Son huile essentielle a été recommandée pour soigner les maladies abdominales et utiliser comme antiseptique et hyperglycémiant (**Gourine et al., 2010a**). Sans oublier le mastic est utilisé par le peuple turc comme un antiseptique urinaire et respiratoire (**Ben Ahmed et al., 2021**). En Algérie et en Maroc, le mastic est également employé comme gomme permettant de renforcer les gencives, de désodoriser l'haleine, de combattre la toux et les frissons et de traiter les maladies de l'estomac (**Ben Ahmed et al., 2021; Hajjaj et al., 2017**). Il est aussi utilisé pour diminuer le stress, comme tonique et pour son activité antidiarrhéique (**Yousfi et al., 2002**).

## 5 Travaux antérieurs

Les vertus thérapeutiques de Pistachier de l'Atlas, connues par les différentes populations locales ont incité les chercheurs à s'y intéresser de très près. En effet cette plante a fait l'objet de plusieurs études, révélant diverses activités biochimiques telles que les activités antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antidiabétiques, anti-cholinestéras, analgésiques, cicatrisantes, anticancéreuses, hépatoprotectrices, protectrices des érythrocytes, inhibition de l'uréase, anti-leishmania, etc. Le **tableau 02** suivant répertorie quelques études réalisées sur différentes parties de la plante *Pistacia atlantica*.

Tableau 02 : Travaux antérieurs d'intérêt médicale sur l'espèce *Pistacia atlantica*

Activités étudiées	Partie de la plante	Solvants utilisés	Observations	Références
Activité Antioxydante	Feuille (HE)	Eau	Les huiles testées (mâles et femelles) ont enregistré une activité antioxydante. Les valeurs IC50 des tests (DPPH et FRAP) ont été plus faibles par rapport à celles des antioxydants standards tels que (BHT, BHA et acide ascorbique), à l'exception des valeurs du test FRAP des feuilles femelles qui étaient presque dix fois supérieures à l'acide ascorbique.	(Gourine <i>et al.</i> , 2010b)
	Feuille	Acetone/eau ; v/v)	L'activité antioxydante a fluctué de 262 à 677 (mg AAE / g) pour le tes DPPH et de 296 à 970 mg AAE / g pour le test FRAP. L'acide quinique, l'acide gallique et l'acide galloylquinique neutralisent le DPPH par contre la glucogalline, le trigalloylglucose, l'acide gallique et l'acide tétragalloylquinique sont responsables du pouvoir réducteur.	(Ben-Ahmed <i>et al.</i> , 2016)
	Feuille et Tige	Méthanol, Acétate d'éthyle et Butanol	Les extraits de l'acétate d'éthyle ont présenté une activité antioxydante la plus élevée et cela pour les trois tests (DPPH, ABTS et CUPRAC).	(Achili <i>et al.</i> , 2020)
	Fruit et Fleur (HE)	Eau	Tous les extraits d'HE des feuilles et des fleurs ont présenté des activités à piéger les radicaux DPPH, ABTS et $\beta$ -carotène-acide linoléique. Cependant l'activité antioxydant des fleurs est plus faibles à celle des feuilles.	(Labeled-Zouad <i>et al.</i> , 2017)
	Fruit (FI de l'huile)	n-Hexane	Les valeurs de IC50 du test DPPH des fruits non mûrs, à matures moyennes et mûres ont été de 0,87, 0,6 et 0,48 mg/ml, respectivement.	(Bentireche <i>et al.</i> , 2019)
	Feuille, Fruit et Galle	n-Hexane	Tous les extrait feuilles, fruits et galles ont présenté une activité antioxydante à savoir à piéger les radicaux DPPH, ABTS et à réduire le fer (FRAP). Les valeurs ont varié pendant la saison.	(Chelghoum <i>et al.</i> , 2020)
	Tige et Racine	Méthanol, Acétate d'éthyle et Butanol	L'extrait brut méthanolique a présenté pour la plupart une activité antioxydante la plus élevée et cela pour les trois méthodes (DPPH, FRAP et le blanchiment au $\beta$ -carotène).	(Toul <i>et al.</i> , 2017)
	Galle (HE)	Eau	Les valeurs IC50 de l'activité de piégeage du DPPH et de l'ABTS ont varié entre 0,41 et 2 mg/ml, tandis que pour le test FRAP, elles ont été comprises entre 0,1 et 0,1 mg/g.	(Sifi <i>et al.</i> , 2015)
	Feuille	Acetone/eau ; v/v)	Les activités inhibitrices des extraits de feuilles contre l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase ont été souvent plus influencées par la période de la récolte. La valeur IC50 moyenne des extraits contre l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase a été de 48,0 et 14,0 $\mu$ g/ml, respectivement. La glucogalline, l'acide quinique et les acides	(Ben -Ahmed <i>et al.</i> , 2018)

Activité antidiabétique	Fruit	n-Hexane	galloylquiniques semblent être responsables de l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase, tandis que le méthyle gallate et le tétragalloylglucoside ont été considérés comme importants pour l'inhibition $\alpha$ -glucosidase. L'étude a révélé que l'administration orale répétée d'extraits pendant 15 jours évoque un effet bénéfique sur l'hyperglycémie chez les souris diabétiques. De plus, des coupes tissulaires du pancréas chez les souris traitées ont démontré une régénération améliorée des cellules $\beta$ et une taille accrue des îlots pancréatiques.	(Hashemnia <i>et al.</i> , 2015)
	Fruit mûr (CP et HE)	(Méthanol/ Eau ; v/v)	Différentes doses d'extrait hydroalcoolique et d'huile essentielle (50, 100 et 200 mg / kg) ont été administrées pendant trois semaines aux souris dans des groupes séparés. Les résultats ont montré un effet bénéfique significatif contre l'hyperlipidémie, le stress oxydatif et la réponse inflammatoire chez les souris diabétiques.	(Hosseini <i>et al.</i> , 2020)
Activité anti-acétylcholinestérase	Feuille	Eau	L'extrait a inhibé l'AChE à une concentration allant de 5 à 25 $\mu\text{g/ml}$ . L'inhibition maximale a été de 100%.	(Benamar <i>et al.</i> , 2010)
	Feuille	Eau	L'extrait aqueux a inhibé efficacement l'activité de l'acétylcholinestérase avec une valeur IC50 de 58,0 $\mu\text{g/ml}$ .	(Peksel <i>et al.</i> , 2013)
	Fruit et Fleur (HE)	Eau	L'huile essentielle de feuilles et de fleurs ont présenté une bonne activité anticholinestérase avec un IC50 de 18,5 et 20,5 $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.	(Labeled-Zouad <i>et al.</i> , 2017)
	Feuille et Tige	Méthanol, Acétate d'éthyle et Butanol	Les extraits de <i>P. atlantica</i> ont inhibé les activités de l'AChE et du BChE. L'extrait d'acétate d'éthyle a présenté le pouvoir inhibiteur le plus élevé sur l'AChE et le BChE des deux parties (tige et feuille).	(Achili <i>et al.</i> , 2020)
Activité antimicrobienne	Feuille	Ethanol	<i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella typhi</i> ont montré un effet sensibilisant à une dose de 5 $\mu\text{l}$ et un effet très significatif à 10 $\mu\text{l}$ .	(Benhammou <i>et al.</i> , 2008)
	Feuille	Ethanol, Méthanol et Acétate d'éthyle	L'extrait d'acétate d'éthyle a montré un effet contre <i>S. aureus</i> tandis que l'extrait méthanolique ont été efficace contre <i>B. subtilis</i> . L'extrait éthanolique ont présenté une activité contre une souche bactérienne Gram-positif ( <i>S. saprophyticus</i> ) et contre un Gram-négatif ( <i>C. freundii</i> ).	(Othman <i>et al.</i> , 2019)
	Fruit	Méthanol, Ethanol et (Ethanol /Eau)	Les extraits ont révélé une activité antibactérienne contre <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> à des concentrations de 25 à 75 mg/ml. Les zones d'inhibition sont supérieures à 7 mm, ce qui est considéré comme la limite pour être un antibiotique raisonnable.	(Tohidi <i>et al.</i> , 2011)

	Fruit (Huile)	/	L'huile extraite par la méthode soxhlet a montré une forte activité antibactérienne contre <i>E. coli</i> , <i>Acenitobacter boumanii</i> et <i>P. aeruginosa</i> , tandis que l'activité antibactérienne de l'huile extraite par la méthode traditionnelle n'a été efficace que contre deux bactéries, <i>E. coli</i> et <i>Acenitobacter boumanii</i> .	(Abdenebi et al., 2016)
	Galle	Eau	Les extraits aqueux de galles vertes et rouges ont démontré une activité antibactérienne contre l'espèce <i>Bacillus</i> et contre <i>P. aeruginosa</i> .	(Yoram et Inbar, 2011)
	Galle (HE)	Eau	Les huiles ont montré des valeurs de CMI allant de 0,16 à 2,5 mg/ml et des valeurs de MBC de 0,62 à > 2,5 mg / ml contre trois espèces de mycobactéries : <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>M. aurum</i> et <i>M. fortuitum</i> . <i>M. fortuitum</i> était la souche la plus résistante.	(Sifi et al., 2015)
Activité antifongique	Feuille et Fruit	Méthanol, Eau et (Méthanol/ Eau)	Les extraits ont présenté à la fois des activités fongostatiques et fongicides contre <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> et <i>S. cerevisiae</i> , avec une CMI allant de 6,7 à 26,7 mg/ml et une concentration fongicide minimale (MFC) allant de 13 à 37 mg/ml.	(Falahati et al., 2015)
	Feuille et Fruit	Ethanol	Une activité plutôt faible a été observée contre <i>C. tropicalis</i> (CMI = 25 mg / ml) et une activité modérée contre <i>C. albicans</i> et <i>A. flavus</i> (CMI = 12,5 mg/ml), tandis que les extraits ont montré une activité puissante contre <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> et <i>A. fumigates</i> (CMI = 6,3 mg/mL). Les extraits de feuilles ont été inefficaces contre <i>A. niger</i> .	(Shialy et al., 2015)
	Gomme	/	La gomme a inhibé la croissance d' <i>A. parasiticus</i> à des valeurs de CMI de 125 mg / ml et à réduire efficacement la production d'aflatoxine.	(Khodavaisy et al., 2016)
Activité anti-inflammatoire	Feuille, Fruit et Bourgeon	Eau	Les extraits à des doses de 200 et 400 mg/kg ont montré une très bonne activité anti-inflammatoire contre un œdème aigu de la patte induit par la carraghénine après 1h30. Une inhibition maximale a été observée après 3 h à 6 h. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait testé était plus puissante que celle du médicament standard, l'indométacine.	(Hajjaj et al., 2017)
	Fruit (HE)	Eau	L'huile essentielle à une dose de 100 mg/kg a montré une activité anti-inflammatoire significative en utilisant la méthode de l'œdème de patte induit par la carraghénine chez le rat.	(Ghizlane et al., 2018)
	Résine	/	L'étude de la résine dans le traitement de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin dans un modèle de rat induit par l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique a montré une amélioration de l'ulcère, une réduction des macrophages et des lymphocytes dans la région de l'ulcère et une faible infiltration polymorphonucléaire dans la couche sous-muqueuse.	(Gholami et al., 2016)
Activité anticancéreuse et cytotoxique	Feuille	Ethanol	L'activité cytotoxique de l'extrait sur AGS (carcinome gastrique humain), HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus) et HDF (fibroblastes dermiques humains) a été évaluée par le test MTT 48 h après le traitement. L'extrait a inhibé la prolifération des cellules AGS, HeLa et HDF avec des valeurs IC50 de 382, 332 et 896 µg/ml, respectivement.	(Hashemi et al., 2017)

Activité antiparasitaire	Fruit	Méthanol	Les résultats ont démontré que l'extrait à des concentrations de 25 et 50 mg/ml après 20 et 10 min d'exposition ont tué 100% les protoscolecques de kystes hydatiques chez le modèle de souris.	(Mahmoudva <i>et al.</i> , 2016)
	Gomme	/	L'administration de gomme pendant 28 jours a diminué la taille des lésions cutanées chez les souris Balb / c infectées par <i>Leishmania major</i> par rapport aux témoins.	(Taran <i>et al.</i> , 2010)
Activité insecticide	Feuille (HE)	Eau	Les huiles essentielles ont présenté une bonne activité insecticide contre les insectes adultes <i>Tribolium confusum</i> . La concentration estimée pour tuer 50% des insectes traités (CL50) ont été de 7,5 µl/l d'air.	(Tabti <i>et al.</i> , 2020)
Activité anti-uréase	Feuille, Fruit, Ecorce et Racine	Acetate d'éthyle, n-Hexane et Chloroforme	L'extrait brut a révélé une activité inhibitrice significative de l'uréase (95,4% à 0,2 mg/ml) avec une IC50 de 32,0 µg/ml. Lors du fractionnement, la fraction d'acétate d'éthyle a présenté une valeur IC50 de 19,9 µg/ml. Cependant, les fractions de n-hexane et de chloroforme ont présenté une inhibition non significative de l'uréase.	(Uddin <i>et al.</i> , 2016)
Activité anti-obésité	Racine	Eau	L'extrait aqueux a révélé une activité inhibitrice à 100% de la lipase, à une concentration de 1 mg/ml après 30 min d'incubation.	(Ben Hmed <i>et al.</i> , 2019)

*Chapitre*

---

**2**

***Généralités sur les lipides***

## 1 Généralités sur les lipides

Les lipides sont des composés synthétisés par les cellules des tissus végétaux ou animaux. Majoritairement, ils sont sous forme de phospholipides et de glycolipides (lipides de réserve) localisés dans les membranes cytoplasmiques, nucléaires ou encore en faible quantité dans le réticulum endoplasmique (**Acheheb, 2013**). Les huiles végétales sont principalement constituées de triacylglycérol (95-98%) et d'un mélange complexe de composés mineurs (2-5%). Ces composants mineurs comprennent les mono, diglycérides, les acides gras libres, les tocophérols, les stérols, les caroténoïdes et les polyphénols (**Givianrad *et al.*, 2013**).

La plupart des familles de molécules du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, à l'exception des lipides, qui sont caractérisés par une propriété physique: la solubilité (**Bouhadjra, 2011**). En effet, ce sont des composés qui se dissolvent facilement dans les solvants organiques (chloroforme, acétone, cyclohexane, éther diéthylique, benzène, méthanol, etc.) mais sont peu ou pas solubles dans l'eau (**Belfadel, 2009; Guenane, 2017**). Les termes huiles, beurres, graisses, cires ne désignent que leur état physique liquide ou solide à température ambiante (**Belfadel, 2009**).

Les lipides se répartissent en plusieurs classes dont la plus courante est appelée lipides vrais. Ils résultent de la condensation d'acides gras avec des alcools par une liaison ester ou amide (**Belfadel, 2009**) et sont divisés en lipides simples ou homolipides qui sont neutres comprenant les glycérolipides (l'alcool est le glycérol), les cérides (l'alcool à longue chaîne carbonée) et les stérides (l'alcool est un stérol). Ils regroupent également les lipides complexes ou hétérolipides, qui contiennent en plus des précédents du phosphore, de l'azote, du soufre ou des oses. Notamment, on retrouve la classe des composés à caractère lipidique (lipoïdes) qui renferment les isoprénoïdes (dérivés d'unités isoprènes) et les eicosanoïdes (des médiateurs dérivés d'un acide gras) (**Bouhadjra, 2011; Guenane, 2017**).

## 2 Composition des lipides

### 2.1 Acides gras

Les acides gras sont des acides organiques, constituants de base des triglycérides et représentants majoritaires de la classe des lipides (**Guenane, 2017**). Ils sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée comprenant un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ -) à l'une de ses extrémités et un groupement carboxyle ( $-\text{COOH}$ ) à l'autre extrémité (**Belfadel, 2009**). La chaîne aliphatique hydrocarbonée possède généralement un nombre pair de carbone dont la longueur peut varier

de 4 à 30 atomes (Guenane, 2017). Cette chaîne peut être saturée ou non saturée selon qu'elle ne contient pas ou contient des doubles liaisons (Cuvelier *et al.*, 2004), conférant à la plupart des lipides leurs propriétés d'insolubilité dans l'eau et leur consistance grasseuse ou huileuse (Hamia, 2007). Ces acides gras, généralement non ramifiés, diffèrent entre eux par la longueur de leur chaîne, la présence, le nombre, la position des doubles liaisons et la structure spatiale (*cis*, *trans*) des doubles liaisons (Cuvelier *et al.*, 2004). Les acides gras sont souvent désignés par des numéros de la forme Cx: n  $\Delta^m$ , dans laquelle x représente le nombre de carbone de l'acide gras, n le nombre de doubles liaisons et la lettre m correspond à la position de la double liaison à partir du groupement terminal (CH<sub>3</sub>-) de la molécule (Belfadel, 2009).

## 2.1.1 Classification des acides gras

### 2.1.1.1 Acides gras saturés et insaturés

La formule chimique générale des acides gras saturés est la suivante: C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>O<sub>2</sub> (Cuvelier *et al.*, 2004). La plupart des acides gras retrouvés à l'état naturel ont un nombre pair d'atome de carbone et à chaîne linéaire ; ils sont retrouvés chez les animaux, végétaux et microbes (Belfadel, 2009; Cuvelier *et al.*, 2004). Le point de fusion des acides gras augmente avec la longueur de la chaîne carbonée ; ainsi, les acides gras à courte chaîne sont liquides à température ambiante, tandis que ceux contenant 10 atomes de carbone ou plus sont solides (Cuvelier *et al.*, 2004). Les acides gras les plus communs ont 14 à 20 carbones (Belfadel, 2009), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) sont les plus fréquents dans les huiles végétales (Hamia, 2007). Les acides gras à chaînes courtes (de 4 à 10 C) sont surtout présents dans le beurre où l'acide butyrique est très majoritaire (Guenane, 2017). Alors que les acides gras ayant un nombre de carbones supérieur à 24 sont essentiellement des composants des cires protectrices fabriqués par les plantes, les bactéries et insectes (Belfadel, 2009).

En revanche, les acides gras insaturés représentent plus de la moitié des acides gras des plantes et des animaux (Belfadel, 2009), possédant soit une double liaison (monoinsaturation AGMI) ou plusieurs (polyinsaturation AGPI) (Guenane, 2017). La formule chimique générale des acides gras insaturés est la suivante : C<sub>n</sub>H<sub>2n-x</sub>O<sub>2</sub>, il peut donc exister un grand nombre d'isomères, en fonction du nombre et de la position de la double liaison, mais aussi en fonction de la configuration *cis* ou *trans*. Lorsque des isomères possèdent une double liaison dont la position n'est pas identique, ils sont appelés des isomères de structure ou isomères constitutionnels. Tandis que, les isomères ayant la même structure chimique et la même position

de la double liaison, cependant leur configuration spatiale *cis/trans* diffère, ils sont appelés des isomères géométriques (Cuvelier *et al.*, 2004).

A l'état naturel, la plupart des acides gras insaturés ont des longueurs de chaînes de 16 à 20 carbones et souvent, la première double liaison est située entre les C9 et C10 (Belfadel, 2009). Les acides gras polyinsaturés sont plus répandus par rapport aux mono-insaturés (Belfadel, 2009), leurs doubles liaisons sont séparées par un groupement méthylique, dans quelques cas elles peuvent être conjuguées (Bouhadjra, 2011). La majorité des acides gras ont la configuration *cis*, cela signifie que l'atome d'hydrogène est situé du côté de la double liaison, et que l'atome d'hydrogène du carbone suivant est situé du même côté (Belfadel, 2009). A titre d'exemple, il est fréquent de rencontrer les acides gras insaturés suivants en C18 (Cuvelier *et al.*, 2004):

-Acide oléique C18 : 1 (figure 09)

-Acide linoléique C18 : 2

-Acide linoléinique C18 : 3

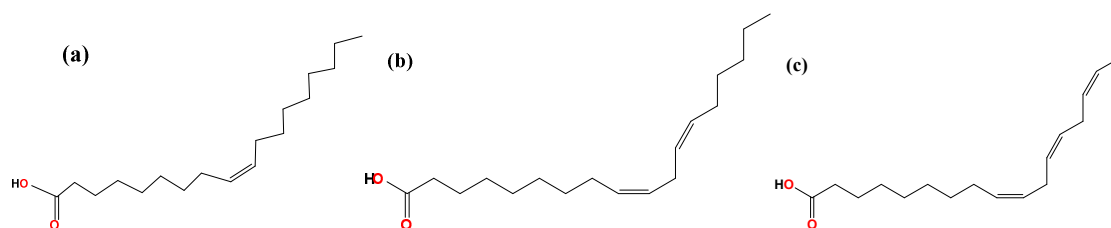
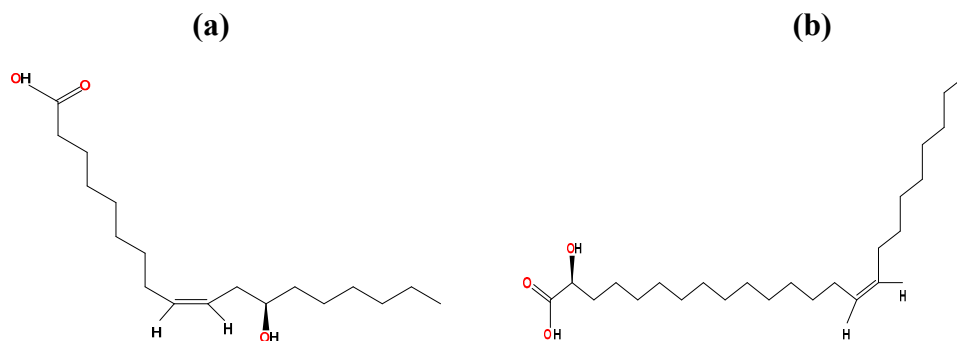


Figure 09 : Acide oléique (a), Acide linoléique (b) et Acide linoléinique (c).

### 2.1.1.2 Acides gras hydroxyles

#### -Acides gras hydroxylés

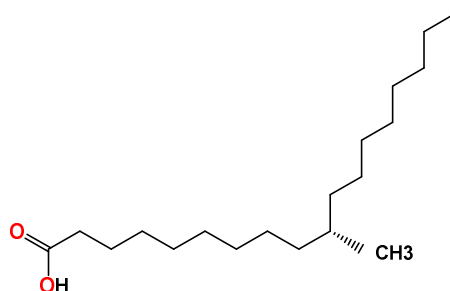
Ces acides gras comprennent un ou plusieurs groupements hydroxyle (-OH). Les végétaux ont la capacité de synthétiser une série d'acides gras hydroxylés tels que l'acide ricinoléique (figure 10) (H Guenane, 2017). Chez les animaux, on retrouve l'acide nervonique (figure 10) où le OH est sur le C2 de l'acide gras.



**Figure 10** : Acide ricinoléique (a) et acide nervonique 2 hydroxy (b)

### -Acides gras ramifiés

Ces acides gras portent une ramification au niveau de la chaîne carbonée (**Guenane, 2017**). A titre d'exemple, *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, est riche en acide tuberculostéarique (**Figure 11**). Ce dernier est porteur de méthyle en position 10.



**Figure 11** : Acide tuberculostéarique (acide 10-méthylstéarique)

### -Acides gras cycliques

Ces acides gras possèdent une structure cyclique au niveau de la chaîne carbonée. A titre d'exemple, l'acide gorlique (**Figure 12**), un acide gras à 18 atomes de carbone et qui se termine par un cycle cyclopenténique. Il est extrait de l'huile de chaulmoogra, un arbre de la famille des *Flacourtiaceae*, largement utilisée dans le traitement de la lèpre et d'autres maladies cutanées (**Sengupta et al., 1973**).

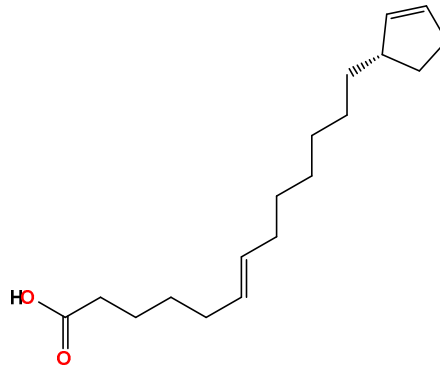


Figure 12 : Acide gorlique

### 2.1.2 Rôle des acides gras

Les acides gras sont importants pour l'organisme humain et cela pour plusieurs raisons. Ils entrent dans la composition des glycérophospholipides et des sphingolipides, qui sont des constituants essentiels des membranes biologiques (Guenane, 2017). Les acides gras à longue chaîne (palmitique et stéarique) et leurs dérivés sont indispensables au développement du cerveau des enfants (Alais *et al.*, 2003). D'autres acides gras à chaîne courte et moyenne tels que l'acide myristique (C14) peuvent se lier aux différentes protéines par acylation. En effet, ce rôle physiologique permet à la protéine de s'insérer dans la membrane cellulaire (Alais *et al.*, 2003). Certains acides gras sont nommés acides gras essentiels (AGE), tels que l'acide linoléique (oméga-6), l'acide  $\alpha$ -linoléique (oméga-3) et l'acide arachidonique (Hamia, 2007). Les AGE sont nécessaires pour la formation des cellules nerveuses (Alais *et al.*, 2003), jouent un rôle fondamental dans la biosynthèse des prostaglandines (Hamia, 2007) et réduisent les risques de maladies cardio-vasculaires. Leur apport est indispensable vu l'incapacité de l'organisme humain de les synthétiser (Bolea, 2019). Les acides gras (mono-insaturés) influencent positivement le taux de cholestérol sanguin. Ils abaissent le mauvais cholestérol (LDL) et augmentent le bon cholestérol (HDL) (Belfadel, 2009). Notamment, les acides gras servent d'énergie, étant stockés sous forme de triacylglycérols (Guenane, 2017). Néanmoins, malgré le rôle bénéfique pour la santé des AGPI (n-3), leur sensibilité à l'oxydation leur confère également un rôle potentiellement délétère (Bolea, 2019).

## 2.2 Lipides simples

Les lipides simples (homolipides) sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool (Guenane, 2017):

-**Acylglycérols** (ou glycérides) sont des esters du glycérol.

-**Cérides** sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras).

-**Stérides** sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

Les triglycérides (TG) sont les lipides les plus abondants dans l'alimentation et sont les constituants principaux des graisses animales et des huiles végétales (Bolea, 2019). Les TG (Figure 13) sont des triesters résultant de la combinaison de trois molécules d'acide gras par leur fonction carboxyle avec les fonctions alcooliques du glycérol (Bouhadjra, 2011). Selon l'identité des trois acides gras qui estérifient le glycérol, on obtient différents types de TG : les triglycérides simples (les AG sont identiques) et les triglycérides mixtes (deux ou trois AG sont différents). La façon dont les acides gras sont associés pour former les diverses molécules de triglycérides influence les propriétés physiques, la réactivité chimique et les comportements physiologiques des corps gras (Hamia, 2007). Ils ont un rôle fondamental par leur fonction de réserve énergétique anhydre dans les cellules adipeuses. Il n'y a aucune source de graisses alimentaires complètement saturées ou insaturées (Bolea, 2019).

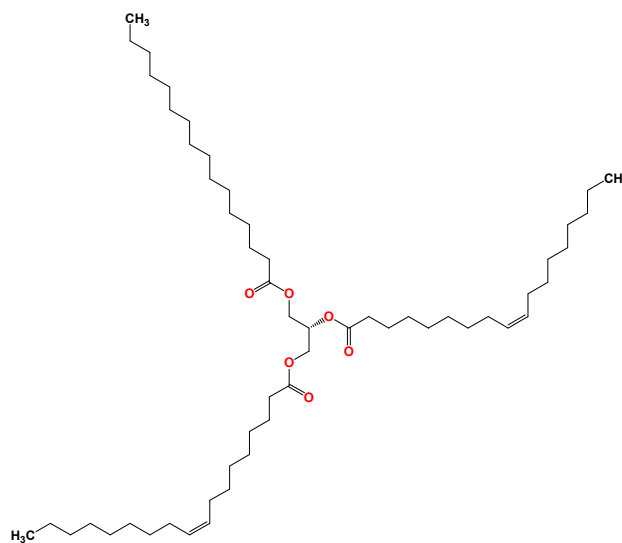


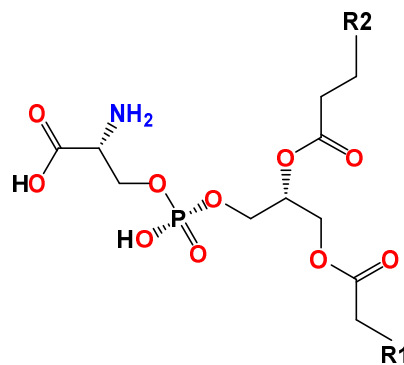
Figure 13 : 1,2-Dioleoyl-3-palmitoylglycérol (Triglycéride OOP)

### 2.3 Lipides complexes

Les lipides complexes (hétérolipides) sont des lipides simples liés à des molécules de sucre, d'acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore ou du soufre (Guenane, 2017). C'est une grande famille de constituants biochimiques, retrouvée dans les membranes cellulaires et dans des structures subcellulaires, comme les mitochondries. Ces lipides sont très répandus, cependant en faible quantité (Alais *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Phosphoacylglycérols

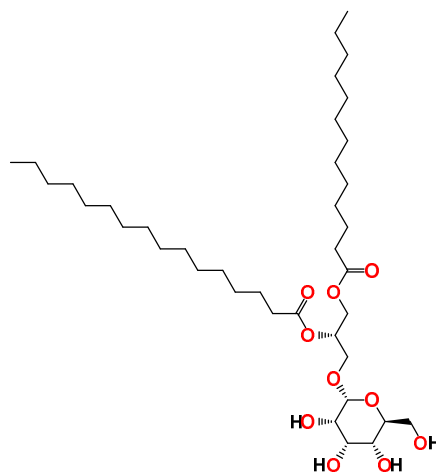
Les phosphoacylglycérols, encore appelés glycérophospholipides ou phosphoglycérides, sont des 1,2- diacylglycérols avec en position, un résidu phosphorique, qui est lié à son tour soit par un hydroxyaminoacide (sérine) (**Figure 14**), soit à un amine hydroxylée (choline, éthanolamine) ou un polyol (inositol) (**Alais *et al.*, 2003**). Les phosphoacylglycérols sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent une tête polaire (liée au groupement phosphate) et deux chaînes aliphatiques (apolaires). Les acides gras estérifiés au niveau du glycérol peuvent varier mais en général, l'un des deux est saturé (**Bolea, 2019**).



**Figure 14** : 1,2-Distearoyl-sn-3-glycérophosphoserine

### 2.3.2 Glycéroglycolipides

Les glycéroglycolipides sont des esters du glycérol dont les positions sn-1 et sn-2 sont estérifiées par des AG et la fonction alcool en sn-3 est liée à un ose par une liaison glycosidique (**Guenane, 2017**), à titre d'exemple 1, 2-diacyl-3-galactosyl-sn-glycérol (**Figure 15**).



**Figure 15**: 1, 2-diacyl-3-galactosyl-sn-glycérol

### 2.3.3 Sphingolipides

Les sphingolipides sont retrouvés dans les membranes et les micro-domaines membranaires. Ils interviennent dans le maintien de la structure membranaire et jouent un rôle de second messager et de récepteur (Devillard, 2011; Fasano *et al.*, 2006). Ces lipides présentent une base sphingoïde commune, une molécule à longue chaîne (18-20 carbones) possédant une fonction amine. La liaison d'un acide gras à la base azotée de la sphingoïde par une liaison amide donne une céramide. Deux types de sphingolipides se définissent en fonction de la tête polaire: si la tête est un glucide, on obtient les glycosphingolipides et si un groupement phosphate est lié à l'alcool, on aura les sphingophospholipides (Devillard, 2011). La sphingomyéline dont le groupement phosphate est la choline (Figure 16).

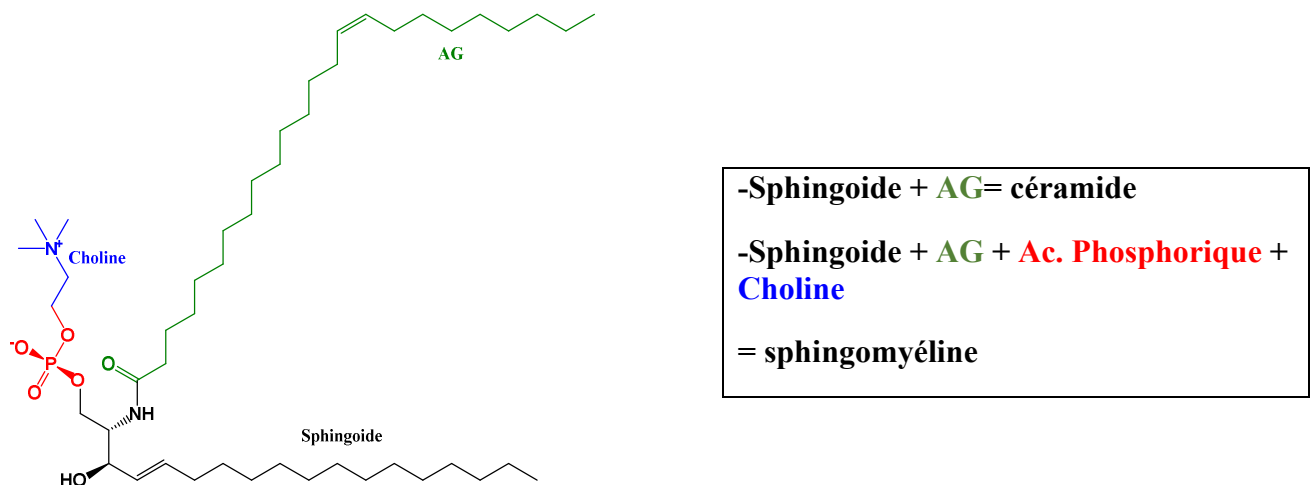


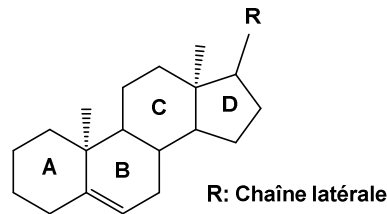
Figure 16 : Structure chimique de la sphingomyéline

## 2.4 Fraction insaponifiable

Ce groupe a la propriété de ne pas être altéré par un traitement alcalin de saponification d'où le terme d'insaponifiable (Guenane, 2017).

### 2.4.1 Stéroïdes

Les stéroïdes constituent un groupe synthétisé à partir d'unité isoprénique à cinq carbones (Guenane, 2017; Weinman et Mehul, 2004). Ils ont un squelette nommé le stérane (Belfadel, 2009), formé par la fusion de quatre cycles hydrocarbonés, trois de type cyclohexanique (les cycles A, B et C) et un de type cyclopentanique (le cycle D) (Figure 17) (Guenane, 2017).



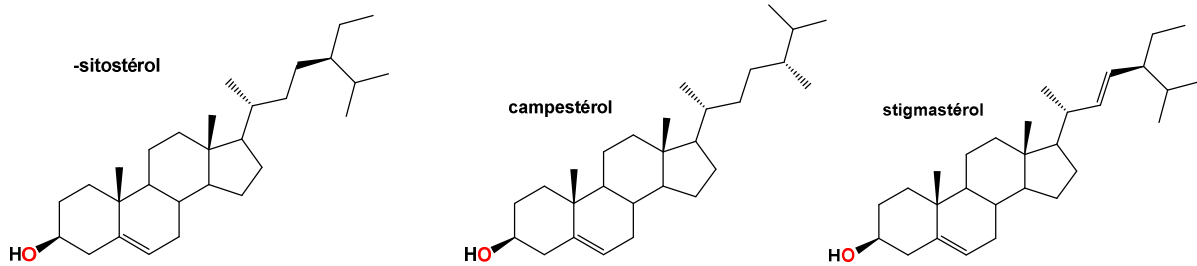
**Figure 17** : Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.

#### 2.4.1.1 Stérols

Les stérols sont répandus chez les êtres vivants, aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. On les trouve également chez les micro-organismes (**Hamia, 2007**). Ils comprennent au moins un groupement hydroxyle (-OH) dans la plupart des cas sur le carbone 3 et une double liaison localisée souvent en position 5 mais aussi parfois en position 7. Quant à la chaîne latérale, elle diffère d'un stérol à un autre. Elle peut contenir 8 à 10 carbones, saturée ou insaturée (**Guenane, 2017**). Le stérol le plus répandu dans le règne animal est le cholestérol. Ce dernier permet la stabilité des membranes cellulaires lorsqu'il est libre ou encore sert de stockage / transport, lorsqu'il est associé aux triacylglycérols (**Moreau et al., 2002; Piironen et al., 2000**).

#### 2.4.1.2 Phytostérols

Les stérols végétaux, également connus sous le nom de phytostérols sont des composants bioactifs de tous les aliments végétaux (**Lagarda et al., 2006**). Ils se différencient des autres stérols par une modification dans la chaîne latérale R, cette dernière peut comporter un groupement méthyle ou éthyle fixé sur le carbone C 24, dans certains cas, une double liaison supplémentaire en C 22 (**Belfadel, 2009**) et contenir 9 à 10 atomes de carbone, au lieu de 8 que l'on trouve dans le cholestérol (Lagarda et al., 2006). Il a été rapporté que plus de 250 types de phytostérols ont été signalés dans diverses matières végétales et marines, les plus courants sont le  $\beta$ -sitostérol (24- $\alpha$ -éthylcholestérol), le campestérol (24- $\alpha$ -méthylcholestérol) et le stigmastérol ( $\Delta^{22}$ , 24- $\alpha$ -éthylcholestérol) (**Figure 18**) (**Piironen et al., 2000**). Dans la nature, les stérols existent sous forme libres, ou estérifiés soit par un acide gras ou un acide hydroxycinnamique ou encore glycosylé avec un hexose (généralement le glucose) (**Fernandes et Cabral, 2007; Lagarda et al., 2006**).



**Figure 18** : Structure chimique des principaux phytostérols d'origine végétale.

### -Rôle des phytostérols

Les phytostérols jouent un rôle majeur dans plusieurs domaines (**Fernandes et Cabral, 2007**), à savoir physiologique mais également nutritionnel, pharmacologique et autres tels que cosmétique. La structure des stérols végétaux est apparentée à celle du cholestérol et ils jouent dans les membranes végétales le même rôle que le cholestérol dans les membranes animales (**Belfadel, 2009**). Les phytostérols stabilisent les membranes végétales ; une augmentation du rapport stérol / phospholipide entraîne une rigidification de la membrane (**Itzhaki *et al.*, 1990**; **Moreau *et al.*, 2002**). En outre, le groupe hydroxyle libre dans les stérols libres est un facteur important permettant des interactions spécifiques avec les phospholipides et les protéines des membranes. Ils participent au contrôle des processus métaboliques membranaires, cellulaires et dans le développement des plantes en tant que précurseurs des brassinostéroïdes (**Piironen *et al.*, 2000**). Ces derniers ont une structure voisine à celle des hormones stéroïdes des mammifères. Ils règlent l'activité de nombreux gènes, en particulier ceux responsables de la fertilité et de la croissance de la plante (**Guenane, 2017**; **Szekeress *et al.*, 1996**). Notamment, les phytostérols agissent comme des substrats pour une grande variété de métabolites secondaires tels que les glycoalcaloïdes, les cardénolides et les saponines (**Piironen *et al.*, 2000**).

Dans la consommation humaine de stérols végétaux, en particulier les 4-desméthyl stérols (principalement le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol et le campestérol), inhibent l'absorption digestive du cholestérol et accélèrent l'efflux de cholestérol hors des entérocytes vers la lumière intestinale (**Belfadel, 2009**; **Fernandes et Cabral, 2007**). En plus de leurs propriétés anti-cholestérol, ils réduisent la pression artérielle, le risque de maladie cardiaque chronique (**Khatoon *et al.*, 2010**). Le  $\beta$ -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède plusieurs propriétés telles que anti-inflammatoire (**Fernandes et Cabral, 2007**; **Khatoon *et al.*, 2010**), antitumorale (**Khatoon *et al.*, 2010**; **Ling et Jones, 1995**), antimutagénique (**Park *et al.*, 2004**), antipyrétique, antinéoplasique, des propriétés

immunomodulatrices (Belfadel, 2009; Bouic *et al.*, 1999) et antioxydantes (Khatoon *et al.*, 2010).

### 2.4.2 Tocophérols

Les tocophérols possèdent un noyau hydroxychromane mono-, di-, ou tri-méthylé lié à une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones (Belfadel, 2009; Guenane, 2017). Par contre, les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (Figure 19, b) (Belfadel, 2009). Le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et de tocotriénols, conduisant ainsi à la formation de huit combinaisons naturelles (Figure 19) (Guenane, 2017). Ils sont au nombre de quatre isomères ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Bouhadjra, 2011), possédant un pouvoir vitaminique lié aux propriétés antioxydantes. Ces composés sont classés dans le groupe des vitamines liposolubles (vitamine E) (Hamia, 2007). Cependant, la forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol par rapport aux autres isomères (Belfadel, 2009).

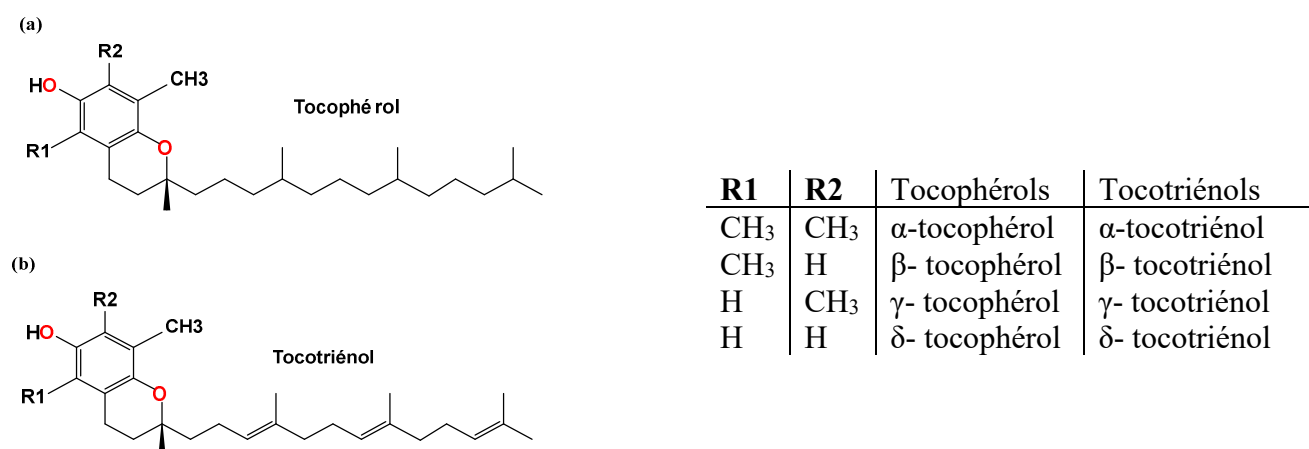


Figure 19 : structure des différents isomères tocophérols et tocotriénols.

#### -Rôle des tocophérols

Les tocophérols agissent comme des antioxydants. Ils s'opposent aux phénomènes oxydatifs, en protégeant les acides gras, les vitamines A et C et les membranes cellulaires (Alais *et al.*, 2003; Givianrad *et al.*, 2013). Outre l'activité antioxydante, les tocophérols réduisent le risque de cancer, les maladies cardiovasculaires, préviennent la progression des lésions précancéreuse (Acheheb, 2013) et renforcent le système immunitaire (Belfadel, 2009). La vitamine E possède une activité anti-inflammatoire, elle diminue les érythèmes et les œdèmes, en inhibant le mécanisme de peroxydation des lipides qui aboutit à la formation de

prostaglandines qui sont des médiateurs physiologiques de l'inflammation (**Belfadel, 2009**). Certaines recherches médicales sur le Virus HIV (maladie de SIDA) ont démontré les effets bénéfiques de la vitamine E à retarder l'évolution de l'infection par ce virus (**Hamia, 2007**). Notamment, la carence en tocophérols peut causer des problèmes neurologiques tels que l'ataxie spinocérébelleuse et les myopathies (**Brigelius-Flohé et Traber, 1999**). De plus, la vitamine E renferme des propriétés antirides et hydratantes. En effet, elle augmente la rétention d'eau de la peau, ce qui lui permet d'améliorer son aspect de surface et diminuer l'amplitude des rides ; la peau devient plus souple et plus douce (**Belfadel, 2009**).

### 2.4.3 Cires

Les cires sont des esters d'acides gras et de mono alcools aliphatiques (principalement alcools gras) (**Bouhadjra, 2011**). Ce sont des composés insolubles de haut poids moléculaire avec un point de fusion élevé et naturellement présents dans les huiles végétales brutes (**Acheheb, 2013**), existent également dans le règne animal (principalement cétacés et poissons) (**Bouhadjra, 2011**) et notamment chez certains insectes tels que les abeilles qui produisent de la cire. Dans les huiles, ils sont principalement responsables de l'apparition de trouble (turbidité) (**Acheheb, 2013**).

*Chapitre*

---

**3**

***Généralités sur les composés  
phénoliques***

## 1 Généralités sur les composés phénoliques

Les plantes possèdent des métabolites dits secondaires par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ils sont divisés en plusieurs catégories telles que les composés phénoliques, les terpènes, stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes (**Djenidi, 2012**). Les composés phénoliques sont des phyto-micronutriments synthétisés par les plantes (**Bouchouka, 2016**), au cours des différents stades de leur développement (**Guenane, 2017**). Ils constituent un grand groupe hétérogène de métabolites secondaires tant par leur composition que par leur structure (**Kebbab, 2014**), largement répandus dans le règne végétal (**Blainski *et al.*, 2013**), localisés dans tous les organes de la plante, à savoirs (les feuilles, les fruits, les fleurs, les tiges, les racines ... etc.) (**Djenidi, 2012**), présents dans les vacuoles des tissus (**Zerargui, 2015**) et ne sont pas rencontrés dans la nature à l'état libre mais sous forme d'esters ou plus généralement sous forme d'hétérosides (**Bouhadjra, 2011**). Ces composés phénoliques sont d'actualité en raison de multiples propriétés biologiques pour la plante et pharmacologiques (antioxydants, antidiabétiques, anti-inflammatoires, antimicrobiens, anti-allergènes, anti cancérogènes ...etc.) bénéfiques pour la santé humaine (**Generalic *et al.*, 2012**). En effet, ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales: les insectes, les champignons ou les maladies (**Gee et Johnson, 2001; Rhazi, 2015**). Ils sont attractifs pour les pollinisateurs, contributeurs à la pigmentation des plantes, agents protecteurs contre les rayons UV (**Gottlieb et Borin, 2000**) et également améliorateurs de la qualité organoleptique des aliments (**Belyagoubi, 2011**). Notamment, ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux (**Bouchouka, 2016**). Ils dérivent de deux voies synthétiques principales: la voie shikimate et/ou acétate (**Bloor, 2001; Hennebelle *et al.*, 2004; Lugasi, 2003**).

## 2 Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques représentent une famille de molécules organiques hydrosolubles (**Rhazi, 2015**), avec plus de 8000 structures phénoliques connues (**Guenane, 2017**). Les éléments structuraux qui caractérisent les composés phénoliques sont la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs groupements hydroxyles qui peuvent être libres ou engagés ainsi que d'autres groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (**Bouchouka, 2016; Bruneton, 1999; Kebbab, 2014**) et qui ne contiennent aucun atome d'azote (**Guenane, 2017**). Ils peuvent être soit des molécules simples comme les acides phénoliques, ou bien des composés hautement polymérisés comme les tanins (**Rezaire, 2012**).

Il existe plusieurs classifications des composés phénoliques (Daas Amieur, 2009), soit selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (Bouchouka, 2016), soit à partir du degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.) (Bouhadjra, 2011), ou encore par la capacité de ces molécules de base à former des liaisons avec d'autres molécules telles que les glucides, les lipides, les protéines, etc. (Bouhadjra, 2011; Herbert, 1989). Dans notre cas, ils ont été classés selon le nombre d'atomes de carbone dans leur squelette de base.

## 2.1 Phénols simples

Les phénols simples sont des dérivés du benzène (Rhazi, 2015), renfermant une ou plusieurs unités phénoliques (Djenidi, 2012). Ce sont des molécules incolores, solubles dans les solvants basiques, très sensibles à l'oxydation et deviennent bruns ou foncés lorsqu'ils sont exposés à l'air (Rhazi, 2015; Stevanovic et Perrin, 2009). Parmi les phénols simples, on cite l'hydroquinone, le catéchol (Bouchouka, 2016) et le tyrosol (Djenidi, 2012) (Figure 20).

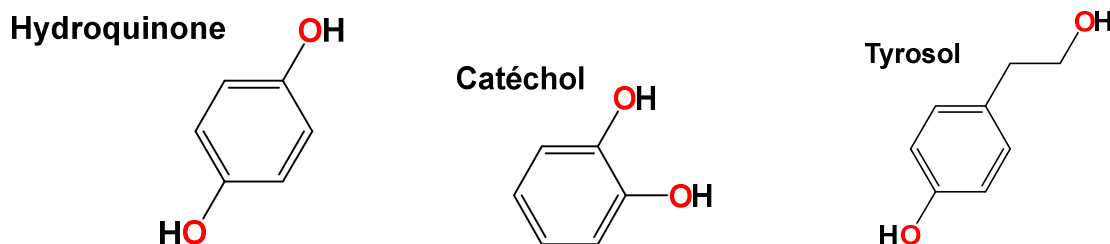


Figure 20 : Structure chimique de l'hydroquinone, catéchol et tyrosol.

## 2.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Rhazi, 2015). Ils sont les dérivés hydroxylés de deux molécules non phénoliques et qui sont l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Figure 21) (Bouhadjra, 2011; Djenidi, 2012).

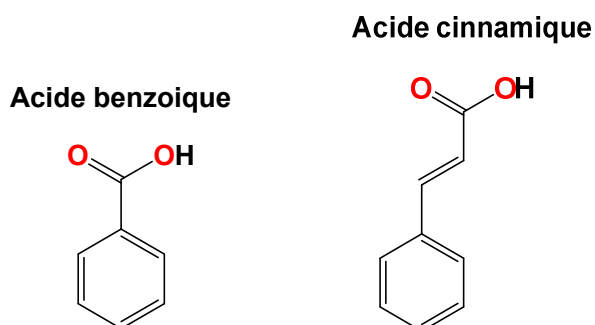
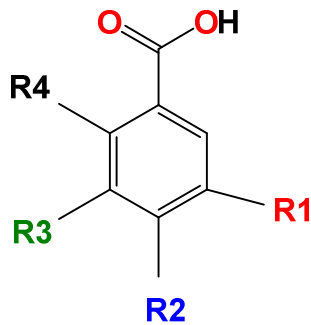


Figure 21 : Structure chimique de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.

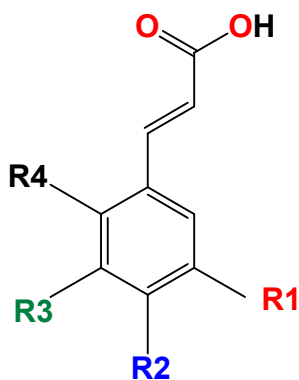
-Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque ont une structure de base en C6-C1, très communs, aussi bien à l'état libre qu'à l'état combiné par ester ou hétéroside (Belyagoubi, 2011). Parmi les acides hydroxybenzoïques, on peut trouver l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide salicylique, l'acide syringique, l'acide protocatéchique, l'acide méthoxybenzoïque, l'acide hydroxybenzoïque. La figure 22 présente quelques structures de ce type d'acide phénolique.



Nom	R1	R2	R3	R4
Acide gallique	OH	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Acide salicylique	H	H	H	O H
Acide syringique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide méthoxy-4-benzoïque	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
Acide hydroxy-4-benzoïque	H	OH	H	H

Figure 22 : Structure chimique de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.

-Les acide phénoliques dérivés de l'acide cinnamique : sont divisés en deux catégories, ceux en C6-C3 (exemples : acide  $\rho$ -coumarique, acide caféique, acide férulique, acide sinapique) sont les plus distribués et les autres sont peu fréquents (acide o-coumarique et acide o-férulique) (Belyagoubi, 2011). La figure suivante montre quelques structures de ce type d'acide phénolique.



Nom	R1	R2	R3	R4
Acide $\rho$ -coumarique	H	OH	H	H
Acide caféique	H	OH	OH	H
Acide férulique	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Acide o-coumarique	H	H	H	OH
Acide o-férulique	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH

Figure 23 : Structure chimique de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

### 2.3 Coumarines

Les coumarines qui sont les dérivés de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Bouchouka, 2016), présentent une structure composée d'un cycle benzène et d'un noyau lactone (benzo- $\alpha$ -pyrone), ce qui donne un noyau coumarine simple (Figure 24). Les coumarines sont divisées en quatre groupes en fonction des différents groupements chimiques ajoutés au noyau coumarine: les coumarines simples (benzo- $\alpha$ -pyrones); les furocoumarines (furobenzo- $\alpha$ -pyrones) ; les pyranocoumarines (benzodipyran-2-ones) et les phénylcoumarines (benzo-benzo-pyrones) (Dugrand-Judek, 2015). Dans la nature, elles sont soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres (Bouchouka, 2016). Le principal rôle physiologique des coumarines réside dans la défense de la plante contre les attaques par des pathogènes; on les qualifie aussi de phytoalexines (Beier et Oertli, 1983; Dugrand-Judek, 2015).

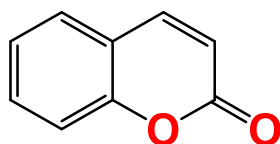


Figure 24 : Structure chimique du noyau coumarine (benzo- $\alpha$ -pyrone).

### 2.4 Xanthones

Les xanthones représentent une classe de composés phénoliques identifiée dans un groupe restreint de plantes supérieures, de champignons, de lichens (Vieira et Kijjoa, 2005) et de microorganismes. Ils ont une structure de base C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (Figure 25) (Sakagami *et al.*, 2005). D'après (Vieira et Kijjoa, 2005), les xanthones sont classées en 6 groupes: les xanthones simples, les xanthones glycosylées, les xanthones prénylées, les xanthonolignoïdes, les bis-xanthones ainsi que diverses xanthones avec des substituants autres que ceux mentionnés. Ces principaux groupes sont subdivisés en fonction du degré d'oxygénation en substances non-, mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa-oxygénées.

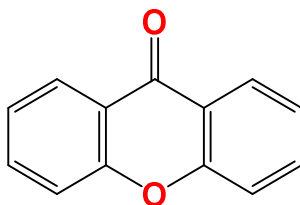
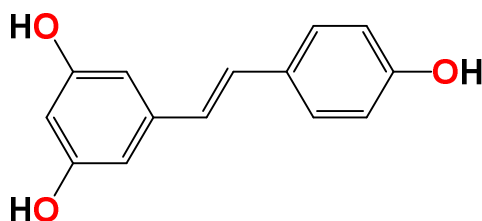


Figure 25 : Squelette de base du Xanthone.

## 2.5 Stilbènes

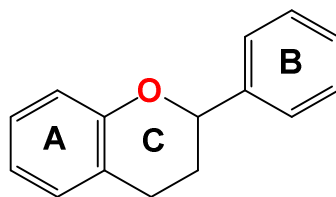
Les stilbènes possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes (**Bouchouka, 2016**). Ils contiennent au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison conjuguée (**Rhazi, 2015**). Ce sont des phytoalexines, synthétisés en réponse à un stress biotique tel les attaques par des micro-organismes pathogènes (**Bouchouka, 2016**). Parmi les stilbènes, on trouve, le resvératrol, le pinosylvine et l'hydrangénol... etc. Cependant le plus connu est le resvératrol (**Figure 26**), c'est une molécule à fort intérêt (**Rhazi, 2015**) dû aux multiples effets bénéfiques tels que l'effet cardio-protection (**Das et Maulik, 2006**), antidiabétique (**Chi et al., 2007; El Hamaoui-El Nachar, 2014; Su et al., 2006**), protecteur contre le cancer (Jang et al., 1997), antiviral, neuro-protecteur, anti-âge ou encore anti-inflammatoire (**Rhazi, 2015**).



**Figure 26** : Structure chimique du resvératrol.

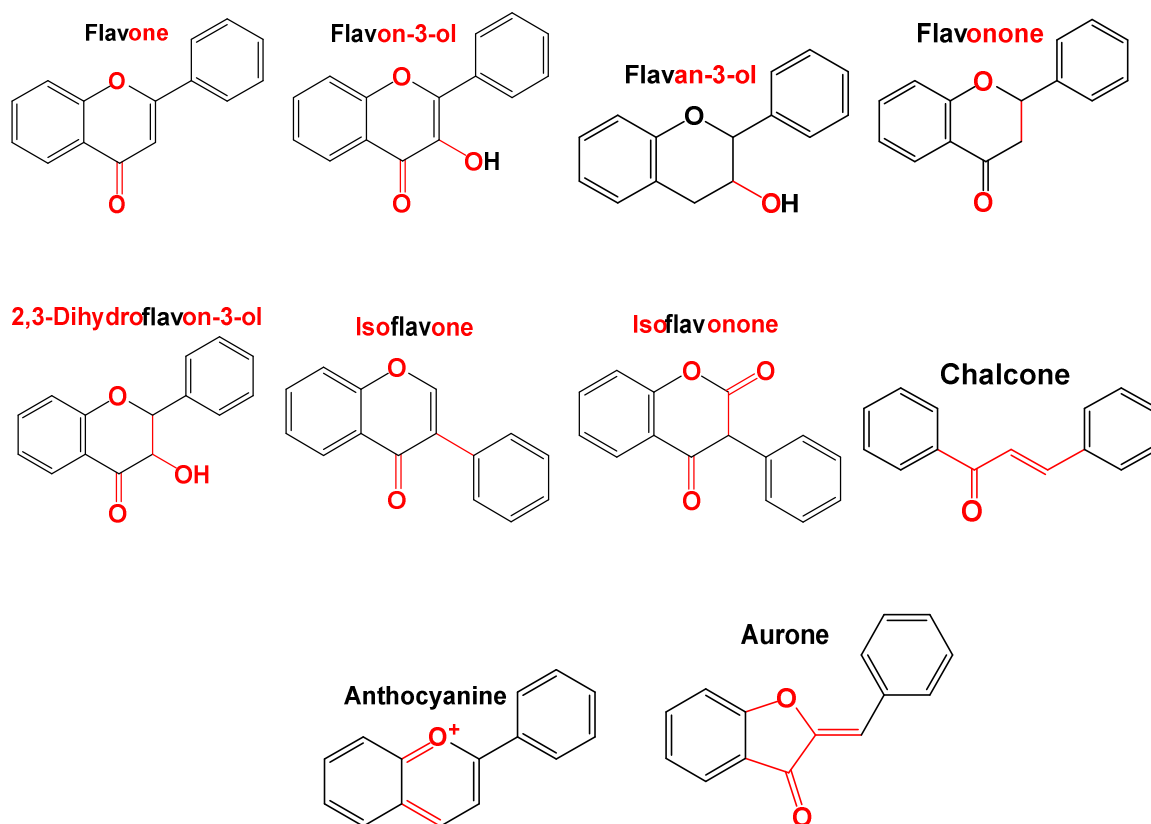
## 2.6 Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus représentatif des composés phénoliques (**Belyagoubi, 2011; Bouchouka, 2016**), comprenant plus de 6000 composés naturels identifiés à partir des plantes (**El Hamaoui-El Nachar, 2014; Kebbab, 2014**). Cependant, les flavonoïdes sont aussi présents dans le règne animal, à titre d'exemple, la présence de la chryisine, de la quercétine ou encore de la galangine dans la propolis des abeilles (**Marfak, 2003**). Ils ont tous la même structure de base appelée Flavane ou bien 2-Phenylchromane (**Figure 27**), composée de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne en trois carbones: C6-C3-C6, souvent fermée par un hétérocycle oxygéné (**Milane, 2004; Rhazi, 2015**). Ces composés existent soit sous forme libre dite aglycone ou génine (entités dépourvues de reste osidique), ou bien sous forme liée à des oses et autres substances, dite hétérosides (**Ghedira, 2005**).



**Figure 27** : Structure chimique de base des flavonoïdes (Flavane).

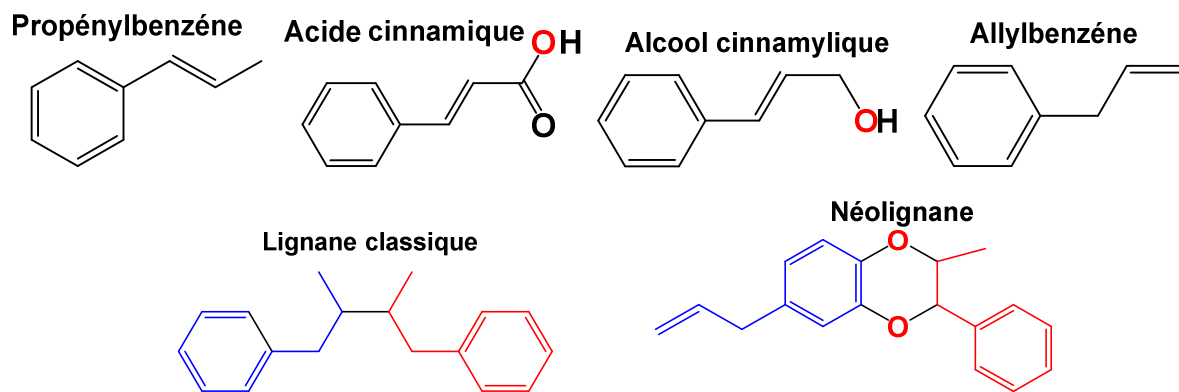
La diversité des flavonoïdes est due aux degrés d'hydroxylation, de méthylation, de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C (**Belyagoubi, 2011**). Plusieurs classes des flavonoïdes ont été identifiées dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les anthocyanes et les aurones. Ces classes sont représentées dans la **figure 28**. Les flavonoïdes sont responsables des colorations jaune, orange, rouge et violet des fleurs et des fruits ainsi que d'autres organes végétaux. Ils sont localisés en grande quantité dans certains fruits tels que les agrumes (genre *Citrus*), le raisin, les cassis, les myrtilles, les pommes, dans certains légumes comme les oignons, notamment dans le thé, le cacao et le café (**Ghedira, 2005; Rhazi, 2015**).



**Figure 28** : Structure chimique de quelques flavonoïdes.

## 2.7 Lignanes et lignines

Les lignanes sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols (**Rhazi, 2015**). Ces unités monomériques (C6 – C3) sont l'acide cinnamique, l'alcool cinnamylique, le propénylbenzène et l'allylbenzène (**Cui *et al.*, 2020**). Lorsque, les deux unités sont liées par liaison de carbone ( $\beta$ - $\beta'$ ) (**Calvo- Flores *et al.*, 2015**), les lignanes sont appelés lignanes classiques. Cependant, si la liaison se fait entre deux atomes autres que le carbone, les lignanes sont appelés néolignanes (**Cui *et al.*, 2020**). La **figure 29** montre la structure chimique des monomères, du lignane classique ainsi que le néolignane. Quant aux lignines, elles sont formées par la condensation d'unités phénylpropaniques (**Bouchouka, 2016**). Ce groupe suscite beaucoup d'intérêts grâce aux nombreuses fonctions physiologiques apportées pour les plantes mais aussi les effets pharmaceutiques, tels que l'activité antioxydante, anti-tumorale (**Rhazi, 2015**), antivirale, anticancéreuse (**Schroeder *et al.*, 2006**).



**Figure 29** : Structure chimique des monomères, du lignane classique et du néolignane.

## 2.8 Tanins

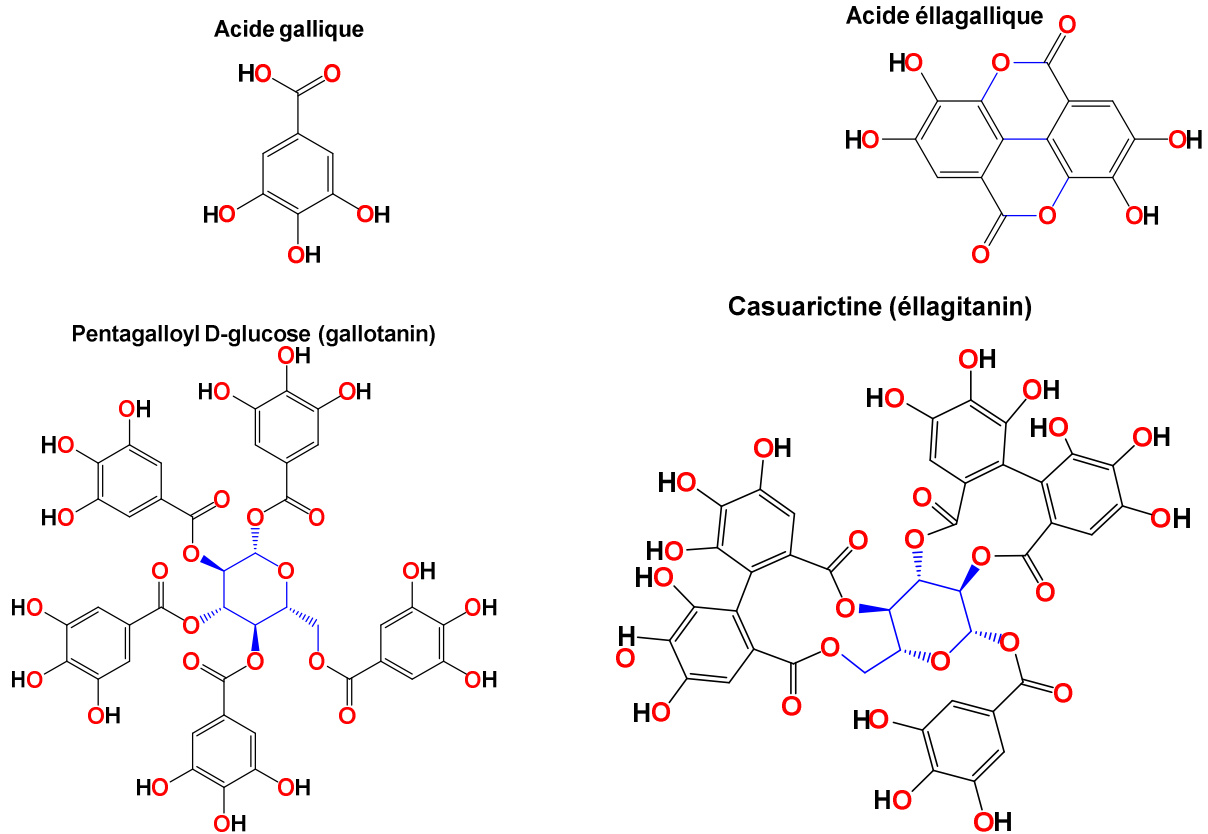
Les tanins sont des composés phénoliques polymériques, de masse molaire compris entre 500 et 3000 (**Belyagoubi, 2011**). Ils sont localisés dans les écorces, le bois, les racines, les feuilles, les fruits et les galles (**Richardin *et al.*, 1988**). Parmi les propriétés des tanins ; ils ont la capacité de se lier et de précipiter les protéines (**Hagerman et Butler, 1989**), les alcaloïdes et la gélatine (**Belyagoubi, 2011**); notamment se lier aux pigments, aux composés à gros poids moléculaire et aux ions métalliques (**Okuda et Ito, 2011**); ils sont caractérisés par une saveur astringente (**Belyagoubi, 2011**); ils ont la propriété de tanner la peau, de la rendre dure et imputrescible, en se fixant sur les protéines (**Guenane, 2017**) et ils peuvent également affecter la croissance des plantes en contrôlant les taux de rejet d'azote et l'accumulation de matière organique dans le sol (**Mona, 2008**). De plus, les tanins confèrent aux plantes une défense

contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores) (**Rira, 2019**).

Autrefois, les tanins étaient classés en deux groupes : les tanins de type pyrogallol et les tanins de type catéchol (ou catéchine), selon les groupements polyphénols de leurs molécules. Ensuite, ils ont été renommé en tanins hydrolysables et tanins condensés (**Bitou et al., 1999; Haslam, 1989; Okuda, 2005; Okuda et Ito, 2011**). Cependant, selon (**Khanbabaee et Ree, 2001**), ils sont divisés en cinq catégories, à savoir les tanins hydrolysables (ellagitannins et gallotannins), les tanins condensés, les tanins complexes et les phlorotannins.

### 2.8.1 Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables doivent leur nom par le fait qu'ils s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase) (**Quideau, 2009; Rhazi, 2015**). Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Ce dernier est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide ellagique qui est un dimère de l'acide gallique dans le cas des ellagitannins (**Belyagoubi, 2011; Bouchouka, 2016; Cowan, 1999; Daas Amiour, 2009**). Les gallotannins sont présents dans de nombreuses espèces végétales (**Schmauch, 2010**). Par contre les ellagitannins se trouvent dans le bois de chêne, châtaigner ou dans les fruits comme les fraises (**Rhazi, 2015**). Un exemple des gallotannins (pentagalloyl D-glucose) et des ellagitannins (casuaricitrine) ainsi que les acides phénoliques entrant dans la structure des tanins hydrolysables sont représentés dans la **figure 30**.



**Figure 30** : Structure chimique de l'acide gallique, de l'acide élлагallique et des deux tanins hydrosolubles.

### 2.8.2 Tanins condensés

Les tanins condensés possèdent plusieurs appellations, parmi elles, il y a : flavanes, flavolanes, polyflavanes, catéchines, leucoanthocyanidines condensés, proanthocyanidines condensées (**Figure 31**), procyanidines, polyphénols de plante ... (**Schmauch, 2010**). Ils se différencient des tanins hydrolysables car ils ne contiennent pas de sucre dans leur structure (**Bouchouka, 2016**) et sont résistants à l'hydrolyse, mais peuvent être dégradés par oxydation en acide fort pour donner des anthocyanidines (**Porter *et al.*, 1985**). Ce sont des polymères de flavonoïdes liés entre eux par des liaisons carbone-carbone (**Hagerman et Butler, 1989**). Ils sont classés selon le type de monomère qu'ils contiennent soit des flavan-3-ols (des anthocyanidines), soit des flavan-3,4-diols (des leucoanthocyanidines), dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (**Mona, 2008**) et (**Rhazi, 2015; Stevanovic et Perrin, 2009**).

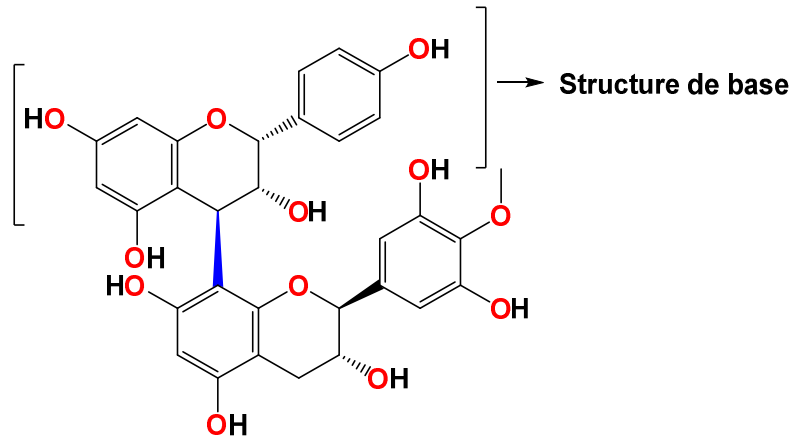


Figure 31 : Structure chimique des proanthocyanidines.

### 2.8.3 Tanins complexes

Les tanins complexes sont également appelés tanins partiellement hydrolysables (Rira, 2019). Ils sont formés entre une unité du glucose de tanin hydrolysable (gallotanins ou ellagitanins) et une unité flavanol de tanin condensé par une liaison C-glycosidique (Rira, 2019; Schmauch, 2010). L'acutissimine A (Figure 32) est le plus connu des tanins complexes (Saucier *et al.*, 2006).

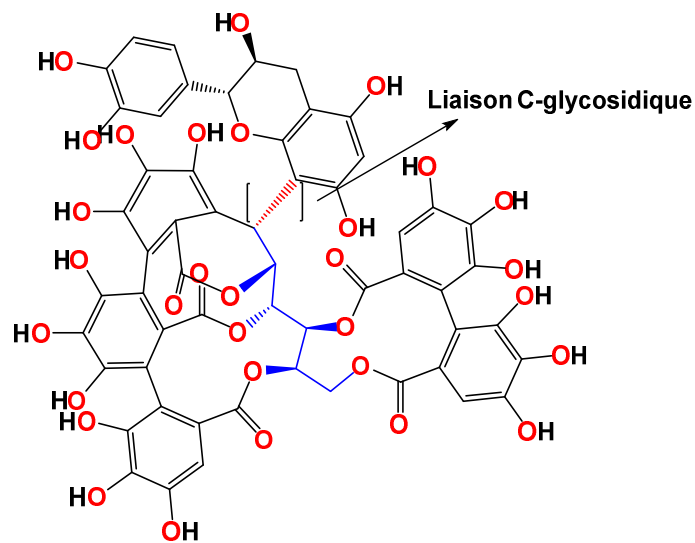
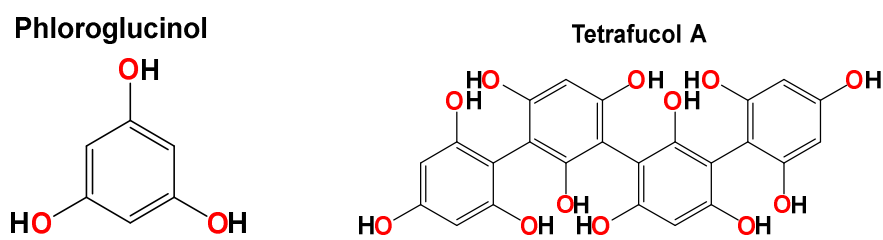


Figure 32 : Structure chimique de l'acutissimine A.

### 2.8.4 Phlorotanins

Les phlorotanins sont des oligomères ou polymères dérivés du phloroglucinol et différenciés par la base de la nature des liaisons inter-monomères. Ils sont localisés uniquement dans les algues brunes (Imbs et Zvyagintseva, 2018; Schmauch, 2010). Les phlorotanins sont très solubles dans l'eau, se lient fortement aux protéines, aux polysaccharides et à d'autres biopolymères et chélatent les métaux divalents (Imbs et Zvyagintseva, 2018). L'unité

monomérique (phloroglucinol) et un exemple de phlorotanin (Tetrafulcol A) sont représentés dans la **figure 33**.



**Figure 33** : Structure chimique du phloroglucinol et du tetrafulcol A.

*Chapitre*

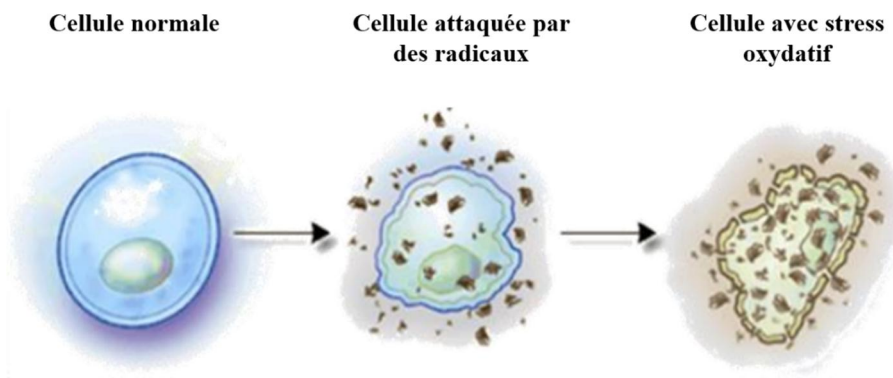
4

---

***Stress oxydatif***

## 1 Stress oxydatif et radicaux libres

Le stress oxydatif est un état physiologique (Matou *et al.*, 2016), décrivant la situation de dommage causée par les ERO (Guenane, 2017) (Figure 34). Il est défini comme étant un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et le système de défense antioxydante de l'organisme (Beaudeau et Durand, 2011; Guillouty, 2016), en faveur des espèces pro-oxydantes (Boyer, 2016). Ce déséquilibre peut provenir soit d'une production massive d'agents oxydants, soit d'un déficit du mécanisme de défense (Baraka-Vidot, 2014).



**Figure 34** : Attaque des radicaux libres sur une cellule : Etat de stress oxydant (Durand, 2018).

Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique (Durand, 2018; Guillouty, 2016). Ce sont des molécules hautement réactives (Lavoie, 2012), cherchant soit à extirper un électron à une molécule voisine afin d'apparier leur électron célibataire (Guillouty, 2016), soit à donner un ou des électrons libres sur une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique) afin de rapparier son ou ses électrons célibataires et de retrouver ainsi un état stable (Fontaine *et al.*, 2002).

Le métabolisme cellulaire produit et emploie en permanence des espèces oxydantes, c'est le cas de la respiration, où chaque cellule réduit notamment l'oxygène en eau (Inoue *et al.*, 2003). Un ensemble restreint de radicaux libres appelés « radicaux primaires » participent à de nombreuses fonctions physiologiques telles que la croissance, la transduction des signaux cellulaires, l'apoptose des cellules tumorales, le fonctionnement de certains neurones, la régulation des gènes (Guillouty, 2016), la contraction musculaire, la défense immunitaire (Cruzat *et al.*, 2014) et même la fécondation de l'ovule (Guillouty, 2016). Ils peuvent provenir de l'oxygène, comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), appartenant alors à la famille des espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou de l'azote, comme le monoxyde

d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ), de la famille des espèces réactives de l'azote (ERA) (Durand, 2018). Cependant, ils sont nocifs pour l'organisme, lorsqu'ils deviennent incontrôlables, avec comme conséquence l'apparition de lésions cellulaires souvent irréversibles, l'altération de l'ADN et des protéines, inactivation des enzymes et peroxydation des lipides membranaires, ou encore d'autres types de dommages tels que génération de composés mutagènes, formation de plaques séniles et manifestation des inflammations (Ben Ahmed *et al.*, 2020; Bouchouka, 2016).

## 2 Principaux espèces réactives

### 2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont les plus importants en raison de plusieurs implications dans les processus biologiques (Baraka-Vidot, 2014). Parmi les propriétés des ERO, leur durée de vie est extrêmement courte de l'ordre de milliseconde voire nanoseconde (Jacob, 1995), ils sont très rapides et se propagent en cascade (Figure 35) (Baraka-Vidot, 2014). Aussi, leur toxicité n'est pas forcément corrélée avec leur réactivité. En effet, certaines espèces peu réactives peuvent avoir une toxicité élevée du fait de leur demi vie qui est plus longue, ce qui leur permet de se propager et causer des dommages loin de leur site de production (Kohen et Nyska, 2002). Il existe deux groupes : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires (Bouchouka, 2016).

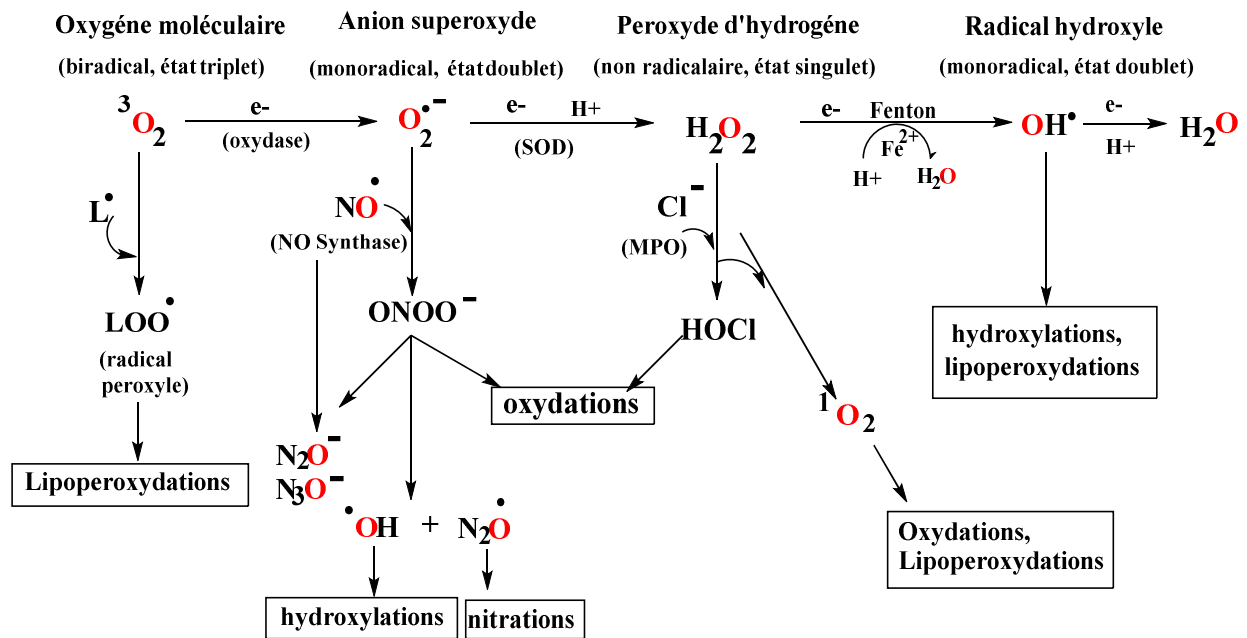


Figure 35 : Principales espèces réactives de l'oxygène (Guillouty, 2016).

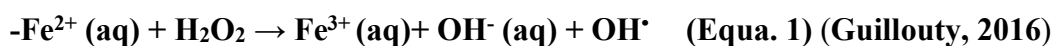
## 2.1.1 ERO radicalaires

### 2.1.1.1 Radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Le radical superoxyde est le résultat de l'apport d'un électron à la molécule  $O_2$  (Bouchouka, 2016). Cette réaction se fait dans les mitochondries lors de la respiration cellulaire (Guillouty, 2016) mais aussi il est produit par les cellules phagocytaires, les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires (Guenane, 2017). Ce radical est peu toxique (Guillouty, 2016) car il a une réactivité faible (Zerargui, 2015) et une vitesse de dismutation lente (Boyer, 2016). Cependant, il est hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu et Cabelli, 2010). L'anion superoxyde a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c ( $Fe^{3+}$ ), l'acide ascorbique et surtout le superoxyde dismutase (Bouchouka, 2016). Il possède une demi-vie longue (supérieur à quelques dizaines de secondes), ce qui lui permet de pouvoir oxyder certains constituants cellulaires et générer d'autres radicaux libres plus toxiques tel que le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) (Boyer, 2016).

### 2.1.1.2 Radical hydroxyle $OH^{\cdot}$

Le radical hydroxyle est principalement produit à partir du peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques (fer ou cuivre) par la réaction de Fenton (Equa. 1) dans la mitochondrie (Guillouty, 2016), mais aussi à partir de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène selon la réaction d'Haber-Weiss (Equa. 2) (Zerargui, 2015) ou au cours diverses réactions telles que l'oxydation des lipides (Equa. 3) (Bouhadjra, 2011) :



Il s'agit du radical le plus toxique et le plus réactif (Boyer, 2016), le deuxième oxydant le plus puissant présent dans la nature après le Fluor (Guillouty, 2016). Il peut réagir avec les protéines, en oxydant les acides aminés surtout ceux qui sont soufrés et aromatiques (Boyer, 2016), capable d'inactiver certains enzymes tels que la pyruvate déshydrogénase de la mitochondrie (Zerargui, 2015) et oxyder également l'ADN, les nucléotides et les glucides (Bouhadjra, 2011; Boyer, 2016).

### 2.1.1.3 Radical peroxyde $ROO^{\cdot}$

Le radical peroxyde est un radical secondaire (Bouchouka, 2016), formé à partir d'un radical alkyle  $R^{\cdot}$  en présence d'oxygène (Cillard et Cillard, 2006). Les radicaux  $R^{\cdot}$  sont issus de

l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques par abstraction d'atome d'hydrogène (Zerargui, 2015) (Equa.4) :



Leur réactivité est située entre le radical superoxyde et le radical hydroxyle (Bouchouka, 2016). Le mode d'action des radicaux peroxydes sur différentes molécules est, soit par arrachement d'un électron ou d'un atome d'hydrogène, soit l'addition de doubles liaisons, soit la formation d'endoperoxydes radicalaires ROOR<sup>•</sup>. Ils peuvent notamment se décomposer pour donner des radicaux superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Zerargui, 2015). Les radicaux peroxydes lipidiques peuvent être neutralisés par  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TH), en cédant un hydrogène (Equa.5) (Guillouty, 2016) :



## 2.1.2 ERO non radicalaires

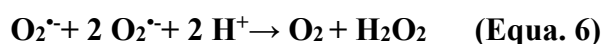
### 2.1.2.1 Oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

L'oxygène singulet est une forme excitée de l'oxygène moléculaire. Sous l'action de photon, l'O<sub>2</sub> est transformé en <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, dans lequel les deux électrons célibataires avec des spins antiparallèles se retrouvent dans la même case quantique (Guenane, 2017). Ils sont très énergétiques, de grande réactivité et instables, pouvant oxyder de nombreuses molécules (Bouhadjra, 2011; Guenane, 2017).

### 2.1.2.2 Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

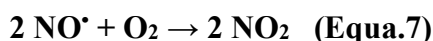
Le peroxyde d'hydrogène n'est pas une espèce radicalaire puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire (Guenane, 2017). De ce fait, il a la particularité de se déplacer facilement à travers les membranes, ce qui lui permet de propager ses effets dans différents compartiments cellulaires (Marinho *et al.*, 2014).

Le peroxyde d'hydrogène a plusieurs fonctions comme la lutte contre les pathogènes, la participation dans de nombreuses voies de signalisation (Boyer, 2016) et l'implication dans la voie de l'apoptose (Barouki, 2006). Toutefois, il est considéré comme toxique en raison de sa capacité à générer d'autres ERO (Boyer, 2016). Il est produit par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) à partir du radicale superoxyde (Equa.6) qui est métabolisé à son tour en eau par la catalase ou la glutathion peroxydase (Guillouty, 2016).



## 2.2 Espèces réactives de l'azote (ERA)

Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) est produit à partir de l'arginine et de l'oxygène par l'enzyme NO-synthase (Guillouty, 2016). Il est caractérisé par une réactivité limitée et une demi-vie qui ne dépasse pas quelques secondes (Zerargui, 2015). Le NO<sup>•</sup> joue un rôle protecteur contre le stress oxydant en limitant la lipoperoxydation, il a un effet anti-inflammatoire (Bouchouka, 2016) et a un rôle physiologique dans le tonus vasculaire (Guillouty, 2016). Néanmoins, sa production excessive a un effet délétère pour les cellules, il peut réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) (Equa.7) (Bouchouka, 2016):



De plus, le NO<sup>•</sup> interagit avec le radical superoxyde, donnant le peroxydinitrite (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Equa.8) (Zerargui, 2015) :



## 3 Effet du stress oxydatif sur l'organisme

### 3.1 Conséquences biochimiques

A forte concentration, les espèces radicalaires s'attaquent à la plupart des molécules biologiques (ADN, protéines, lipides, glucides et métaux) (Durand, 2018). Ces dernières perdent leur activité, causant un impact délétère sur le fonctionnement cellulaire physiologique (Dupic *et al.*, 2010).

#### 3.1.1 Oxydation des lipides

Les espèces radicalaires en particulier le radical hydroxyle s'attaquent soit aux lipides membranaires, soit aux lipides circulants (Boyer, 2016). La peroxydation lipidique est un mécanisme en chaîne. De ce fait, les radicaux libres vont arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons de l'acide gras pour former des radicaux alkyles (étape initiale). Ces derniers vont réagir par la suite avec l'oxygène pour former un radical peroxyde, suffisamment réactif pour arracher à son tour un atome d'hydrogène à un acide gras insaturé voisin pour former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical libre (étape de propagation). Ainsi, les radicaux peroxydes se lient les uns aux autres pour former des produits non radicalaires (Durand, 2018; Guenane, 2017; Guillouty, 2016). Par conséquent, l'oxydation des lipides circulants conduisent à la formation de LDL oxydées qui seront captées par des macrophages, entraînant ainsi le développement de l'athérosclérose et la production de cytokines pro-inflammatoire (Boyer, 2016; Saad *et al.*, 2006). Par contre, l'oxydation des lipides membranaire entraînent la perte de leur fluidité et leur perméabilité avec un

dysfonctionnement de récepteurs et transporteurs impliqués dans la transduction de signaux, menant parfois à la mort cellulaire (Bouchouka, 2016; Durand, 2018).

### 3.1.2 Oxydation des protéines

Les radicaux libres affectent différents types de protéines comme les protéines de soutien (collagène), les protéines plasmatiques et les enzymes (Bouchouka, 2016; Guillouty, 2016). Comme pour les lipides, le radical hydroxyle est le plus réactif des ERO (Zerargui, 2015), ils agissent sur tous les acides aminés, cependant les plus sensibles à l'oxydation sont les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, histidine, tyrosine et tryptophane) (Boyer, 2016). Ces attaques entraînent des altérations structurales (formation de ponts disulfures et des groupements carbonylés) et fonctionnelles (perte de l'activité enzymatiques, dysfonctionnement de la transduction d'un signal ou système de transport) (Guenane, 2017). Ces protéines non fonctionnelles sont soit dégradées par un système protéolytique comme le protéasome, soit formées en agrégats, devenant hydrophobes (Boyer, 2016; Durand, 2018).

### 3.1.3 Oxydation des glucides

Les sucres peuvent également être attaqués par les radicaux libres (Durand, 2018), agissant essentiellement sur le glucose et sur les protéoglycanes (présents en grande quantité dans les cartilages)(Mongens, 2013). Le glucose peut s'oxyder en présence de métaux et libérer par la suite du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles et des dérivés carbonylés. Ces derniers se lient avec des protéines pour donner des produits finaux de glycosylation (Durand, 2018; Mongens, 2013).

### 3.1.4 Oxydation de l'ADN

L'ADN est également une cible des ERO (Durand, 2018). La base guanine est principalement touchée par les phénomènes d'oxydation de l'ADN. Elle réagit avec le radical hydroxyle pour former le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG). Ce dernier va ensuite s'apparier avec l'adénine à la place de la cytosine, causant ainsi des mutations au sein de l'ADN. (Boyer, 2016 ; Durand, 2018). De même, les groupements aromatiques des bases d'ADN peuvent être touchés par le radical hydroxyle (Spickett, 2013). Les ERA telles que le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène peuvent susciter l'oxydation de la chromatine et le peroxyde d'hydrogène peut aussi induire à la formation de 8-nitroguanine. Eventuellement, le peroxyde d'hydrogène peut s'introduire dans le noyau et se lier aux ions métalliques tels que le  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  associés à la chromatine, produisant ainsi le radical hydroxyle (Zerargui, 2015). Les dommages oxydatifs

causés à l'ADN peuvent entraîner soit l'arrêt de la réplication de l'ADN, soit la formation de mutation carcinogènes sur les brins d'ADN provoquant la mort de la cellule (**Bouchouka, 2016**).

## 4 Antioxydants et système de défense

### 4.1 Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres molécules (**Patel et al., 2010**), considérés comme des régulateurs du taux de pro-oxydants (**Zerargui, 2015**) et des agents réducteurs (**Patel et al., 2010**). Ils mettent fin aux réactions d'oxydation qui sont souvent en chaîne, en piégeant les ERO pour former des composés stables, en éliminant les intermédiaires de radicaux libres, ou même en séquestrant les métaux de transition libres (**Patel et al., 2010; Zerargui, 2015**). Néanmoins, selon (**Valko et al., 2006**), un bon antioxydant qui offre une protection maximale doit être conforme à quelques caractéristiques : doit être capable d'atteindre spécifiquement les radicaux libres ; pouvoir chélater les métaux ; interagir avec d'autres antioxydants ; avoir un effet positif sur l'expression génique; être facilement absorbable et être efficace en milieu aqueux et/ou membranaire.

### 4.2 Systèmes de défense

L'organisme est équipé d'un ensemble de systèmes de défense très efficaces contre la formation et l'agression de ces oxydants (**Kabouche, 2010**). Il existe ainsi deux types de systèmes de défense: les défenses endogènes (primaires) et les défenses exogènes (secondaires) (**Baraka-Vidot, 2014; Bouchouka, 2016**).

#### 4.2.1 Systèmes de défense endogènes

##### 4.2.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (**Kabouche, 2010; Zerargui, 2015**). Elles constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant (**Boyer, 2016**). Chez l'homme, il existe trois isoenzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent par leur séquence protéique, leurs cofacteurs et leur localisation cellulaire (**Fridovich, 1995; Kabouche, 2010**). Ainsi, la Cu/Zn -SOD sous forme de dimère (**Guenane, 2017**), utilise le cuivre et le zinc comme cofacteur, elle est localisée dans le cytoplasme, le compartiment nucléaire et l'espace intermembranaire des mitochondries (**Guillouty, 2016**), la Mn-SOD comprend 4 sous-unités (**Guenane, 2017**), utilise le manganèse comme cofacteur, elle est présente dans les mitochondries. Lors d'un déficit de cette enzyme, il y a une surproduction de l'ion superoxyde,

inhibant ainsi les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Guillouty, 2016). La Cu/Zn- SOD sous forme d'un dimère (Guenane, 2017) extracellulaire, utilise le cuivre et le zinc tout comme le premier Cu/Zn-SOD. La distribution de ces isoformes leurs permet d'agir efficacement pour éviter l'accumulation de ces radicaux libres (Guillouty, 2016).

#### 4.2.1.2 Catalase

La catalase est une enzyme localisée dans les peroxysomes (Guillouty, 2016) mais elle est également retrouvée dans les mitochondries et le cytoplasme (comme les érythrocytes). Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Equa. 11) (Boyer, 2016):



La catalase est surtout active lorsque le niveau de ERO est élevé ou bien lorsque la quantité de l'enzyme est faible (Kabouche, 2010).

#### 4.2.1.3 Glutathion peroxydase (GPx)

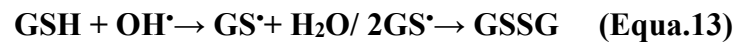
La glutathion peroxydase est une enzyme composée de quatre sous-unités contenant chacune un cofacteur qui est le sélénium lié à une molécule de sélénocystéine (Chaudiere et Tappel, 1983; Guenane, 2017). Cette dernière est essentielle pour l'activité de l'enzyme (Boyer, 2016; Ding *et al.*, 1998; Matés et Sánchez-Jiménez, 1999). Cependant, il existe des GPx sans sélénocystéine dans leur site actif mais les plus courantes sont celles qui en possèdent (Kabouche, 2010). Chez l'homme, cinq isoformes ont été identifiées à savoir GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 et GPx5 (Comhair et Erzurum, 2002). La glutathion peroxydase est présente dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries (Guillouty, 2016). Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes en particulier le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en utilisant le glutathion réduit (GSH) (Equa.12) (Zerargui, 2015).



#### 4.2.1.4 Antioxydants endogènes non enzymatiques

Ce groupe détient un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques, qui est d'être de petite taille et de ce fait de pouvoir se déplacer facilement au cœur des cellules (Zerargui, 2015). Néanmoins, il renferme un nombre limité d'antioxydants tels que : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque, le coenzyme Q et le NADPH (Kabouche, 2010; Zerargui, 2015). Parmi ces molécules, le glutathion se positionne en première position (Guenane, 2017).

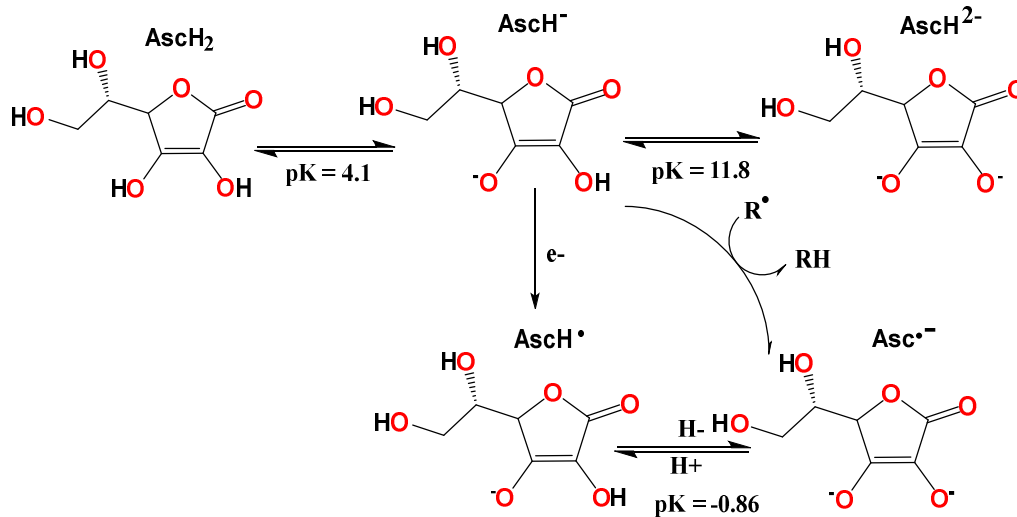
-Le glutathion (GSH) est un tripeptide (Valko *et al.*, 2006), composé de trois acides aminés (cysteine, acide glutamique et glycine) (Guenane, 2017). Avec son groupement sulfhydryle, il est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire (Zerargui, 2015), considéré comme un antioxydant soluble multifonctionnel (Valko *et al.*, 2006) et présent sous forme réduite (Zerargui, 2015). Le glutathion (GSH) est très abondant dans le cytosol, les noyaux et les mitochondries (Valko *et al.*, 2006). En effet, le GSH réagit non seulement avec les radicaux oxygénés, mais aussi avec les peroxydes ou le NO (Kabouche, 2010) pour donner un radical (GS<sup>•</sup>) conduisant ainsi à la formation d'une molécule GSSG (Equa.13) (Guenane, 2017; Haleng *et al.*, 2007):



## 4.2.2 Système de défense exogène

### 4.2.2.1 Vitamine C

L'organisme humain n'ayant pas la capacité de synthétiser les vitamines, ces derniers doivent être apportées par l'alimentation (Boyer, 2016). La vitamine C (acide ascorbique) est une molécule hydrosoluble (Bouchouka, 2016), considérée comme la plus efficace dans le plasma humain (Guenane, 2017) et connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky *et al.*, 1999). Ses principaux partenaires antioxydants sont la vitamine E et les caroténoïdes, ainsi que les enzymes antioxydantes. Elle aide notamment à régénérer la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) oxydée dans les membranes et les lipoprotéines (Carr et Frei, 1999; Kojo, 2004). La vitamine C est un diacide (AscH<sub>2</sub>), contenant deux groupes hydroxyles ionisables. Au pH physiologique, 99,9 % de la vitamine C est présente sous forme d'AscH<sup>-</sup>, seulement 0.05% sous forme d'AscH<sub>2</sub> (0,05 %) et 0.004% sous forme d'Asc<sub>2</sub><sup>-</sup> (Valko *et al.*, 2006). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH<sup>-</sup>) qui réagit avec des radicaux pour donner le radical ascorbate tricarbonyle (AscH<sup>•</sup>), stabilisé par résonance. En raison de son pK qui est faible (pK = -0.86), il ne reste pas protoné mais il est sous forme (Asc<sup>•-</sup>) (Figure 36) qui est un radical peu réactif (Bouchouka, 2016; Cuzzocrea *et al.*, 2004; Kašparová *et al.*, 2005). Toutefois, à une faible concentration, la vitamine C semblerait avoir un rôle opposé, celui d'être un pro-oxydant, participant à la formation des ERO (Boyer, 2016).



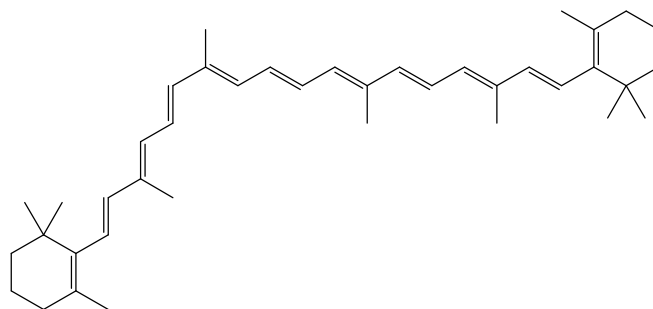
**Figure 36:** Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux (Valko *et al.*, 2006).

#### 4.2.2.2 Vitamine E

La vitamine E est une molécule antioxydante puissante grâce à son caractère lipophile (Guenane, 2017). Elle est amphiphile, capable de s'introduire dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (Bouhadjra, 2011). Dans la nature, il existe plusieurs dérivés de la vitamine E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocophérol, tocotriénol, ...). Cependant,  $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus abondante de la vitamine E, considérée comme le principal antioxydant membranaire utilisé par la cellule (Burton et Ingold, 1989). Les tocophérols jouent le rôle de protection des structures membranaires et des lipoprotéines (Bouchouka, 2016), en évitant l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) (Bouhadjra, 2011). Ainsi, ils stoppent l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO<sup>•</sup> (Kaiser *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993). L'activité anti-oxydante de tocophérol repose sur l'échange d'un électron libre. Le tocophérol se transforme ainsi en radical tocophéroxyde qui est peu réactif. Lors d'un stress oxydatif, les deux vitamines E et C agissent en synergie pour former une chaîne de détoxication des radicaux libres (Guenane, 2017; Hussain *et al.*, 2013; Pryor, 2000).

#### 4.2.2.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes (Car) sont des pigments provenant des plantes et des micro-organismes. Plus de 600 caroténoïdes ont été découverts dans la nature (Valko *et al.*, 2006). Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le  $\beta$ -carotène (Figure 37).



**Figure 37** : Structure chimique de β-carotène.

L'activité antioxydante des caroténoïdes résulte principalement de la capacité de la structure des doubles liaisons conjuguées à délocaliser les électrons non appariés (**Mortensen *et al.*, 2001**). Ils peuvent réagir avec les radicaux  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{R}^\bullet$  par simple addition électrophile et transfert d'électron selon les équations suivante (**Equa. 14 et 15**) (**Bouchouka, 2016**):



Cependant, lorsqu'il y a une concentration élevée d' $\text{O}_2$ , le radical caroténoïde ( $\text{Car}^\bullet$ ) réagit avec le dioxygène pour générer un radical peroxyde ( $\text{Car-OO}^\bullet$ ) [259] qui peut à son tour jouer le rôle d'un pro-oxydant, favorisant l'oxydation des lipides selon les réactions suivantes (**Equa. 16 et 17**) (**Valko *et al.*, 2006**):



#### 4.2.2.4 Composés phénoliques

Les composés phénoliques naturels se sont avérés être des antioxydants puissants (**Ben - Ahmed, 2016**). Ils empêchent les dommages oxydatifs, soit en piégeant les espèces radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons; soit en chélatant les métaux de transition (Fer et Cuivre) (**Bouchouka, 2016; Guillouty, 2016**); ou bien en inhibant les enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Zerargui, 2015**). A titre d'exemple, l'arrêt de l'oxydation des lipides, selon la réaction suivante (**Valko *et al.*, 2006**):  $\text{ROO}^\bullet + \text{PhOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{PhO}^\bullet$  (Equa. 18), le radical ( $\text{PhO}^\bullet$ ) ainsi formé est relativement stable.

-Les flavonoïdes sont des antioxydants efficaces de la peroxydation lipidique. En effet, leur capacité antioxydante est associée à leurs caractéristiques structurales telles que la présence d'un groupe catéchol du cycle B ; double liaison conjuguée en position (2,3) avec un groupe 4-

oxo dans le cycle C et la présence de groupes hydroxyles fonctionnels du cycle B et du cycle A (**Valko *et al.*, 2006**). Néanmoins, certains composés phénoliques tels que la quercétine et l'acide gallique qui sont facilement oxydés sous certaines conditions, peuvent se comporter comme des pro-oxydants. Tandis que, ceux qui ont une masse moléculaire élevée, tels que les tanins condensés et hydrolysables, ont peu ou pas d'activité pro-oxydante (**Dai et Mumper, 2010**).

*Chapitre*

**5**

---

***Diabète***

## 1 Diabète

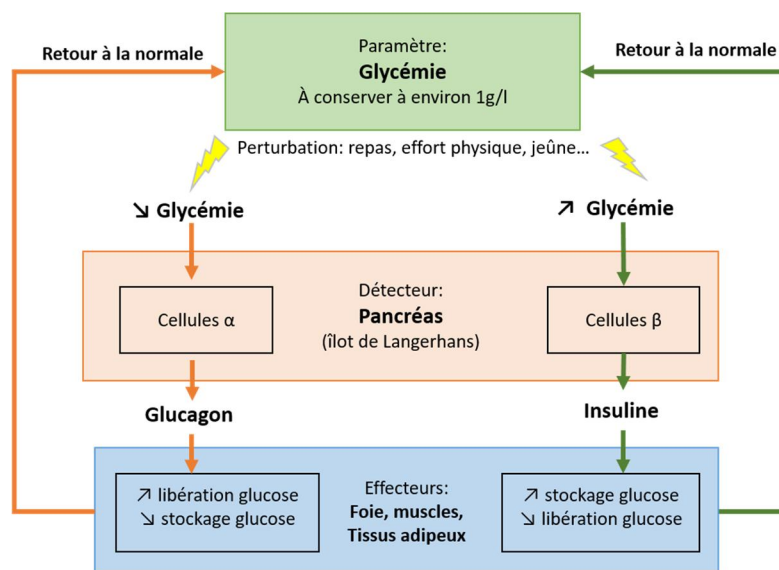
Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique qui se caractérise par une augmentation de la glycémie (hyperglycémie) avec une instabilité du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (**Rafique et al., 2020; Senthil et al., 2019**). Son appellation "diabète sucré" est due à la saveur sucrée retrouvée dans les urines (**Kebieche, 2009**). D'après la fédération internationale de diabète, il y a 382 millions de personnes diabétiques dans le monde, ce nombre pourrait augmenter jusqu'à 592 millions en 2035 (**El Hamaoui El Nachar, 2014**). Cependant, selon l'OMS (Organisation Mondiale de Santé), le nombre de diabétique pourrait atteindre jusqu'à 438 millions (**Ndomou et al., 2014**) et devenir la septième cause de décès au monde en 2030 (**El Hamaoui El Nachar, 2014**). Les conséquences d'une l'hyperglycémie se manifestent sous forme de graves complications (**Apema et al., 2012**) telles que des lésions à long terme, un dysfonctionnement des organes en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (**Huang et al., 2005**). Tous ces effets nocifs de l'hyperglycémie justifient le besoin d'une prise en charge du diabète qui est un problème mondial jusqu'à présent (**Mamun-or-Rashid et al., 2014**). En effet, malgré le nombre élevé de médicaments de synthèse disponibles pour le traitement du diabète sucré tels que l'insuline et divers agents hypoglycémisants oraux (les sulfonylurées, la metformine, les inhibiteurs des enzymes digestives glucidiques, la troglitazone, etc.) (**Mamun-or-Rashid et al., 2014**), il y a un intérêt croissant pour les remèdes à base de plantes en raison des limites (**Masunda et al., 2014**) et des effets indésirables graves qu'ils présentent (**Hashemnia et al., 2015**).

## 2 Homéostasie du glucose

Le glucose est la première source d'énergie indispensable pour l'organisme (**El Hamaoui El Nachar, 2014**), il est même considéré la seule source d'énergie pour certains organes comme le cerveau ou cellules telles que les érythrocytes. Les sources de glucose sont soit endogènes, produites par la glycogénolyse ou la néoglucogenèse à partir des substrats non glucidiques, soit exogènes apportées par l'alimentation (**Telli, 2017**). Les sucres exogènes comme l'amidon sont d'abord dégradés par l'action combinée de deux enzymes ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) (**Abbas et al., 2017**). L' $\alpha$ -amylase (EC. 3.2.1.1) qui appartient à la famille des glycosides hydrolases 13 (**Yousuf et al., 2020**) hydrolyse les liaisons  $\alpha$  1-4 glucosidiques dans l'amidon pour générer des malto-oligosaccharides courts et des dextrines  $\alpha$ -limites (**Sahnoun et al., 2017**). Le maltose est ensuite hydrolysé en molécules de glucose par l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase (EC.3.2.1.20) présente à la surface de la bordure en brosse des cellules intestinales (**Ibrahim et**

*al.*, 2017; Taha *et al.*, 2015). Le glucose ainsi absorbé au niveau intestinal sera transporté aux divers organes par deux types de transporteurs SGLT (cotransporteurs glucose sodium dépendant) et GLUT (transporteurs de glucose) (El Hamaoui El Nachar, 2014). Les SGLT responsables du transport actif sont localisés au niveau de l'intestin et les reins. Ils transportent le glucose contre son gradient de concentration (Shepherd et Kahn, 1999). Tandis que les GLUT responsables du transport facilité, sont en nombre de 14 (GLUT1-14) (El Hamaoui El Nachar, 2014), cependant le GLUT4 est le transporteur de glucose insulino-sensible, il est situé dans les muscles squelettiques et cardiaques ainsi que les tissus adipeux (Telli, 2017).

La régulation de la teneur en glucose dans le sang (la glycémie) est une fonction importante de l'organisme (Baraka-Vidot, 2014). Son maintien à un état d'équilibre est appelé homéostasie du glucose (Figure 38) (Telli, 2017). L'organisme met en jeu un système hormonal pour maintenir la glycémie autour des valeurs normales de concentration de glucose dans le sang qui sont de 1 g/l jusqu'à 1,26 g/l (Baraka-Vidot, 2014; Durand, 2018). Après un repas, il y a une augmentation de la glycémie, provoquant ainsi un stimulate de la sécrétion d'une hormone hypoglycémiant, qui est l'insuline (Ziane, 2014). Cette dernière va inhiber la production de glucose par le foie ; stimuler la capacité des tissus insulindépendants de transporter le glucose et augmenter son stockage sous forme de glycogène (El Hamaoui El Nachar, 2014). À l'inverse, lorsque la glycémie est trop faible (inférieure à 1 g/l), notamment après un jeûne ou un effort physique, le glucagon et d'autres hormones régulatrices telles que les catécholamines (adrénaline) et les glucocorticoïdes (cortisol) (Durand, 2018) augmentent la glycémie en libérant le glucose dans la circulation sanguine (Baraka-Vidot, 2014).



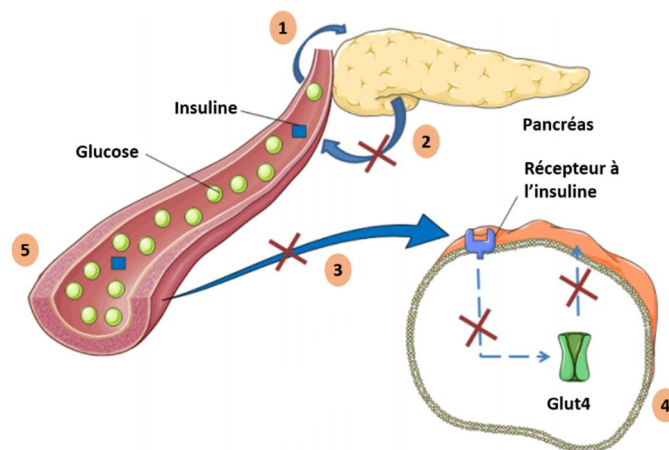
**Figure 38 :** Equilibre glycémique (homéostasie du glucose) (Durand, 2018).

### 3 Principaux types de Diabète

Le diabète est le résultat d'anomalies de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques ou d'un défaut de l'action de cette hormone, ou des deux (**Rathinavelusamy et al., 2014**). Lorsque la concentration de glucose dans le sang est supérieure à 1,26 g/l à jeun ou supérieure à 2 g/l à n'importe quel moment de la journée (**Durand, 2018**), la personne est considérée comme diabétique (**Kebieche, 2009**). Les premiers symptômes connus du diabète sont : la polyurie, la soif, la perte de poids, la fatigue, le manque de concentration et la vision floue (**El Hamaoui El Nachar, 2014**). Il existe plusieurs types de diabète différents dont les principaux sont : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel (**Boyer, 2016**).

#### 3.1 Diabète de type 1

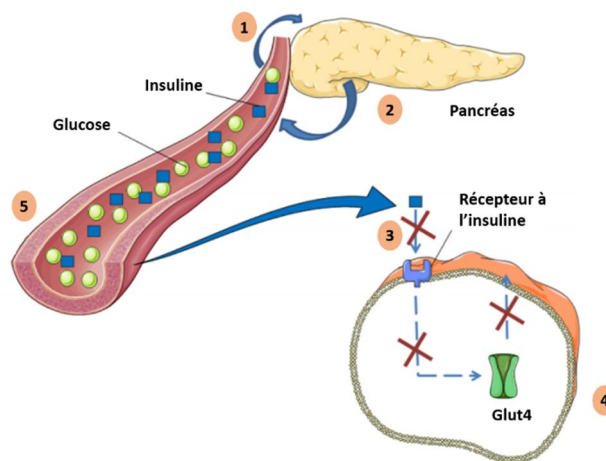
Le diabète de type 1 (**Figure 39**), anciennement connu sous le nom de diabète insulino-dépendant est aussi appelé diabète juvénile (**Mamun-or-Rashid et al., 2014**) car il touche surtout les enfants, mais peut se manifester à tout âge (**Kebieche, 2009**). Il représente 10% des patients diabétiques (**Jarald et al., 2008**), résulte d'une destruction sélective et auto-immune des cellules  $\beta$  du pancréas (**Ndomou et al., 2014**) jusqu'à 90% (**Kebieche, 2009**). En effet, le système immunitaire attaque et détruit les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, qui se caractérise par la présence d'anticorps : anti-cellules d'îlot, anti-insuline, anti-décarboxylase de l'acide glutamique et anti-tyrosine phosphatase membranaire. Cette destruction peut être rapide (enfants et adolescents) ou plus lente (adultes) (**Drouin, 2009; Telli, 2017**). Ce type de diabète est traité par une injection d'insuline quotidienne pour pouvoir réguler la glycémie (**El Hamaoui El Nachar, 2014**).



**Figure 39** : Schéma représentatif du dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1 (**Boyer, 2016**).

### 3.2 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant est aussi appelé diabète gras ou diabète de la maturité (**Baraka-Vidot, 2014**) car il se développe généralement chez les adultes de plus de 40 ans (**Baraka-Vidot, 2014; Mamun-or-Rashid et al., 2014**). C'est une forme sournoise à développement lent (**Mbodj, 2003**) ainsi que la plus abondante, représentant près de 85 à 90 % de la population diabétique (Sy et al., 2011). Le diabète de type 2 est le résultat de l'insensibilité des récepteurs cellulaires des tissus cibles comme le foie, le muscle et les tissus adipeux à l'insuline (**Baraka-Vidot, 2014**), qui peut s'orienter vers une insulino-pénie (diabète de type 1). En effet, une production massive de l'insuline dû à la persistante de l'hyperglycémie cause avec le temps l'épuisement des cellules  $\beta$  (**Figure 40**) (**Baraka-Vidot, 2014; Boyer, 2016**). Cette maladie peut être causée par plusieurs facteurs de prédisposition ou de risque comme l'obésité, la suralimentation, le mode de vie (la sédentarité), le stress, le vieillissement et même les antécédents familiaux (**Kaku, 2010; Mamun-or-Rashid et al., 2014**). Environ 70% des personnes atteintes de diabète de type 2 souffrent d'obésité (**Boyer, 2016**).



**Figure 41** : Schéma représentatif du dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2 (**Boyer, 2016**).

### 3.3 Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se manifeste chez les femmes enceintes, généralement vers le 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse (**Boyer, 2016**) et concerne environ 4% des femmes enceintes dans le monde (**El Hamaoui El Nachar, 2014**). Il est caractérisé par une diminution de la sensibilité à l'insuline provoquée par les hormones produites par le placenta telles que l'HPL (hormone lactogène placentaire) (**Boyer, 2016**). Le diabète gestationnel disparaît souvent après l'accouchement cependant les femmes et leurs bébés peuvent être exposés à un risque de développer le diabète de type 2 plus tard (**El Hamaoui El Nachar, 2014; Kim et Lee, 2005**).

## 4 Complications du diabète

Le diabète est une maladie impliquée dans plusieurs complications (El Hamaoui El Nachar, 2014) ; court un risque considérable de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques (Hamdan et Afifi, 2004). Ces complications peuvent être des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux ou périphériques entraînant un infarctus du myocarde, des amputations (Watkins, 2003), la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie (Telli, 2017). L'hyperglycémie déclenche l'activation de différentes voies qui ont des effets nocifs sur divers organes. Parmi ces voies, il y a la voie des polyols, des hexosamines, de la protéine kinase C (PKC), de la formation des produits avancés de glycation (AGE) (Figure 41) (Boyer, 2016).

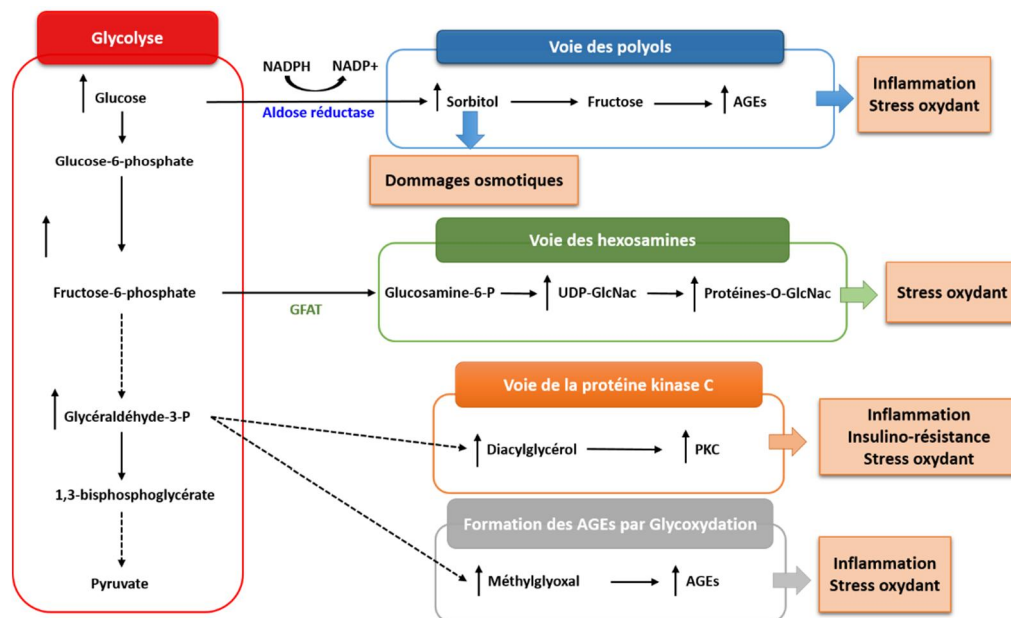


Figure 41 : L'ensemble des voies activées par l'hyperglycémie (Boyer, 2016).

### 4.1 Formation des produits avancés de glycation

Plusieurs voies telles que la voie des polyols et la glycation conduisent à la formation des produits avancés de glycation (AGE). En situation d'hyperglycémie, de nombreuses protéines comme l'hémoglobine ou l'albumine peuvent subir le phénomène de la glycation. D'ailleurs, l'hémoglobine glyquée (HbA1C) est l'une des analyses réalisées pour suivre l'état de la glycémie des patients diabétiques (Boyer, 2016).

La glycation non enzymatique est un mécanisme pathogène généré par une hyperglycémie non régulée, conduisant à l'apparition des maladies telles que l'insuffisance rénale, l'athérosclérose et le stress oxydatif (Baraka-Vidot, 2014). Il correspond à une réaction entre

un sucre réducteur comme le glucose et la fonction amine libre d'une protéine pour former une base de Schiff qui subit par la suite un réarrangement pour donner le produit d'Amadori (**Baraka-Vidot, 2014; Boyer, 2016**). Ce dernier étant instable, se dégrade via plusieurs réactions d'oxydation pour former des produits avancés de la glycation (**Durand, 2018**). Par ailleurs, les AGE peuvent se fixer sur les récepteurs de produits avancés de glycation (RAGE) localisés sur les membranaires cellulaires. Cette fixation va occasionner plusieurs mécanismes comme : la production intracellulaire des ERO comme les anions superoxydes, générant et accélérant ainsi le stress oxydatif (**Baraka-Vidot, 2014; Durand, 2018**), ou encore l'initiation des voies de signalisation conduisant à une transcription des facteurs NF-kB qui sont des facteurs pro-inflammatoires (**Boyer, 2016**).

## 5 Traitement du diabète

Les personnes diabétiques sont suivies par un traitement, un régime alimentaire adéquat et une activité physique régulière (**Telli, 2017**). Chez les patients atteints du diabète de type 1, ils sont traités par l'injection de l'insuline (**Jarald *et al.*, 2008**). Par contre, il est plus difficile de contrôler efficacement le taux de glucose chez les patients ayant le diabète de type 2, en raison de sa nature non insulino-dépendante (**Apostolidis et Lee, 2010**). Leur traitement est soit l'administration des antidiabétiques oraux (**Madjdoub, 2012**) ou par l'injection de l'insuline mais uniquement lorsque les médicaments hypoglycémiantes oraux ne réduisent pas la glycémie (**Jarald *et al.*, 2008**).

Plusieurs classes d'agents hypoglycémiantes oraux exercent leur effet différemment et comprennent :

-Les sulfonylurées et les glitinides stimulent les cellules  $\beta$  du pancréas afin de produire plus d'insuline (**Jarald *et al.*, 2008**). Cependant les patients traités par ce type de médicaments sont souvent en hypoglycémie, peuvent prendre du poids et plus rarement peuvent développer une hypersensibilité cutanée (**Krentz et Bailey, 2005**).

-**Les incrétines** sont des hormones gastro-intestinales qui stimulent aussi la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas et en même temps ils inhibent la sécrétion de glucagon (**El Hamaoui El Nachar, 2014**).

- Les thiazolidinediones améliorent la sensibilité des muscles et autres tissus vis-à-vis de l'insuline (Jarald *et al.*, 2008) et augmentent le transport de glucose dans les muscles (**Krentz et Bailey, 2005**). Cependant certains médicaments de cette classe ont été retirés du marché dû

à l'apparition de complications graves voire mortelle telles que l'hépatotoxicité fatale ou encore l'infarctus du myocarde (El Hamaoui El Nachar, 2014).

-Les **biguanides** (metformine) diminuent la gluconéogenèse par le foie (Jarald *et al.*, 2008) et stimulent le transport de glucose en augmentant la translocation des GLUT4 vers la membrane cytoplasmique (El Hamaoui El Nachar, 2014). La metformine est considérée comme le médicament de premier choix. Cependant son utilisation est contre-indiquée chez les personnes avec une insuffisance rénale sévère (Scheen et Mathieu, 2012). Egalement, elle peut provoquer des états d'acidose lactique, fatigues, nausées (Ziane, 2014).

-Les inhibiteurs des enzymes digestives **glucidiques** telles que  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase : L'hydrolyse des glucides comme l'amidon est réalisée par un groupe d'enzymes hydrolytiques, qui sont les  $\alpha$ -amylases salivaires et pancréatiques et les  $\alpha$ -glucosidases intestinales (Apostolidis et Lee, 2010). Ces enzymes jouent un rôle clé dans le contrôle de la glycémie (Sahnoun *et al.*, 2017), en retardant la digestion des glucides, conduisant ainsi à une faible glycémie postprandiale (Senthil *et al.*, 2019). Les médicaments disponibles qui agissent contre ces enzymes sont l'acarbose, le miglitol et le voglibose. Bien évidemment, ces médicaments doivent être pris avant ou au moment du repas contenant des glucides digestibles et non pas des monosaccharides car ils n'empêchent pas l'absorption de glucose (Nachar, 2014). Bien que ces médicaments sont efficaces, ils présentent néanmoins des effets secondaires principalement : les gaz, la distension abdominale et la diarrhée (Apostolidis et Lee, 2010; Dey *et al.*, 2002). Par ailleurs, ces effets indésirables peuvent être causés par l'inhibition excessive de l' $\alpha$ -amylase pancréatique entraînant ainsi une fermentation bactérienne anormale des glucides non digérés dans le côlon (Apostolidis et Lee, 2010).

- Les inhibiteurs de SGLT2, une nouvelle classe de médicaments antidiabétiques. Ils stoppent la réabsorption du glucose dans les tubules rénaux permettant ainsi leur élimination par les reins. Egalement, ils diminuent la prise du poids, la pression artérielle et le taux de cholestérol (El Hamaoui El Nachar, 2014).

- **La phytothérapie antidiabétique** : Un grand nombre de médicaments antidiabétiques sont efficaces et disponibles sur le marché pharmaceutique contre le diabète. Cependant l'échec total de trouver un traitement qui guérit totalement cette maladie et en raison des effets secondaires indésirables qui accompagnent systématiquement ces médicaments, fait qu'il y a une demande de nouveaux composés pouvant traiter le diabète (Mamun-or-Rashid *et al.*, 2014). Parmi les solutions recommandées, la phytothérapie antidiabétique qui connaît à ce jour un essor

important en raison de leur origine naturelle et de moins d'effets secondaires (**Mamun-or-Rashid et al., 2014; Mbodj, 2003**). Dans ce contexte, de nombreux chercheurs se concentrent dans la découverte de nouveaux inhibiteurs puissants (**Nia et al., 2020; Yousuf et al., 2020**) qui constituent un vrai challenge pour les systèmes médicaux (**Telli, 2017**). Les actions biologiques des plantes utilisées comme médicaments alternatifs pour traiter le diabète sont liées à leur composition chimique (**Nair et al., 2013**). En effet, les plantes riches en substances naturelles bioactives très diversifiées, telles que les composés phénoliques (acides phénoliques, anthocyanes, flavonoïdes, lignanes et tanins), les alcaloïdes, les terpénoïdes, les coumarines et autres constituants ont montré des résultats intéressants dans la réduction de la glycémie (**Mamun-or-Rashid et al., 2014; Masunda et al., 2014**). Plusieurs espèces de plantes médicinales ayant une activité antidiabétique potentielle sont traditionnellement utilisés depuis longtemps dans de nombreux pays (**Nair et al., 2013**). En médecine traditionnelle africaine, plusieurs familles de plantes utilisées couramment ont fait l'objet d'une recherche sur leurs effets antidiabétiques, presque 185 espèces appartenant à 75 familles ont prouvé leur efficacité, 51% de ces espèces proviennent de l'Afrique de l'Ouest et 21,91% de l'Afrique du Nord (**Mohammed et al., 2015**). A titre d'exemple, la famille des *Curcubitaceae* avec *Momordica charanti*, ou encore celle des *Liliacées* avec *Allium cepa* (**Mbodj, 2003**). Dans les pays Maghrébins comme l'Algérie, (**Allali et al., 2008**) ont mentionné 58 espèces utilisées pour réduire le taux de glucose sanguin telles que *Trigonella foenum graecum* (Leguminosae), *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae), *Saccocalyx satureioides* (Labiatae), *Berberis vulgaris* (Berberidaceae), *Aloe vera* (Liliaceae) et *Globularia alypum* (Globulariaceae). Notamment, (**Azzi et al., 2012**) ont recensé 60 espèces antidiabétiques appartenant à 32 familles comme : *Trigonella foenum-graecum*, *Rosmarinus officinalis*, *Citrullus colocynthis*, *Tetraclinis articulata*, *Artemesia herba-alba*, *origanum compactum* et *Punica granatum*. De même, *Pistacia atlantica* a été utilisé traditionnellement pour contrôler la glycémie et cette pratique a été authentifiée scientifiquement (**Ben Ahmed et al., 2021**). En effet, l'activité hypoglycémique des différentes parties de *Pistacia atlantica* a été démontrée par plusieurs auteurs (**Behmanesh et al., 2020; Ben Ahmed et al., 2021; Ben -Ahmed et al., 2018; Hamdan et Afifi, 2004; Hashemnia et al., 2015; Hosseini et al., 2020; Kasabri et al., 2011**).

*Chapitre*

---

**6**

***Maladie d'Alzheimer***

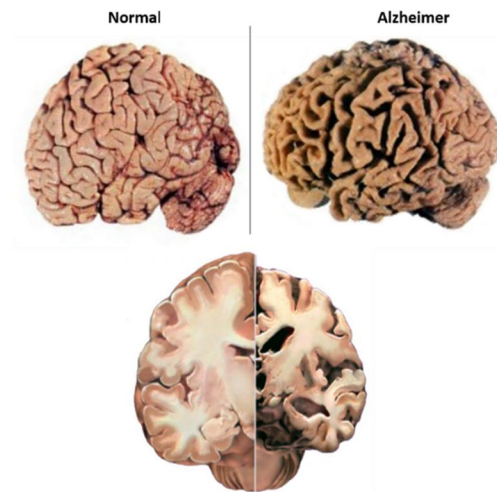
## 1 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative multifactorielle et mortelle (Ismaili *et al.*, 2016) qui commence généralement lentement et s'aggrave avec le temps (Öztaşkın *et al.*, 2015). La MA a été signalée pour la première fois par le psychiatre Alois Alzheimer en 1906 comme étant une maladie rare (Roldán-Peña *et al.*, 2019). Ce trouble neuropsychiatrique qui était rare est devenu de nos jours la principale forme de démence sénile; environ 70% des cas peuvent être attribués à la maladie d'Alzheimer (Holtzman *et al.*, 2011), touchant jusqu'à 5% des personnes de plus de 65 ans, passant à 20% de celles de plus de 80 ans (Nogara *et al.*, 2015). En 2016, Alzheimer's Disease International, la fédération mondiale des associations Alzheimer, a estimé que 47 millions de cas ont déjà été atteints par ce type de démence et a prévu que 131 millions de personnes seraient touchées en 2050 (Oukoloff *et al.*, 2019). Elle est cliniquement associée par une perte de mémoire, des difficultés à se souvenir des conversations récentes, des noms ou des événements, l'apathie, la dépression et des troubles cognitifs (Atanasova *et al.*, 2015; Oukoloff *et al.*, 2019).

## 2 Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

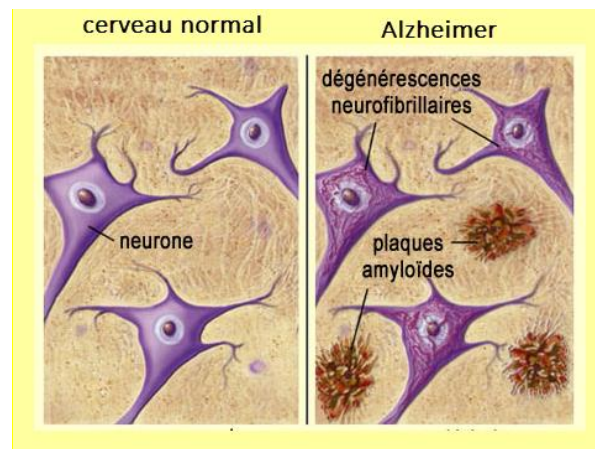
Le cerveau est un immense réseau de communication constitué de multiples ramifications et composé de 100 milliards de cellules nerveuses (neurones). Les signaux qui circulent à travers ces neurones sous forme de charges électriques forment la base des souvenirs, pensées, émotions et sensations et les zones de contact entre deux cellules appelées synapses passent les neurotransmetteurs permettant ainsi la transmission d'informations entre les cellules (Degandt, 2019).

Dans la maladie d'Alzheimer, les cellules nerveuses et les synapses sont détruites progressivement et irréversiblement dans certaines régions du cerveau. Cette perte conduit à une atrophie cérébrale (Figure 42) et l'augmentation du stress oxydatif à l'intérieur du cerveau (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).



**Figure 42:** Photographies d'un cerveau sain (à gauche en haut) et d'un cerveau atteint de la MA (à droite) et d'une coupe coronale des deux cerveaux (Carret-Rebillat, 2014).

Par ailleurs, l'observation d'un cerveau atteint d'Alzheimer au microscope révèle la présence de dépôts d'agrégation extracellulaire de plaques séniles (protéine  $\beta$ -amyloïde) ; des dégénérescences neurofibrillaires induites par la phosphorylation anormale des protéines tau intracellulaires (Figure 43) (Carret-Rebillat, 2014).

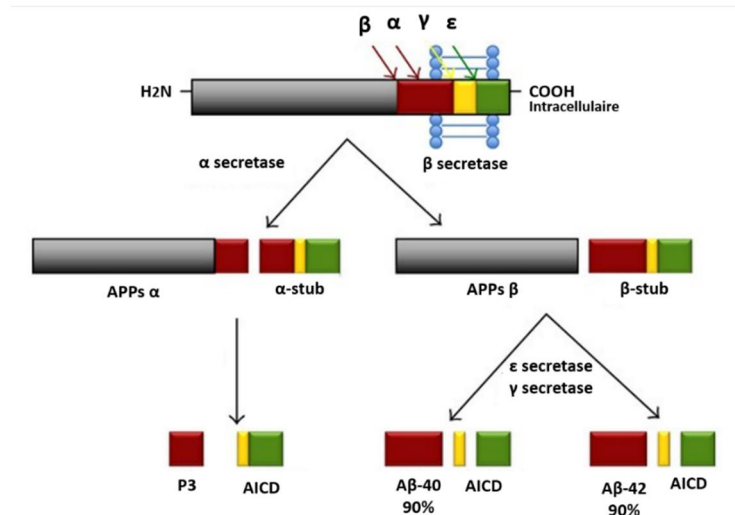


**Figure 43:** Formation de plaques séniles (amyloïdes) et de dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer (Viaules, 2016).

## 2.1 Protéine $\beta$ amyloïde

Le peptide  $\beta$  amyloïde qui est le constituant principal des plaques séniles, provient du clivage enzymatique d'une protéine transmembranaire précurseur de l'amyloïde APP (Amyloid Precursor Protein) (Carret-Rebillat, 2014). Lorsque le clivage de la protéine APP se fait par les enzymes sécrétase  $\alpha$  et  $\gamma$ , il y a la formation de deux peptides AICD (App Intracellular Domain) et P3 qui sont solubles (voie non-amyloïdogénique) (Degandt, 2019; Viaules, 2016). Ce dernier est inoffensif car rapidement dégradé (Carret-Rebillat, 2014). Par

contre, si le clivage de la protéine APP est produit par les enzymes sécrétase  $\beta$  et  $\gamma$ , cela entrainera la formation d'un peptide AICD et de deux peptides amyloïdes  $\beta$ ,  $A\beta$  de 40 acides aminés ( $A\beta$  40) qui est une forme soluble et  $A\beta$  de 42 acides aminés ( $A\beta$  42) qui est une forme insoluble, conduisant à la formation des plaques séniles (voie amyloïdogénique) (**Figure 44**) (**Degandt, 2019**).



**Figure 44:** Le clivage de l'APP par l'enzymes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  sécrétase générant les peptides P3, AICD et  $A\beta$  (40 et 42) (**Mokhtar *et al.*, 2013**).

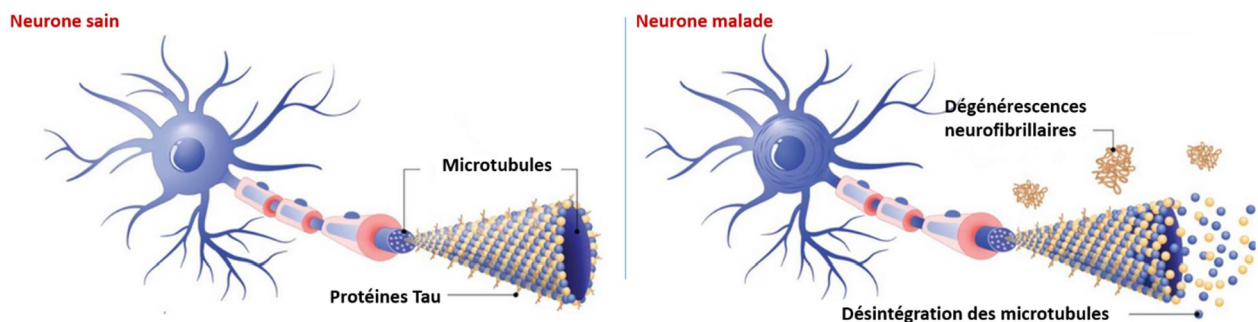
La formation des  $A\beta$  (40 et 42) conduit à un dysfonctionnement synaptique, une perturbation de l'homéostasie du calcium et une phosphorylation de Tau (**LaFerla *et al.*, 2007**). En effet, Ces plaques amyloïdes causent la perte de la fonction de l'APP avec pour conséquence une altération de la membrane cellulaire et une entrée importante de calcium, provoquant ainsi une réaction inflammatoire, puis la mort neuronale (**Degandt, 2019**). De plus, ils sont capables d'inhiber l'enzyme glutamine synthétase responsable de la génération de la glutamine à partir du glutamate. Une accumulation de ce dernier suscite une surstimulation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) qui sont toxiques, favorisant la formation de radicaux libres à l'intérieur du neurone et entrainant une surexpression d'APP, ce qui fait une augmentation de la synthèse de peptide  $A\beta$  (**Viaules, 2016**).

## 2.2 Dégénérescences neurofibrillaires

La protéine tau (Tubulin-Associated Unit) est une protéine neuronale liée aux microtubules qui sont des filaments du cytosquelette, permettent de transporter les matériaux synthétisés du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses (**Carret-Rebillat, 2014**). Ces protéines stabilisent les microtubules dans les neurones, contrôlent le transport axonal (**Benamar, 2016**)

et servent à la communication des neurones entre eux (Viaules, 2016). La stabilisation et la fonctionnalité de la protéine tau sont assurées par la phosphorylation de certains acides aminés tels que la sérine et la thréonine qui la composent (Degandt, 2019). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, une hyperphosphorylation anormale de cette protéine est observée, provoquant ainsi une baisse de son affinité pour les microtubules (Iqbal *et al.*, 1986).

La protéine tau se polymérise en se reliant en elle-même (Viaules, 2016), formant alors des paires filaments appariés en hélice (PHF) autour du noyau et dans les prolongements cellulaires (Degandt, 2019), ensuite forment des structures neurofibrillaires (Benamar, 2016) appelés dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Viaules, 2016) comme le montre la figure 45. C'est donc ceci qui va troubler l'organisation du bon fonctionnement du neurone (Degandt, 2019) et un dysfonctionnement synaptique et neuronal conduisant à sa mort (Viaules, 2016). Cependant, les DNF ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer, c'est leur association aux peptides amyloïdes  $\beta$  et leur distribution dans le cerveau qui indiquent la présence de cette maladie (Delacourte, 2006).



**Figure 45 :** Représentation de la protéine tau à l'intérieur d'un neurone sain et malade<sup>1</sup>

### 2.3 Stress oxydatif

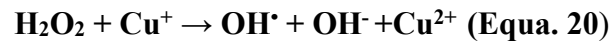
Le stress oxydatif joue un rôle important dans la maladie d'Alzheimer (Degandt, 2019). Effectivement, les neurones en voie de dégénérescence présentent des taux élevés d'oxydation des protéines, des lipides membranaires et de l'ADN (Tetu, 2005) mais aussi une perturbation de l'homéostasie aux ions métalliques (Fe, Cu et Zn), pouvant atteindre jusqu'à trois fois leurs concentrations normales (Kozłowski *et al.*, 2012). La protéine  $\beta$  amyloïde en se liant au cuivre, stimule la production d'espèces oxygénées réactives comme  $\text{OH}^\bullet$  au niveau intracellulaire, contribuant par la suite aux dommages oxydatifs des molécules (Degandt, 2019).

<sup>1</sup><https://www.neuromedia.ca/degenerescences-neurofibrillaires/>

Notamment, le précurseur de la protéine  $\beta$  amyloïde (APP) a la capacité de se lier et de réduire le cuivre (Equa. 19) (Tetu, 2005):



Après la formation du complexe APP-Cu<sup>+</sup>, le peroxyde d'hydrogène arrache un électron au cuivre pour former le OH<sup>•</sup> (Equa. 20) :



Le radical OH<sup>•</sup> une fois généré peut oxyder tous les acides aminés des protéines en particulier la proline, l'arginine et la lysine. Ces protéines oxydées sont ensuite détruites par les protéases qui sont activées par le calcium intracellulaire (Tetu, 2005).

## 2.4 Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs

### 2.4.1 Voie cholinergique

L'acétylcholine (ACh) est un neuromédiateur très abondant dans le système nerveux central (SNC) (Viaules, 2016) et le système nerveux périphérique (SNP) (Degandt, 2019) (Figure 46). C'est un ester formé à partir de la molécule choline et d'un groupement acétyl provenant de l'acétyl-coenzyme A (issu du métabolisme du glucose) via l'enzyme choline acétyltransférase (Viaules, 2016). C'est le seul neurotransmetteur qui n'est pas synthétisé à partir d'un acide aminé (Degandt, 2019). Une fois synthétisée, l'ACh est stockée dans des vésicules situées au niveau des terminaisons présynaptiques (Viaules, 2016).

En plus d'être un neurotransmetteur, l'acétylcholine remplit d'autres fonctions comme la stimulation de la contraction musculaire; la contribution dans la mémoire et la cognition et la modulation des zones responsables de la motivation, l'excitation et l'attention (Degandt, 2019).

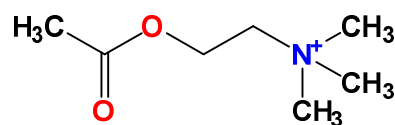
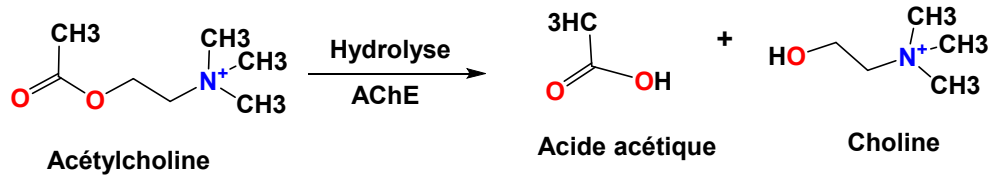


Figure 46 : Structure chimique de la molécule l'acétylcholine.

Lorsque l'ACh transmet l'influx nerveux au neurone post-synaptique, elle se sépare du récepteur et se dégrade en choline et acide acétique par l'action de l'acétylcholinestérase (AChE) qui se trouve dans la fente synaptique (Figure 47). Ces deux molécules obtenues sont recyclées dans le bouton synaptique pour reformer l'ACh (Viaules, 2016).



**Figure 47:** Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase en acide acétique et choline (Tetu, 2005).

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une détérioration de la voie cholinergique a été observée (Degandt, 2019). En effet, la formation des peptides amyloïdes  $\beta$  et des protéines tau hyperphosphorylées perturbent la transmission cholinergique, en diminuant la libération et la synthèse de l'ACh. Ce dysfonctionnement de la voie cholinergique provoque des troubles cognitifs (Viaules, 2016). Il a été constaté que les concentrations cérébrales en ACh se réduisent progressivement au fur et à mesure que la MA évolue (Viaules, 2016), principalement dans les deux régions qui sont le néocortex et l'hippocampe (Benamar, 2016) mais aussi dans les principales régions de synthèse de l'ACh qui sont les régions profondes du cerveau antérieur (le proencéphale basal contenant des grosses cellules cholinergiques appelées noyau basal cholinergique ou bien noyau basal de Meynert) (Viaules, 2016).

### 3 Traitements de la MA

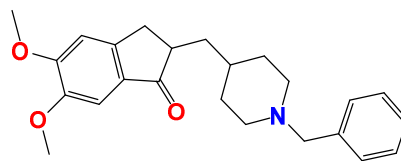
A l'heure actuelle, il n'y a aucun traitement curatif de la MA, ceux qui sont proposés et retrouvés sur le marché pharmaceutique permettent uniquement de ralentir les symptômes de la maladie (Benamar, 2016).

#### 3.1 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholine (ACh), le butyrylcholine (Bch) et le succinylcholine sont tous hydrolysés par les cholinestérases, donnant un acide carboxylique et une choline (Benamar, 2016). L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme prédominante dans le SNC (Viaules, 2016) mais elle est également localisée dans les jonctions et les membranes neuromusculaires (Benamar, 2016). Tandis que la butyrylcholinestérase (BChE) est retrouvée principalement à l'extérieur du SNC (Viaules, 2016) au niveau plasmatique, dans les différents tissus comme le foie, l'intestin, les poumons, le cœur et les muscles (Benamar, 2016). Cependant, sa concentration est fortement augmentée dans le cerveau des patients souffrant de la MA (Parsons *et al.*, 2013). Ces deux enzymes montrent une grande similarité vis-à-vis de la composition, de la structure tridimensionnelle et du site catalytique (Benamar, 2016). L'une des principales thérapies symptomatiques de la MA consiste à inhiber de façon réversible ou

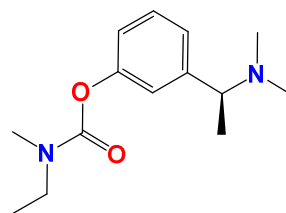
lentement réversible l'enzyme AChE, favorisant ainsi l'action de l'ACh dans la fente synaptique (Farlow et Cummings, 2007). Parmi les inhibiteurs des cholinestérases :

-**Donépézil (Figure 48)**: est un inhibiteur spécifique à l'AChE, ayant une meilleure affinité par rapport aux autres inhibiteurs et réversible (Viaules, 2016). Par ailleurs, le donépézil stimule les récepteurs cholinergiques nicotiques qui sont situés à la surface des neurones dont le but de favoriser la transmission cholinergique (Angelantonio *et al.*, 2004).



**Figure 48** : Structure chimique de la molécule donépézil.

-**Rivastigmine (Figure 49)** : est un inhibiteur pseudo-irréversible (lentement réversible) de l'AChE. Il ajoute un groupement carbamate à l'enzyme, formant ainsi un complexe lentement hydrolysable. Cet inhibiteur a également une affinité avec l'enzyme BChE (Viaules, 2016).



**Figure 49** : Structure chimique de la molécule rivastigmine.

-**Galantamine (Figure 50)** : est un alcaloïde tertiaire isolé à partir de plantes de la famille *Amaryllidaceae* comme la jonquille (*Narcissus jonquilla*), le perce-neige (*Galanthus nivalis L.*) (Viaules, 2016), ou encore flocon de neige de printemps (*Leucojum vernal L.*) (Benamar, 2016). Elle est également spécifique et réversible à l'AChE, donc n'a pas d'action sur la BChE (Viaules, 2016). De plus, elle permet de potentialiser l'action de l'ACh en se fixant aux récepteurs nicotinique (Viaules, 2016) et d'améliorer les performances cognitives chez les patients souffrant de la MA (Benamar, 2016; Caramelli *et al.*, 2004; Grossberg *et al.*, 2006; Takada-Takatori *et al.*, 2006).

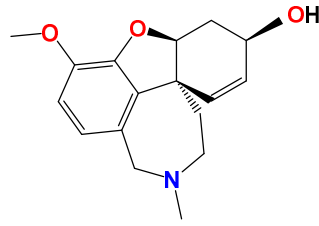


Figure 50 : Structure chimique de la molécule galantamine.

-**Physostigmine (Figure 51)** : est un alcaloïde extrait de la fève de Calabar (*Physostigma venenosum Balf*). Elle est considérée comme une excellente inhibitrice de l'AChE, cependant présente une mauvaise absorption intestinale chez les humains (Benamar, 2016).

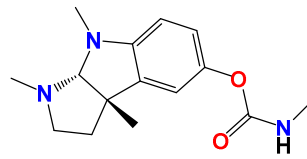


Figure 51 : Structure chimique de la molécule physostigmine.

-**Huperzine A (Figure 52)** : est un alcaloïde isolé d'une plante chinoise (*Huperzia serrata Thunb*). Il inhibe réversiblement et sélectivement l'AChE (Bai *et al.*, 2000).

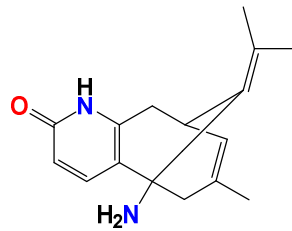
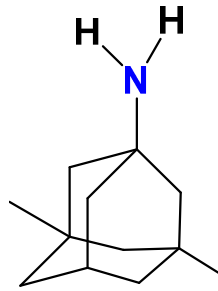


Figure 52 : Structure chimique de la molécule huperzine A.

### 3.2 Antagoniste du glutamate

Une nouvelle approche thérapeutique a été mis en place comme antagoniste du glutamate (Viaules, 2016). En effet, dans les conditions pathologiques de la MA, l'hyperactivation des récepteurs NMDA dû à la forte teneur en glutamate conduit à une augmentation anormale du calcium dans la cellule, entraînant par la suite la formation des radicaux libres et favorisant même le processus de l'apoptose (Benamar, 2016). C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de bloquer les récepteurs NMDA par l'action des antagonistes. La mémantine (Figure 53) est un antagoniste non compétitif des récepteurs glutamatergiques (Viaules, 2016). Elle se fixe au récepteur NMDA, ce qui va entraîner le blocage de l'action du neuromédiateur (le glutamate)

et donc empêcher l'entrée du calcium. De surcroît, lorsqu'il est en association avec le donépézil, il permet l'amélioration des fonctions cognitives (**Benamar, 2016**).



**Figure 53** : Structure chimique de la molécule mémantine.

***Partie II :***  
***Partie expérimentale***

---

## Chapitre

---

# 1

***Etudes in vitro (Dosage, Identification des molécules, Evaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice sur  $\alpha$ -amylase et Acétylcholinestérase)***

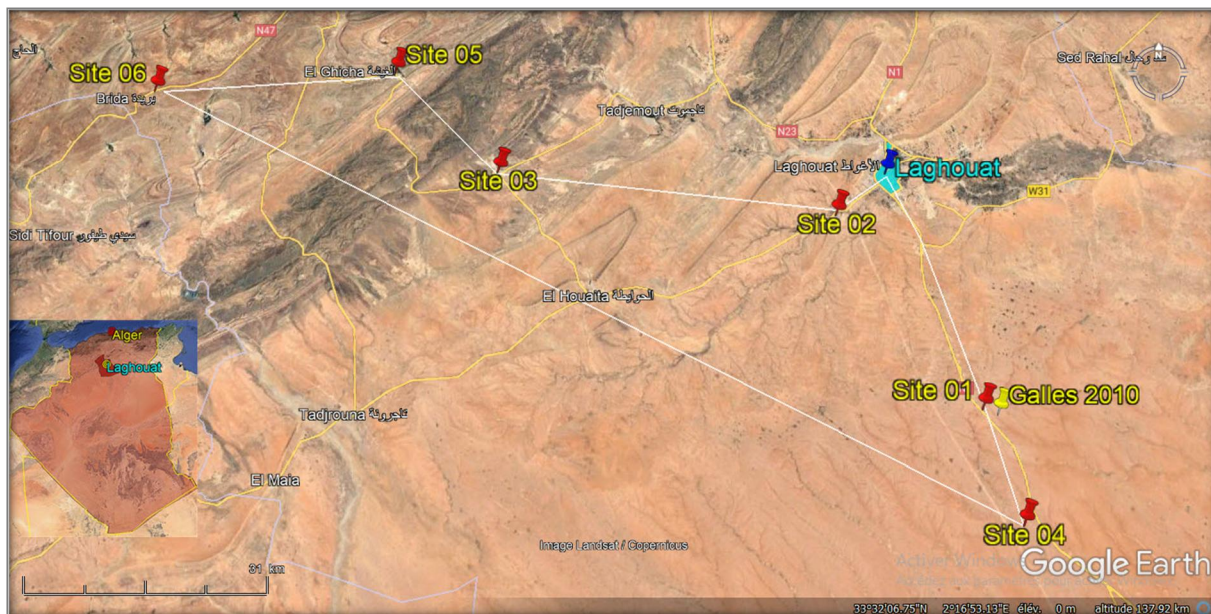
Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de Recherche des Sciences Fondamentales à l'Université Amar Telidji de Laghouat. A l'exception de l'étude de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase qui a été effectuée au laboratoire de la polyclinique de Djelfa. Ce chapitre est consacré à l'ensembles des études expérimentales *in vitro* tels que les dosages quantitatifs, les analyses qualitatives et les activités biologiques, à savoir les activités antioxydantes et enzymatiques des extraits hexaniques (lipides) et méthanoliques des galles de *Pistacia atlantica*.

## 1 Matériel et Méthodes

### 1.1 Matériel végétal

Les galles des arbres de *Pistacia atlantica* utilisées dans la présente étude ont été récoltées dans la wilaya de Laghouat, au cours de deux périodes : la première période de juillet à novembre 2010, localisé à 40 Km au sud de ville de Laghouat et la deuxième de juillet à septembre 2016 dans différentes localités, à savoir '40Km au sud de Laghouat sur la RN1' (site 1), 'Kheneg' (site 2), ' Ain Madhi ' (site 3), 'Bordj Nili' (site 4), ' El Ghicha' (site 5) et 'Bahria' (site 6) (**Figure 54**).

Le choix des deux années de récoltes se justifie par : les galles de 2010 ont fait l'objet de notre précédente étude de magistère, donc c'est une continuité. Par contre pour celles de 2016, la collecte des deux formes de galles (sphériques et semi-circulaires) nous a incité à faire une comparaison de la composition et des éventuelles activités biologiques étudiées entre les deux formes. De plus, le mois de collecte entre juillet et novembre a été choisi par rapport à la période de la production des galles.



**Figure 54** : Emplacement géographique des sites de récolte des galles de *Pistacia atlantica* de la région de Laghouat (Google Earth Pro, 2021)

Les 10 échantillons de 2010 ainsi que les 14 échantillons de 2016 ont été étalés sur papier, laissés à température ambiante dans une pièce aérée à l'abri de la lumière. Une fois séchés, les galles ont été concassées, nettoyées à sec pour éliminer les insectes et les œufs, broyées, tamisées et conservées dans des sacs en papier jusqu'à leurs utilisations. Les échantillons de 2010 (**Figure 55**) ont été divisés en deux groupes : galle male ( $n = 5$ ) et galle femelle ( $n = 5$ ). Tandis que, les échantillons de 2016 ont été divisés en deux groupes selon la forme (sphérique et semi-circulaire) (**Figure 56**).



**Figure 55** : Galles de *Pistacia atlantica* récoltées en 2010.



**Figure 56** : Forme sphérique (a) et semi-circulaire (b) des galles de *Pistacia atlantica* récoltées en 2016 (photos prises par Hefied fatiha).

Un code a été attribué pour chaque échantillon de 2010 indiquant respectivement le genre de la galle et le mois de récolte (**Tableau 03**). Ainsi, par exemple, le code GM 07 indique la galle mâle, récoltée en juillet. Pour ceux de 2016, le code indique respectivement la forme de la galle, le mois de récolte et le site (**Tableau 04**). Ainsi, par exemple, le code **GS.8.1** indique une galle sphérique, récoltée le mois d'aout du site 1.

**Tableau 03** : Les caractéristiques des échantillons de galles de *P. atlantica* récoltés en 2010.

Ech.	Forme des galles	Mois de récolte	Sites de récolte	Latitude	Longitude	Altitude
<b>GM.07</b>	Sphérique	Juillet	Site 1	33.76 °N	2.93°E	765 m
<b>GM.08</b>	//	Août	//	//	//	//
<b>GM.09</b>	//	Septembre	//	//	//	//
<b>GM.10</b>	//	Octobre	//	//	//	//
<b>GM.11</b>	//	Novembre	//	//	//	//
<b>GF.07</b>	//	Juillet	//	//	//	//
<b>GF.08</b>	//	Août	//	//	//	//
<b>GF.09</b>	//	Septembre	//	//	//	//
<b>GF.10</b>	//	Octobre	//	//	//	//
<b>GF.11</b>	//	Novembre	//	//	//	//

Source des données géographiques : <https://www.wunderground.com/>

Tableau 04 : Les caractéristiques des échantillons de galles de *P. atlantica* récoltés en 2016.

Ech.	Forme des galles	Mois de récolte	Sites de récolte	Latitude	Longitude	Altitude
GS.8.1	Sphérique	Août	Site 1	33°30'37.7"N	2°59'32.58"E	873 m
GS.9.2	//	Septembre	Site 2	33°44'43.42"N	2°47'43.48"E	784 m
GS.9.3	//	Septembre	Site 3	33°38'47.37"N	2°47'10.79"E	906 m
GS.7.4	//	Juillet	Site 4	33°24'29.08"N	3°1'36.70"E	835 m
GS.8.4	//	Août	Site 4	//	//	//
GS.9.4	//	Septembre	Site 4	//	//	//
GS.7.5	//	Juillet	Site 5	33°55'47.26"N	2°8'37.61"E	1163 m
GS.8.5	//	Août	Site 5	//	//	//
GS.8.6	//	Août	Site 6	34°4'3.66"N	2°3'0.18"E	1430 m
GS.9.6	//	Septembre	Site 6	//	//	//
GSC.7.5	Semi-circulaire	Juillet	Site 5	33°55'47.26"N	2°8'37.61"E	1163 m
GSC.8.5	//	Août	Site 5	//	//	//
GSC.8.6	//	Août	Site 6	34°4'3.66"N	2°3'0.18"E	1430 m
GSC.9.6	//	Septembre	Site 6	//	//	//

Source des données géographiques : [Google Earth Pro](#)

## 1.2 Méthodes expérimentales

Le plan expérimental est résumé selon l'organigramme suivant (Figure 57) :

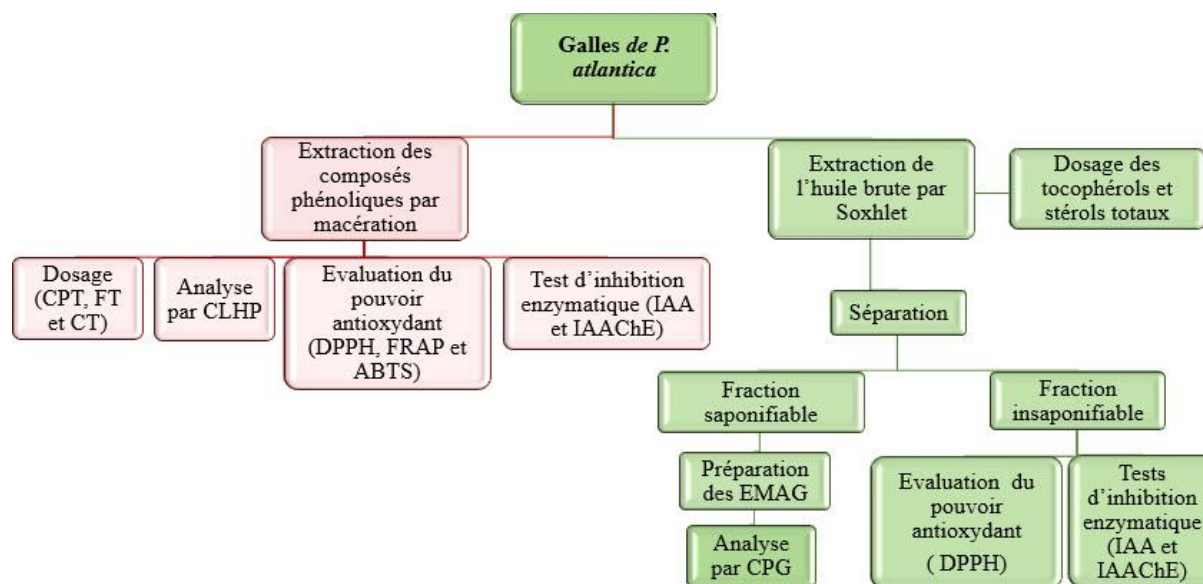


Figure 57 : Organigramme de la démarche expérimentale pour les galles de *P. atlantica*.

### 1.2.1 Extraction des lipides

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en lipide de nos échantillons récoltés en 2016, nous avons choisi une méthode qui est basée sur l'extraction solide-liquide par l'appareil Soxhlet.

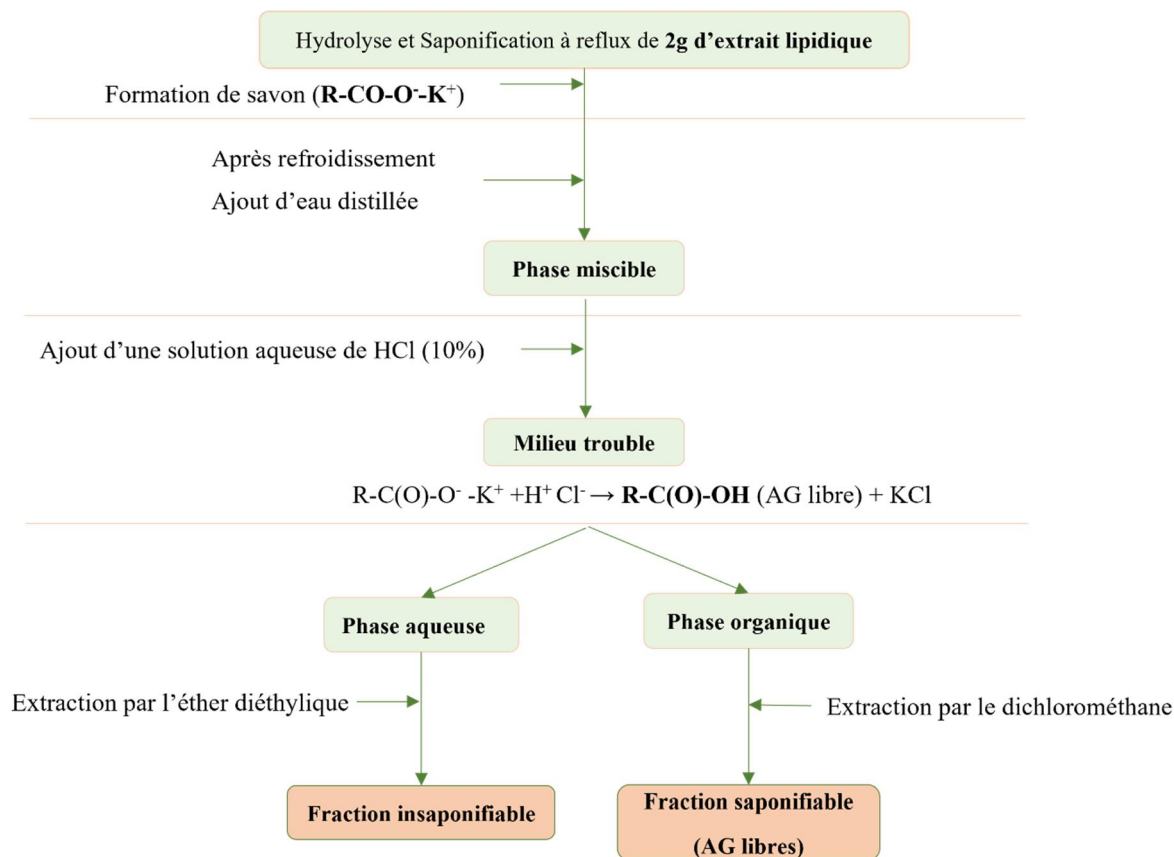
En utilisant l'hexane comme solvant pendant 12 heures. Le sulfate de sodium anhydre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a été ajouté dans l'extrait pour éliminer les traces d'eau pouvant se trouver dans l'extrait. Après filtration, l'hexane a été évaporé sous pression réduite à  $40^\circ\text{C}$ . L'extrait lipidique a été placé dans une étuve pendant 24 heures pour éliminer toutes traces de solvant restant, pesé pour déterminer la teneur en lipide puis conservé dans des bouteilles brunes à  $6^\circ\text{C}$  jusqu'à l'utilisation. Le rendement de l'extrait lipidique a été exprimé en pourcentage de lipide dans 100g de matière végétale (poudre de galles). Selon la relation :

$$\text{Rendement en extrait lipidique (\%)} = \left( \frac{M_{EL}}{M_{MV}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equa. 21})$$

$M_{EL}$  and  $M_{MV}$  sont la masse d'extrait lipidique (g) et la masse de la matière végétale (g), respectivement.

### 1.2.2 Séparation des fractions lipidiques (saponifiable et insaponifiable)

La méthode de séparation des deux fractions a été mise en point au sein de notre laboratoire, présentée dans la **Figure 58**. Une solution hydro-alcoolique de potasse KOH (0,5N) a été ajoutée à 2g d'extrait lipidique. Le mélange a été chauffé à reflux pendant 1h30min. Après refroidissement, 100ml d'eau distillée a été ajoutée, puis 100ml d'HCl (10%), conduisant à l'apparition d'une solution trouble, formation de deux phases ; phase aqueuse (fractions insaponifiables) et phase organique (Acides gras libres). A l'aide d'une ampoule à décanter, la fraction insaponifiable a été extraite à trois reprises avec 100ml d'éther diéthylique, par contre la fraction saponifiable a été extraite à trois reprises avec 100ml de dichlorométhane. Les fractions ont été séchées avec le sulfate de sodium anhydre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Les deux résidus obtenus ont été mis dans une étuve pendant 24h puis pesés.



**Figure 58** : Protocole de séparation des fractions saponifiable et insaponifiable de l'extrait lipidique.

### 1.2.3 Préparation d'esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ont été préparés selon le mode opératoire suivant (**Figure 59**) : 0,5 g des acides gras libres (fraction saponifiable) ont été chauffés à reflux pendant 30 min avec 20 ml de solution méthanolique de sodium ( $NaOCH_3$  0,5%). Après refroidissement, 20 ml d'eau distillée ont été ajoutés. Les EMAG ont été récupérés par une double extraction liquide-liquide en utilisant 50 ml de dichlorométhane, lavés plusieurs fois à l'eau distillée et séchés à l'aide de sulfate de sodium anhydre ( $Na_2SO_4$ ). Après filtration et évaporation du dichlorométhane, les EMAG ont été purifiés par flash chromatographie à l'aide d'une pipette pasteur remplie de gel de silice comme phase stationnaire et dichlorométhane comme phase mobile (éluant).

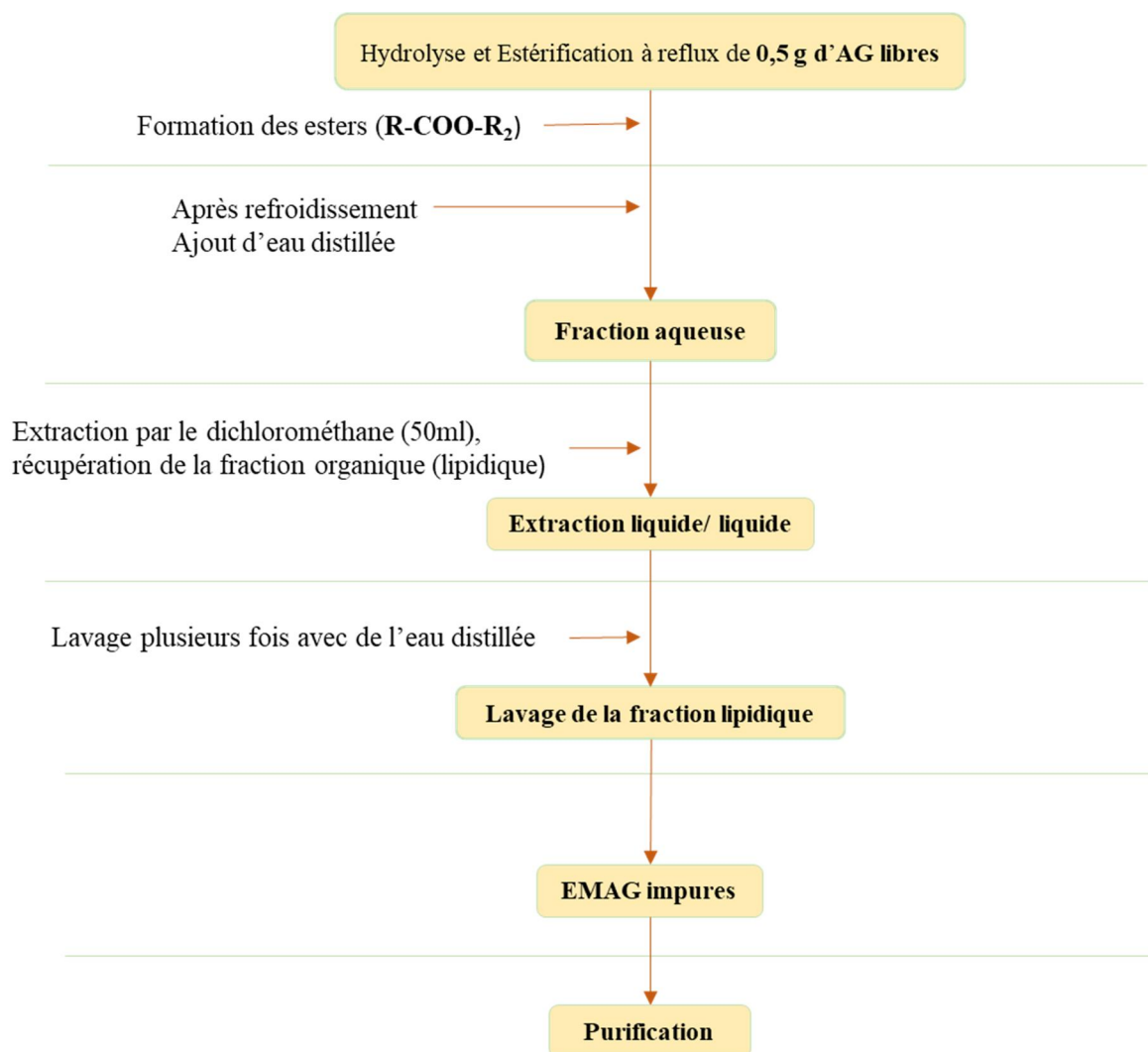


Figure 59 : Protocole de préparation des EMAG.

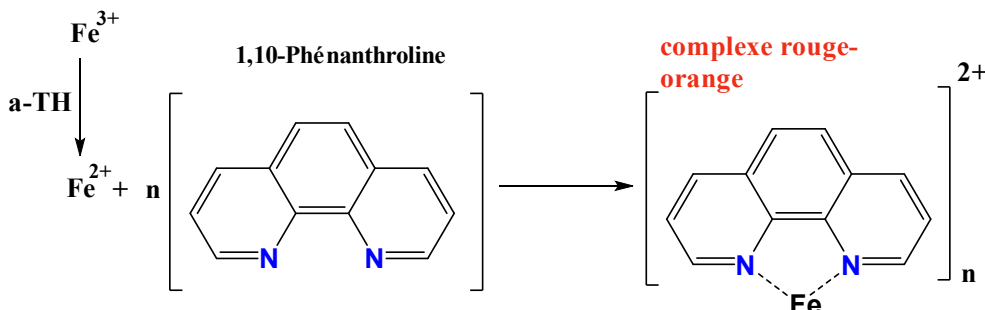
#### 1.2.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse des EMAG a été réalisée dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse CPG (Chrompack CP 9002). Ce modèle est équipé d'un détecteur FID, d'une injection en mode Split (1/100) et d'une colonne capillaire Cp Sil 8 CB (30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,25  $\mu$ m d'épaisseur de film). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées respectivement à 250°C et 280°C. L'azote a été utilisé comme gaz vecteur. Le volume d'injection était de 0,8  $\mu$ l. L'identification des EMAG a été réalisée en comparant les temps de rétention des pics avec ceux des standards purs. Les résultats ont été exprimés en pourcentage.

#### 1.2.5 Dosage des tocophérols totaux (TT)

Le dosage des tocophérols totaux a été effectué selon la méthode de dosage colorimétrique (Emmerie et Engel, 1938). Cette méthode repose sur une réaction

d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Un complexe rouge-orange stable est formé entre  $\text{Fe}^{2+}$  et le 1,10-phénanthroline ayant un coefficient d'extinction élevé à 510 nm (**Figure 60**).

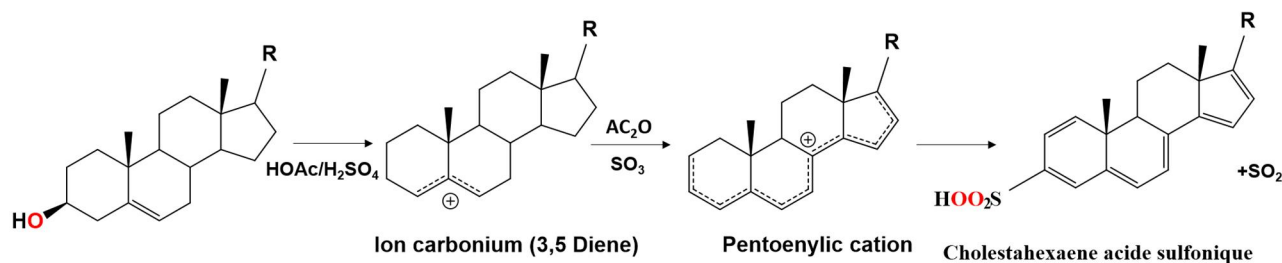


**Figure 60** : Formation du complexe stable 1,10-phénanthroline-fer.

Un volume de 1 ml de l'extrait lipidique et 1 ml de réactif 1,10-phénanthroline (0,4% dans l'éthanol absolu) ont été mélangés, puis 0,5 ml de réactif au chlorure ferrique  $\text{FeCl}_3$  (0,12% dans l'éthanol absolu) a été ajouté. Le mélange a été agité et laissé pendant 5 min. l'absorbance a été obtenue à 510 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japon). La teneur en tocophérols totaux a été calculée à partir de la courbe standard de la vitamine E (Tocophérol) (**Annexe 01**) et exprimée en microgrammes équivalents en tocophérol par gramme de lipide (mg T/g de L).

### 1.2.6 Dosage des stérols totaux (ST)

Le dosage des stérols totaux a été réalisé par une méthode spectrophotométrique suivant le test de (**Burke *et al.*, 1974**), basé sur la formation d'un complexe stable entre les stéroïdes (possédant une double liaison en position 5-6) et l'anhydride acétique en milieu acide (**Figure 61**).



**Figure 61** : La dérivation du cholestérol selon la réaction de Liebermann-Burchard (**Burke *et al.*, 1974**).

1 ml d'extrait lipidique a été mélangé à 2 ml du réactif de Liebermann (le réactif est constitué de 60 ml d'anhydride acétique, 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide

acétique). Ensuite, le mélange a été incubé pendant 25 min afin de permettre la coloration, de se développer et de se stabiliser. L'absorbance a été mesurée à 550 nm. La concentration des stérols a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage  $\beta$ -sitostérol (**Annexe 01**) et exprimée en microgrammes équivalents de  $\beta$ -sitostérol par gramme de lipide (mg S /g de L).

### 1.2.7 Extraction des composés phénoliques

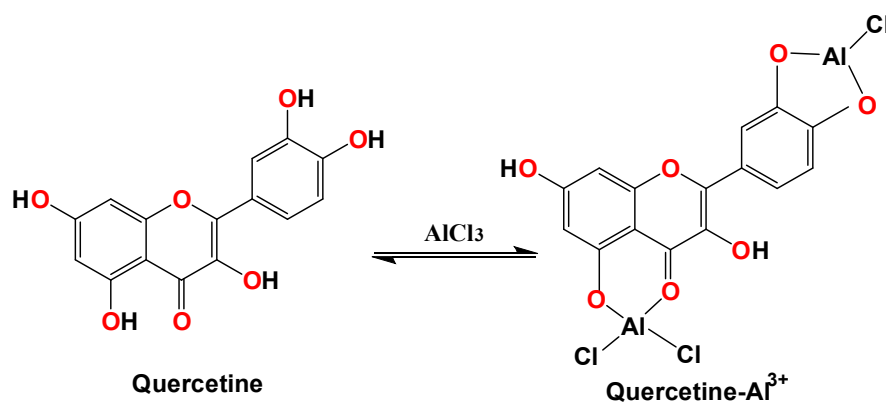
Une quantité de 2 g de poudre de galles de *P. atlantica* a été macérée dans 40 ml de méthanol pur pendant 48h avec renouvellement du solvant après 24 heures. Les extraits organiques ont été regroupés, filtrés et le méthanol a été évaporé sous pression réduite à 45°C. Le résidu final a été placé dans une étuve pendant 24 heures. Tous les échantillons ont été récupérés dans 10 ml de méthanol, conservés à 6°C jusqu'à l'utilisation. Le rendement total pour chaque échantillon a été obtenu par le rapport entre la masse du résidu de l'extrait et la masse de matière végétale sèche.

### 1.2.8 Dosage des composés phénoliques totaux (CPT)

La teneur totale des composés phénoliques a été déterminée par le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton & Rossi (**Boussoussa *et al.*, 2014**). Ce réactif est un acide de couleur jaune constitué de deux acides : acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Cette méthode implique l'oxydation en milieu alcalin les fonctions OH des composés phénoliques et la réduction du réactif en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Un volume de 100  $\mu$ l d'extrait a été mélangé avec 500  $\mu$ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après 3 min d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  (2%) a été incorporé, les solutions ont été mélangées à l'aide d'un vortex et immédiatement maintenues à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 760 nm. La teneur en CPT a été déterminée à partir de la courbe standard d'acide gallique (**Annexe 01**) et exprimée en milligrammes équivalents en acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg AG/g MV).

### 1.2.9 Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

La teneur totale en flavonoïdes (FT) a été analysée à l'aide de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (**Vongsak *et al.*, 2013**). Le complexe jaune flavonoïde-aluminium formé absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 430 nm (**Figure 62**).

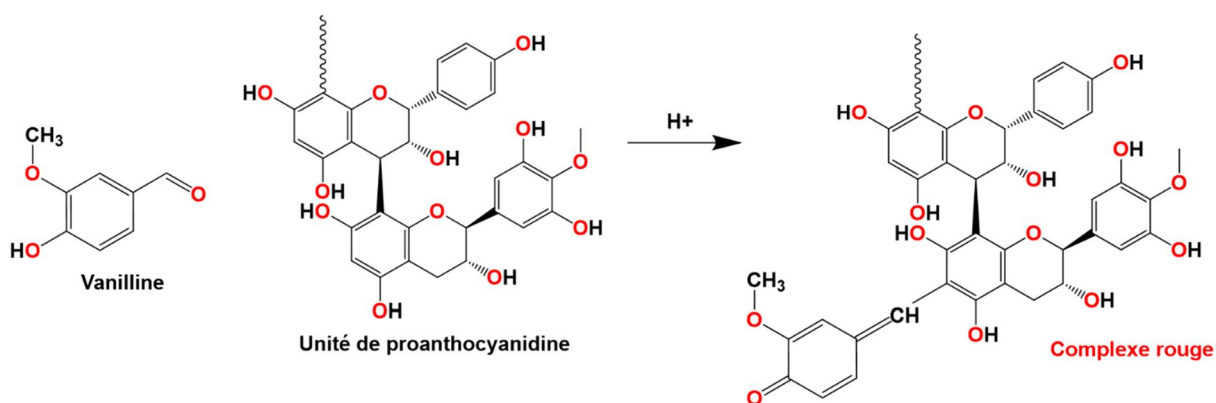


**Figure 62:** Formation du complexe flavonoïde-trichlorure d'aluminium (Amorim *et al.*, 2008).

Un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'extrait a été ajouté à 500  $\mu\text{l}$  de la solution de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 2%). Le mélange a été incubé à une température ambiante pendant 15 min. L'absorbance a été mesurée à 430 nm. La teneur en FT a été déterminée à partir de la courbe standard de la quercétine (Annexe 01) et exprimée en milligrammes équivalents en quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg Q/ g MV).

### 1.2.10 Dosage des tanins condensés (TC)

La teneur en tanin condensé a été déterminée par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par (Broadhurst et Jones, 1978) avec quelques modifications. La vanilline est spécifique des flavan-3-ols et des unités proanthocyanidines (Figure 63) et donc son utilisation est largement recommandée pour estimer les tanins condensés. Le principe du dosage est basé sur la substitution de la vanilline par un groupe hydroxyle phénolique, donnant un produit de condensation de couleur rouge (Mohammed, 2008).



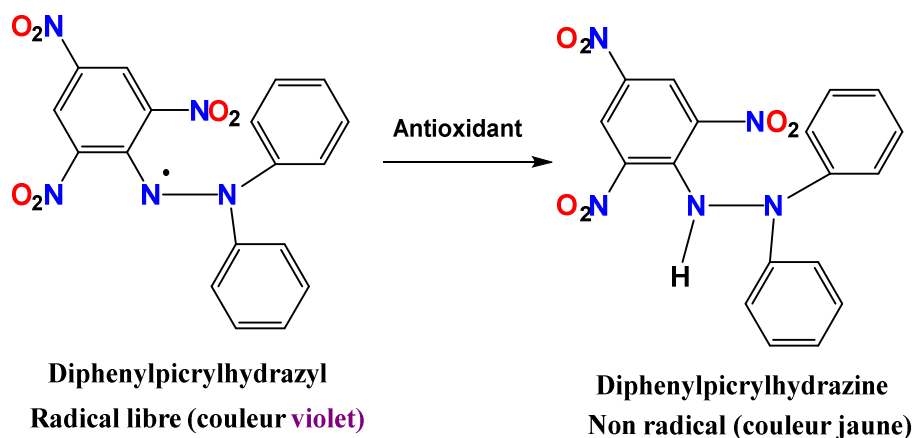
**Figure 63:** Formation du complexe tanin condensé-vanilline (Schofield *et al.*, 2001).

La vanilline (1%) a été mélangé avec (v/v) de HCl (8%). Le réactif a été maintenu à une température de 30°C. Un volume de 1 ml de la réactive vanilline a été ajouté à 200  $\mu$ l d'extrait. Le mélange a ensuite été laissé réagir à 30°C pendant 15 min. L'absorbance a été mesuré à 500 nm. Les résultats ont été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine (**Annexe 01**) et estimés en milligrammes équivalents en catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg C/ g MV).

## 1.2.11 Evaluation de l'activité antioxydante

### 1.2.11.1 Test du DPPH<sup>•</sup> (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

Le test DPPH<sup>•</sup> a été réalisé selon la méthode décrite par (Du *et al.*, 2014) avec des modifications mineures. Cette méthode est basée sur la réduction du DPPH<sup>•</sup> (couleur pourpre) en présence d'un donneur d'hydrogène H<sup>•</sup>, le cas des composés antioxydants, donnant une couleur jaune (**Figure 64**). La décoloration correspond à la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres. L'absorbance mesure le DPPH<sup>•</sup> restant à une longueur d'onde de 517 nm.



**Figure 64** : Réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup> (Molyneux, 2004).

Un volume de 1 ml de solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> (250 $\mu$ M) a été mélangé à 1 ml d'extrait et agité à l'aide d'un vortex. Le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. La capacité antioxydante (CA) des composés phénoliques de l'extrait a été exprimée en milligrammes équivalents en acide ascorbique (vitamine C) par gramme de matière végétale sèche (mg AA/g MV) et celle des extraits lipidiques a été exprimée en microgrammes équivalents en tocophérol (vitamine E) par gramme de matière végétale sèche ( $\mu$ g T/g MV). Le calcul de CA a été réalisé en utilisant l'équation suivante :

$$CA = \left( \frac{Abs_c - Abs_e}{a} \right) \cdot d \cdot v \left( \frac{1}{q} \right) \quad (\text{Equa. 22})$$

**Abs<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle (sans l'ajout de l'extrait) ;

**Abs<sub>e</sub>** : Absorbance en présence de l'extrait (DPPH' restant après la réaction avec l'extrait) ;

**$\alpha$**  : La pente de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique/ tocophérol (**Annexe 02**);

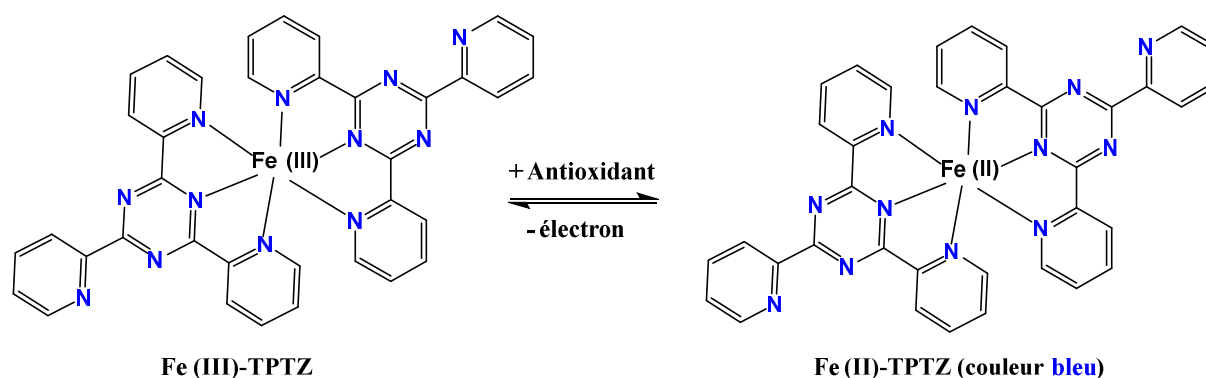
**d** : Nombre de dilution de l'extrait ;

**v** : Volume total de l'extrait (10 ml) ;

**q** : Quantité de poudre de galle utilisée pour l'extraction (g).

### 1.2.11.2 Test de FRAP

Le dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) a été déterminé selon la méthode de (**Benzie et Strain, 1996**) avec quelques modifications. Ce test a été réalisé pour mesurer la capacité des extraits, à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), présent dans le complexe  $[\text{Fe}^{3+}]$ -TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) en fer ferreux  $[\text{Fe}^{2+}]$ -TPTZ (couleur bleu) par transfère d'électron et à un pH acide (**Figure 65**).



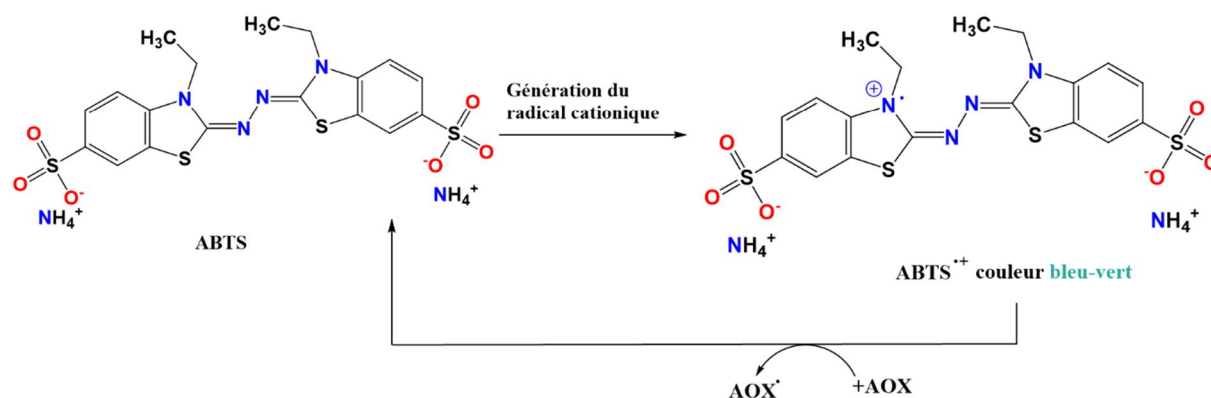
**Figure 65** : Réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) en présence d'antioxydant (**Xiao et al., 2020**).

Le réactif FRAP a été préparé en mélangeant 10 ml de tampon acétate (0,3 M, pH 3,6), 1 ml de TPTZ (10 mM dans HCl 40 mM), et 1 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). Une quantité de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait a été ajoutée à 1 ml de réactif FRAP. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 20 min et l'absorbance a été mesurée à 596 nm. La capacité de réduction ferrique a été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Annexe 02), puis exprimée en milligrammes équivalents acide ascorbique par gramme de matière végétale sèche (mg AA/g MV)

### 1.2.11.3 Test d'ABTS<sup>•+</sup>

La capacité des antioxydants à piéger le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-Azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) a été estimée à l'aide du système (ABTS/peroxydase/peroxyde d'hydrogène) pour la formation du radical ABTS<sup>•+</sup>, comme indiqué par la méthode (**Chen et**

*al.*, 2004) avec quelques modifications. Le radical  $ABTS^{+\cdot}$  a une couleur bleu-vert relativement stable qui est mesurée à 417 nm. En présence d'un antioxydant tel que le trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), le passage du radical  $ABTS^{+\cdot}$  à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la couleur qui est proportionnellement à la concentration d'antioxydants (**Figure 66**).



**Figure 66** : Réduction du radical cationique  $ABTS^{+\cdot}$  (Becker *et al.*, 2019).

Le réactif final est constitué de 1 ml d'ABTS (20 mM), 1 ml de peroxydase de raifort (0,2 mg/ml) préparée en tampon phosphate pH = 6,9 et 150  $\mu$ l de peroxyde d'hydrogène (1 mM). Une quantité de 100  $\mu$ l d'échantillon a été mélangée avec 1 ml du réactif final. La lecture a été obtenue après 10 min d'incubation à 417 nm. L'activité antioxydante totale des extraits a été calculée en comparant la décoloration ABTS avec le trolox. Les résultats ont été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage du trolox (**Annexe 02**) et exprimés en milligrammes équivalents de trolox par gramme de matière végétale sèche (mg T/g MV).

### 1.2.12 Analyses des composés phénoliques par CLUP

Dans le but d'identifier les molécules bioactives présentes dans les galles de *P. atlantica*, une analyse qualitative a été effectuée par CLUP I-Class (Waters, Milford, MA, USA) équipé d'une pompe binaire, d'un dégazeur en ligne, d'un échantillonneur automatique, d'un four à colonne et d'un détecteur à matrice de photodiodes (DMP) (Waters, Milford, MA, USA) et couplé à un Spectromètre de masse en tandem QTOF (Waters) et d'une source ESI. Une colonne Acquity BEH C18 UPLC<sup>R</sup> (Waters) (50 mm  $\times$  2,1 mm de diamètre interne et 1,7  $\mu$ m d'épaisseur) conditionnée à 40 °C a été utilisée. La séparation a été réalisée à un débit de 0,3 ml/min avec une phase mobile constituée de deux solutions, (A) : acide formique (0,1 %) et (B) : méthanol. Le gradient est programmé comme suivant : 0 min, 15 % (B) ; 5 min, 30 % (B) ;

10 min, 40 % (B) ; 14 min, 45 % (B) ; 16 min, 45 % (B) ; 20 min, 55 % (B) et 25 min, 100% (B). Un volume de 2  $\mu$ l d'échantillon a été injectée et la détection a été effectuée à 254 nm. Les solutions ont été fraîchement préparées dans du méthanol avant l'injection et filtrées à travers un filtre à membrane en cellulose régénérée de 0,22 m. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Waters Empower TM (Waters, MA, USA).

### 1.2.12.1 Spectrométrie de masse (MS)

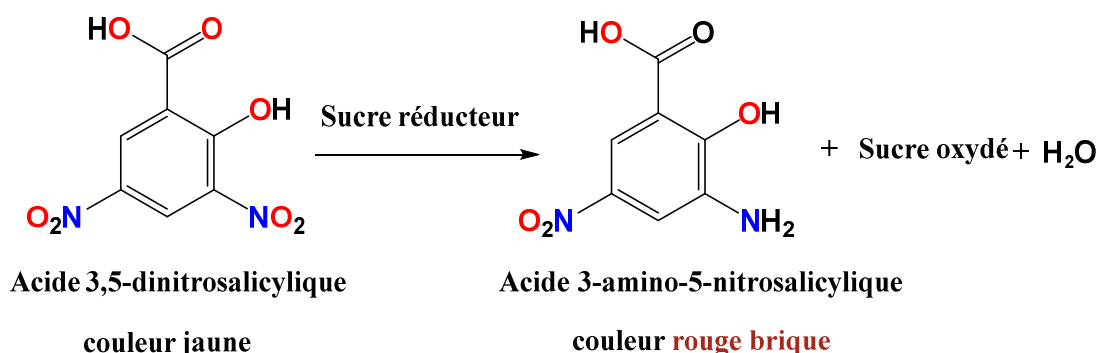
La détermination des formules moléculaires des composés a été réalisée sur un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (Q-TOF) XevoG2-S équipé d'une source d'ionisation par électronébuliseur (ESI) et qui opère en mode négatif. Les conditions pour la source ESI ont été les suivantes : voltage de cône de 40 V ; voltage du capillaire de 3 Kv, température de la source à 120 °C ; température du gaz de désolvatation à 450 °C et débit de 800 L/h. L'analyse des échantillons a été effectuée par acquisition indépendante des données MS<sup>E</sup> (où E représente l'énergie de collision) en utilisant le mode de balayage complet de 50 à 1200 m/z, avec un temps de balayage de 1 seconde. L'acquisition de données a été accomplie en deux fonctions continues. Dans la première, les données précurseurs ont été collectées sans énergie de collision en mode MS, tandis que dans la seconde fonction MS<sup>E</sup>, les ions précurseurs ont été davantage fragmentés en utilisant une énergie de collision élevée allant de 15 à 35 eV. Pour une obtention plus précise des mesures de masse, les données ont été placés en centroïde pendant l'acquisition, une solution de référence de « lockmass », leucine-enképhaline à 200 pg/ml a été introduit dans la source d'ionisation (ESI) et la correction de masse automatique a été activée. La leucine-enképhaline (m/z 556,2771) a été dissoute dans l'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique (50 :50, v/v). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel MassLynx™ 4.1 avec le programme MS<sup>E</sup>.

### 1.2.13 Tests d'inhibition enzymatique

#### 1.2.13.1 Inhibition de l'activité $\alpha$ -Amylase (IAA)

L'activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* a été déterminée par la méthode décrite par (Abirami *et al.*, 2014) avec quelques modifications. Le principe de ce test est de mesurer le pouvoir réducteur du maltose libéré lors de l'hydrolyse de l'amidon par  $\alpha$ -amylase, en utilisant l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). Le DNS (couleur jaune) réagit avec le groupe carbonyle libre du sucre réducteur et est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (couleur rouge brique) dans des conditions alcalines (Miller, 1959) (Figure 67). L'intensité de la

coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel.



**Figure 67** : Réduction du DNS par le biais de sucre réducteur.

Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 200  $\mu$ l d'un tampon de phosphate de potassium (0,03 M ; pH=7), 100  $\mu$ l de la solution  $\alpha$ -amylase (0,5 mg/ml) et 100  $\mu$ l d'extrait à différentes concentrations (de 0,1 à 4 mg/ml pour les extraits méthanoliques et de 0,05 à 3 mg/ml pour les extraits hexaniques et les fractions insaponifiables). Après une préincubation à 37°C pendant 5 min, 100  $\mu$ l de substrat (10 mg/ml) a été ajoutée. La réaction enzymatique a été incubée à 37°C pendant 4 min puis arrêtée par l'addition de 1 ml de DNS (2,5 g de 3,5-dinitrosalicylique, 5 g de phénol cristallin, 50 g double tartrate de Na et K, 0,125 g de sulfite de sodium et 5 g NaOH sont dissous dans 500 ml d'eau distillée). Le mélange a été chauffé à 100°C pendant 5 min, puis refroidi en ajoutant 3 ml d'eau distillée. Le mélange réactionnel dépourvu d'extrait représente le contrôle et celui dépourvu de substrat représente le blanc du test. La production de maltose a été mesurée à 530 nm. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour établir les conditions optimales et celles-ci ont été jugées nécessaires : la concentration du substrat (amidon) 10 mg/ml et le temps d'incubation 4 min. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$PI(\%) = \left( \frac{Abs_c - Abs_e}{Abs_c} \right) \cdot 100 \quad \text{(Equa. 23)}$$

**Abs<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle (sans l'ajout de l'extrait) ;

**Abs<sub>e</sub>** : Absorbance en présence de l'extrait.

Les activités des extraits ont été évaluées en déterminant la concentration de l'extrait qui inhibe 50% de l'activité de l'enzyme (**IC<sub>50</sub>**). Ce dernier a été déterminé à partir de la régression linéaire de la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations (**Annexes 5, 6, 7 et 8**). Le médicament Gluconova qui contient de l'acarbose a été utilisé comme inhibiteur d' $\alpha$ -amylase de référence (3-10 mg/ml) (**Annexe 04**). Les paramètres de la cinétique

enzymatique ont été déterminés à l'aide des courbe  $1/V_0 = f(1/S_0)$ . Pour cela, une gamme de concentrations croissantes de substrat (1-10 mg/ml) a été préparée.

### 1.2.13.2 Inhibition de l'activité Acétylcholinestérase (IAAChE)

L'activité inhibitrice des extraits sur l'EeAChE (*Electrophorus electricus*) a été évaluée par la méthode colorimétrique d'Ellman avec quelques modifications (Ellman *et al.*, 1961). Cette méthode repose sur le principe suivant : l'enzyme AChE hydrolyse le substrat acétylthiocholine en thiocholine et en acétate. Le groupement thiol de la thiocholine réagit avec le réactif d'Ellman DTNB (acide 5,5' dithio-bis-2 nitrobenzoïque) entraînant la libération du TNB (acide 5-thio-2-nitrobenzoïque) qui est un anion jaune. La figure suivante montre le principe de ce test (Pohanka, 2014). La diminution de la coloration indique l'inhibition de l'enzyme par les extraits testés, empêchant ainsi la formation de thiocholine.

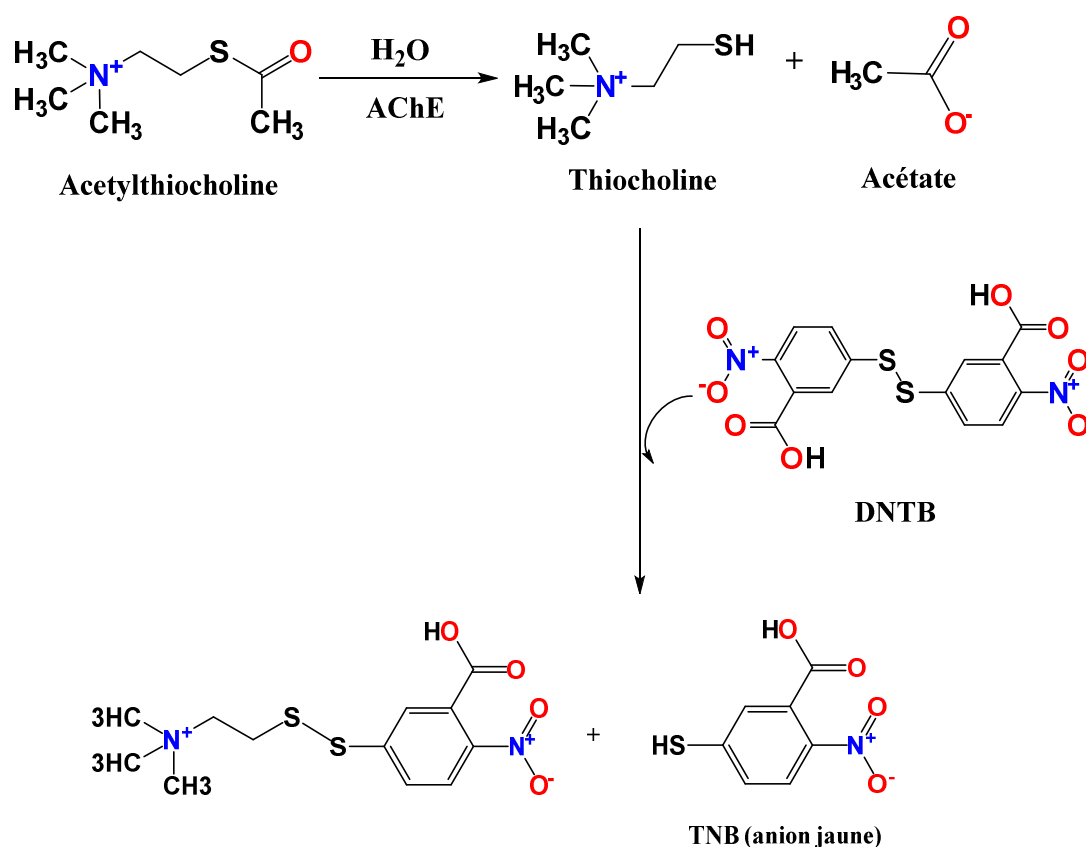


Figure 68 : Principe de la méthode d'Ellman (Pohanka, 2014).

Dans une plaque à 96 puits, 130  $\mu$ l de tampon de phosphate de sodium (pH=8), 10  $\mu$ l d'extrait à différentes concentrations (de 0,05 à 1 mg/ml) et 20  $\mu$ l de la solution AChE (0.05 mg/ml) ont été mélangés. Après 15 min de préincubation, 20 $\mu$ l de DTNB a été ajouté. La réaction a ensuite été initiée par l'injection de 20 $\mu$ l d'une solution d'iodure d'acétylthiocholine

(2 mg/ml). La réaction enzymatique a été incubée pendant 10 min. La production de l'anion jaune TNB a été détecté à une longueur d'onde de 405 nm en utilisant un lecteur microplaques (DIALAB, ELX800G). Le mélange réactionnel dépourvu d'extrait représente le contrôle et celui dépourvu d'enzyme représente le blanc du test. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant l'équation (**Equa.23**). L'IC<sub>50</sub> des extraits a été déterminé à partir de la régression linéaire de la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations (**Annexes 9, 10, 11 et 12**). Le donépézil a été utilisé comme inhibiteur de référence (0.05 -0.3  $\mu$ g/ml) (**Annexe 04**).

#### 1.2.14 Analyse statistique

Tous les tests ont été effectués en triple à l'exception des rendements ainsi que l'activité inhibitrice sur l'AChE qui a été réalisée en double. Les données ont été exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Les résultats ont été évalués par une analyse de variance (ANOVA), en utilisant le test de Tukey, à l'aide du logiciel Minitab ®18.1 (Minitab Inc., United States) afin de détecter les différences significatives. Des valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme significatives. La corrélation entre divers paramètres a également été étudiée par le test Pearson ( $p < 0,05$ ). L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide de XLSTAT-Pro version 2014 (Addinsoft, New York, NY).

*Chapitre*

---

**2**

***Résultats et Discussion  
des études in vitro***

## 1 Résultats et discussion

### 1.1 Rendement d'extraction

Les extraits hexaniques (lipides) des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016 ont montré un aspect visqueux de couleur vert foncé qui se solidifie presque totalement à la température ambiante, cela est probablement due à la composition des huiles en acides gras saturés et en cires et pour la couleur verte peut s'expliquer par la présence de chlorophylle. Concernant les deux rendements, le plus élevé et le plus faible des galles sphériques ont été observés chez les échantillons **GS.8.5** et **GS.8.4** récoltés au même mois d'août mais de sites différents avec des valeurs : 4,63% et 2,70% (m/m), respectivement et une moyenne de 3,65% (**Tableau 05**). Alors que ceux des semi-circulaires, la teneur élevée a été obtenue chez les **GSC.9.6** à une valeur de 7,64% et la plus faible a été de 2,74% chez les **GSC.8.6** avec une moyenne de 5,19%. Les galles semi-circulaires produisent 2 fois plus de rendement que les galles sphériques. La différence des rendements peut être due aux origines, aux conditions environnementales qui affectent le développement des lipides (**Cherbi et al., 2017**) ou encore les stades de croissance qui peuvent provoquer des variations physiologiques et biochimiques capables de modifier la production de composés (**Cirak and Radusiene, 2019**).

**Tableau 05** : Rendement des extraits hexaniques (lipides) des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

Echantillons	Extraits hexaniques (lipides) (%) m/m		
	Lipide brute	Fraction saponifiable	Fraction insaponifiable
		(m/m de lipide brute)	
<b>GS.8.1</b>	3,40	75,23	7,38
<b>GS.9.2</b>	2,90	74,90	0,90
<b>GS.9.3</b>	3,20	77,40	0,90
<b>GS.7.4</b>	3,15	82,90	0,40
<b>GS.8.4</b>	2,70	70,60	1,40
<b>GS.9.4</b>	2,80	65,12	0,10
<b>GS.7.5</b>	3,33	87,64	1,10
<b>GS.8.5</b>	4,63	94,40	0,80
<b>SG.8.6</b>	3,54	91,21	0,10
<b>GS.9.6</b>	3,17	91,40	0,04
<b>GSC.7.5</b>	4,61	88,93	0,12
<b>GSC.8.5</b>	5,50	93,21	0,04
<b>GSC.8.6</b>	2,74	72,73	0,11
<b>GSC.9.6</b>	7,64	78,20	5,31

Si nous comparons nos résultats avec ceux de (**Chelghoum et al., 2021**) sur les teneurs en huiles brutes des feuilles et des galles de *P. atlantica*, ces derniers ont varié entre 4,64 % à 7,52 %

pour les feuilles, entre 2,77 % à 5,21% pour les galles sphériques et entre 3,018 % à 7,403 % pour les galles semi-circulaires. Nous constatons des rendements proches aux notre. Cependant, beaucoup plus faibles par rapport aux rendements trouvés par (Guenane, 2017) sur les fruits de *P. atlantica* qui ont fluctués entre 6,73 % et 49,8%.

Concernant les extraits méthanoliques brutes (2010 et 2016), nous remarquons qu'ils présentent un aspect visqueux de couleur marron foncé à l'exception des galles semi-circulaires qui ont une couleur rouge. De ce fait, la couleur marron foncé peut provenir d'une forte présence des tanins condensés, résultant de la polymérisation de composés phénoliques. Alors que, la couleur rouge peut être due à la présence d'anthocyanes. Pour les galles 2010, le rendement a varié de 69,05 à 88,90 % (m/m) pour les **GM** et de 53,60 à 76,80 % pour les **GF** (Tableau 06). Ainsi, le rendement le plus conséquent a été obtenu pour les **GM** collectées au moins de septembre et paradoxalement celles qui ont eu un faible résultat ont été enregistrée chez les **GF** du même moins.

**Tableau 06** : Rendement des extraits méthanoliques brutes des galles de *P. atlantica* récoltées en 2010.

Echantillons	Extraits méthanoliques brutes (%)
	m/m
<b>GM07</b>	82,07
<b>GM08</b>	88
<b>GM09</b>	88,90
<b>GM10</b>	69,05
<b>GM11</b>	76,09
<b>GF07</b>	76,80
<b>GF08</b>	67,03
<b>GF09</b>	53,60
<b>GF10</b>	54,73
<b>GF11</b>	61,80

Le **Tableau 07** présente l'ensemble des résultats des rendements obtenus chez les galles délipidées collectées en 2016. Le rendement le plus élevé pour les extraits méthanoliques des galles sphériques a été enregistré chez les galles **GS.8.6** collectées au mois d'aout avec une valeur de 82,40%, tandis que le plus faible a été enregistré chez les galles **GS.9.3** récoltées au mois de septembre avec une valeur de 36,40% et une moyenne de 59,36%. Pour la majorité des galles sphériques, le rendement est proportionnel à l'altitude des sites. Pour les semi-circulaires, il est compris entre 28,90% (**GSC.9.6**) et 39,20% (**GSC.7.5**) avec une moyenne de 34,04%. La comparaison entre les deux formes indique que les galles sphériques ont un rendement 2 fois plus important par rapport aux galles semi-circulaires.

**Tableau 07** : Rendement des extraits méthanoliques brutes des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

Echantillons	Extraits méthanoliques brutes (%) m/m
GS.8.1	61,32
GS.9.2	54,30
GS.9.3	36,40
GS.7.4	60,80
GS.8.4	48,20
GS.9.4	39,90
GS.7.5	64,22
GS.8.5	65,45
SG.8.6	82,40
GS.9.6	68,65
GSC.7.5	39,20
GSC.8.5	36,84
GSC.8.6	36,42
GSC.9.6	28,90

## 1.2 Analyse des acides gras par CPG

L'identification des EMAG par l'analyse CPG, nous a permis de détecter 16 AG avec une certaine variabilité dans les 14 échantillons. Les résultats de la composition en acides gras des galles de *P. atlantica* sont résumés dans le **tableau 08**. A notre connaissance, une seule étude a été réalisée par (**Chelghoum et al., 2021**) sur la composition en acides gras des galles de *P. atlantica*.

Le pourcentage des acides gras saturés totaux dans nos extraits lipidiques a varié de 33,13 %  $\pm$  1,69 (**SCG.8.6**) à 67,38 %  $\pm$  1,99 (**SG.8.6**), ce résultat démontre que les galles sphériques ont plus d'AGS totaux que les galles semi-circulaires. Parmi ces acides gras saturés, nous pouvons mentionner : les AG saturés avec moins de 12 atomes de carbone, appelés acides gras saturés à chaîne courte et moyenne, ont été enregistrés et ont varié de 2,66 % (pour **GS.9.4**) à 17,28 % (pour **GS.9.6**). De plus, l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide docosanoïque (C22:0) ont été majoritaires. Pour l'acide palmitique a été dominant pour les échantillons (**GS.8.1, GS.9.4, GS.7.5, GS.8.5, GSC.7.5, GS.8.6 et GS.9.6**) représentant des proportions entre 14,47 % et 34,86 %, par contre pour le reste des échantillons (**GS.9.2, GS.9.3, GS.7.4, GS.8.4, GSC.8.5, GSC.8.6 et GSC.9.6**) l'acide docosanoïque a été dominant avec des proportions qui ont varié de 12,18 % à 34,20 %. Les acides tels que : l'acide laurique (C12:0), myristique (C14:0), margarique (C17:0), stéarique (C18:0) et arachidique (C20:0) été également été trouvés, mais en faibles proportions.

Concernant les AG insaturés totaux, le pourcentage a fluctué de 10,8 %  $\pm$  1,67 (**SG.8.5**) à 43,40 %  $\pm$  2,66 (**SG.7.4**). Les acides palmitoléique (C16:1 $\omega$ 7), oléique (C18:1 $\omega$ 9), linoléique (C18:2 $\omega$ 6),

linoléique (C18:3 $\omega$ 3), gondoléique (C20:1 $\omega$ 9) et arachidonique (C20:4 $\omega$ 6) ont été détectés dans toutes les extraits lipidiques. L'acide linoléique et l'acide gondoléique ont été les composants majoritaires, représentant respectivement 1,99 % à 19,86 % et 1,40 % à 21,86 %. Le rapport AG insaturés/AG saturés a été faible dans tous les échantillons, allant de 0,27 à 1,14, même constatations observée dans l'étude effectuée par (**Chelghoum et al., 2021**) sur les galles de *P. atlantica* qui a enregistré des rapports allant de 0,27 à 1,22. Le niveau élevé d'AG saturés dans les extraits lipidiques des galles de *P. atlantica* pourrait diminuer sa valeur nutritionnelle. En effet, en comparant nos rapports AG insaturés/AG saturés par rapport à ceux des études réalisées par (**Guenane, 2017**) et (**Bentireche et al., 2019**) sur les fruits de *P. atlantica*, ces dernières ont enregistré des rapports beaucoup plus élevés allant de  $3,18 \pm 0,38$  à  $4,58 \pm 0,53$  et de  $3,66 \pm 0,60$  à  $5,19 \pm 0,87$ , respectivement. Ces AGI ont été principalement représentés par l'acide oléique (C18:1 $\omega$ 9) et l'acide linoléique (C18:2 $\omega$ 6), attribuant ainsi une réelle valeur nutritionnelle par rapport aux extraits lipidiques des galles. Selon (**Orsavova et al., 2015**), il a été constaté que l'acide laurique (C12:0) ainsi que l'acide myristique (C14:0) augmentent les concentrations plasmatiques de cholestérol total, le premier augmente la concentration du cholestérol LDL et le second augmente la concentration des deux cholestérols LDL et HDL. Cependant, d'autres études réalisées par (**Lawrence, 2013; Mensink et al., 2003**) ont rapporté que le rapport entre le cholestérol total et le cholestérol HDL est un marqueur plus spécifique des maladies coronariennes par rapport à la valeur seule du cholestérol LDL. Les huiles riches en acides palmitiques (C16:0) augmentent ce ratio.

Ces résultats montrent que les galles ne peuvent pas être utilisés à des fins alimentaires dû à leur faible rendement en lipides, cependant ils pourraient être proposés comme un produit cosmétique où encore à des fins thérapeutiques. Ces derniers peuvent être prouvés dans les prochaines études biologiques réalisées dans cette thèse.

Tableau 08 : Pourcentage des acides gras constitutifs de les extraits lipidiques des galles de *P. atlantica*.

Acides gras	Composition (%)													
	SG.8.1	SG.9.2	SG.9.3	SG.7.4	SG.8.4	SG.9.4	SG.7.5	SG.8.5	SG.8.6	SG.9.6	SCG.7.5	SCG.8.5	SCG.8.6	SCG.9.6
<b>C6:0</b>	1,84±0,2	1,22±0,12	1,49±0,15	-	0,84±0,13	0,71±0,12	Tr	2,32±0,15	0,70±0,12	1,64±0,14	0,74±0,12	1,78±0,19	-	-
<b>C8:0</b>	1,36±0,12	1,82±0,18	1,51±0,15	1,54±0,16	1,09±0,16	1,14±0,16	2,24±0,18	4,56±0,17	3,17±0,21	1,65±0,14	1,34±0,14	1,14±0,2	1,32±0,15	0,84±0,12
<b>C10:0</b>	12,03±0,35	5,77±0,25	1,18±0,12	7,13±0,31	8,88±0,27	0,81±0,12	3,11±0,2	1,57±0,12	1,32±0,14	13,99±0,4	1,62±0,19	0,42±0,12	2,35±0,2	10,92±0,3
<b>C12:0</b>	4,95±0,27	2,87±0,17	2,62±0,28	-	3,32±0,2	7,25±0,26	4,35±0,24	3,07±0,17	2,65±0,2	0,47±0,12	2,05±0,19	0,66±0,12	1,06±0,15	2,60±0,19
<b>C14:0</b>	4,67±0,3	2,87±0,17	2,85±0,24	3,42±0,12	1,98±0,16	1,14±0,16	7,28±0,36	6,89±0,2	15,71±0,39	8,61±0,28	0,89±0,15	1,13±0,16	2,74±0,23	3,65±0,24
<b>C16:0</b>	<b>15,93±0,43</b>	<b>12,89±0,4</b>	<b>10,24±0,27</b>	<b>20,51±0,43</b>	<b>18,95±0,35</b>	<b>26,55±0,4</b>	<b>19,49±0,32</b>	<b>14,47±0,36</b>	<b>34,86±0,43</b>	<b>19,02±0,37</b>	<b>20,00±0,42</b>	<b>7,11±0,28</b>	<b>10,39±0,39</b>	<b>7,19±0,28</b>
<b>C16:1ω7</b>	-	0,63±0,25	-	-	1,89±0,31	0,34±0,22	1,50±0,35	0,35±0,23	0,66±0,22	0,66±0,24	1,28±0,37	1,22±0,5	0,93±0,4	-
<b>C17:0</b>	2,58±0,16	2,54±0,22	-	-	-	0,25±0,12	1,11±0,17	0,88±0,13	0,54±0,12	1,64±0,16	0,63±0,12	5,45±0,26	1,68±0,15	-
<b>C18:0</b>	4,43±0,23	1,20±0,14	-	-	-	3,12±0,18	5,39±0,29	1,97±0,19	4,44±0,23	4,34±0,2	4,49±0,31	1,54±0,14	1,41±0,12	-
<b>C18:1ω9</b>	4,91±0,30	5,39±0,41	1,98±0,27	5,00±0,5	2,82±0,34	11,52±0,67	6,37±0,47	2,85±0,36	5,13±0,59	4,80±0,33	4,49±0,39	1,35±0,26	7,49±0,6	-
<b>C18:2ω6</b>	13,84±0,76	3,25±0,4	2,54±0,38	<b>19,86±0,88</b>	<b>8,65±0,58</b>	<b>10,23±0,7</b>	<b>10,96±0,68</b>	<b>1,99±0,34</b>	<b>6,83±0,57</b>	<b>3,14±0,42</b>	<b>12,02±0,72</b>	<b>4,98±0,47</b>	<b>10,44±0,65</b>	<b>6,78±0,54</b>
<b>C18:3ω3</b>	3,18±0,19	2,05±0,16	1,28±0,2	4,61±0,27	2,36±0,19	1,78±0,24	2,92±0,16	0,87±0,14	1,68±0,36	1,70±0,39	1,76±0,23	2,12±0,31	1,53±0,28	1,47±0,24
<b>C20:0</b>	Tr	-	-	-	-	1,88±0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C20:1ω9</b>	4,44±0,49	9,47±0,49	11,98±0,62	10,38±0,6	9,61±0,55	2,50±0,45	1,40±0,43	3,65±0,44	2,75±0,46	8,82±0,56	4,49±0,5	21,86±0,67	14,42±0,62	19,96±0,66
<b>C20:4ω6</b>	2,27±0,22	4,85±0,37	4,28±0,39	3,55±0,41	3,56±0,4	4,45±0,43	-	1,09±0,16	1,88±0,15	2,79±0,18	5,72±0,45	3,58±0,35	3,03±0,14	3,16±0,2
<b>C22:0</b>	7,83±0,32	15,93±0,3	34,20±0,41	21,21±0,4	21,93±0,36	7,36±0,22	-	4,25±0,13	3,99±0,15	-	8,88±0,27	39,51±0,42	12,18±0,3	33,68±0,38
<b>AGT (%)</b>	84,54±4,34	72,75±4,03	76,15±3,48	97,21±4,08	85,88±4	81,03±4,57	66,12±3,85	50,78±3,29	86,31±4,34	73,27±4,23	70,4±4,57	93,85±4,45	70,97±4,38	90,25±3,15
<b>ΣAGS (%)</b>	55,9±2,38	47,11±1,95	54,09±1,62	53,81±1,42	61,7±2,28	50,21±1,86	42,97±1,76	39,98±1,62	67,38±1,99	51,36±1,81	40,64±1,91	51,63±1,61	33,13±1,69	58,88±1,51
<b>ΣAGSM (%)</b>	15,23±0,67	8,81±0,55	4,18±0,42	8,67±0,47	10,81±0,56	2,66±0,4	5,35±0,38	8,45±0,44	5,19±0,47	17,28±0,68	3,7±0,45	3,34±0,51	3,67±0,35	11,76±0,42
<b>ΣAGMI (%)</b>	9,35±0,79	15,49±1,15	13,96±0,89	15,38±1,1	14,32±1,2	14,36±1,34	9,27±1,25	6,85±1,03	8,54±1,27	14,28±1,43	10,26±1,26	24,43±1,43	22,84±1,62	19,96±0,66
<b>ΣAGPI (%)</b>	19,29±1,17	10,15±0,93	8,1±0,97	28,02±1,56	14,57±1,17	16,46±1,37	13,88±0,84	3,95±0,64	10,39±1,08	7,63±0,99	19,5±1,4	10,68±1,13	15,00±1,07	11,41±0,98
<b>ΣAGI (%)</b>	28,64±1,96	25,64±	22,06±1,86	43,4±2,66	28,89±2,37	30,82±2,71	23,15±2,09	10,8±1,67	18,93±2,35	21,91±2,42	29,76±2,66	35,11±2,56	37,84±2,69	31,37±1,64
<b>I/S (%)</b>	0,51	0,54	0,41	0,81	0,47	0,61	0,54	0,27	0,28	0,43	0,73	0,68	1,14	0,53
<b>RL (%)</b>	3,37	2,89	3,19	3,15	2,66	2,78	3,33	4,63	3,54	3,17	4,61	5,49	2,74	7,64

**Abbréviations :** AGT : Acides gras totaux ; ΣAGS : Somme des acides gras saturés ; ΣAGSM : Somme des acides gras saturés à chaîne moyenne ; ΣAGMI : Somme des acides gras mono-insaturés ; ΣAGPI : Somme des acides gras polyinsaturés ; ΣAGI : Somme des acides gras insaturés ; I/S: ratio (insaturé/saturé); RL : Rendement lipidique; Tr, trace.

### 1.3 Teneurs en tocophérols totaux (TT)

Les tocophérols constituent une partie mineure de la fraction insaponifiable des corps gras. Ce sont des antioxydants naturels présentes dans les huiles. Les résultats des teneurs en tocophérols totaux des différents extraits hexaniques (lipides) des galles de *P. atlantica* sont résumés dans le **tableau 09**. Une différence très hautement significative entre les niveaux de TT ( $p=0,0001$ ) a été enregistrée à l'aide du test tukey. Les teneurs chez les galles sphériques ont varié de  $0,52 \pm 0,1$  mg T/g de L (pour **GS.8.6**) à  $2,30 \pm 0,1$  mg T/g de L (pour **GS.9.6**) avec une moyenne de  $1,32 \pm 0,1$  mg T/g de L et une étendue de 1,80. Tandis que, chez les galles semi-circulaires, les valeurs ont été comprises entre  $1,74 \pm 0,2$  mg T/g de L (pour **GSC.9.6**) à  $3,73 \pm 0,4$  mg T/g de L (pour **GSC.8.6**) avec une moyenne de  $2,40 \pm 0,2$  (mg T/ g de L) et une étendue de 2. Parmi l'ensemble des extraits, la plus grande quantité en TT a été enregistrée pour les galles semi-circulaires au mois de septembre, dont la moyenne est 2 fois supérieure à celle des galles sphériques. Les teneurs en tocophérols totaux ont présenté un niveau beaucoup plus faible par rapport aux extraits lipidiques des galles étudiées par (**Chelghoum et al., 2021**) avec des valeurs allant de  $4,26 \pm 0,86$  à  $92,91 \pm 6,52$  mg T/ g de L pour les galles sphériques et de  $23,22 \pm 0,74$  à  $42,41 \pm 0,20$  mg T/ g de L pour les galles semi-circulaires. Ces différences sont probablement dues au solvant utilisé pour l'extraction des lipides par le dichlorométhane qui est plus polaire que l'hexane.

### 1.4 Teneurs en stérols totaux

Les résultats ont montré que les extraits hexaniques contiennent des quantités appréciables de stérols (**Tableau 09**). Les teneurs en stérols ont fluctué significativement de  $28,24 \pm 0,9$  mg S/g de L (pour **GS.8.5**) à  $57,40 \pm 2,7$  mg S/g de L (**GS.7.5**) avec une moyenne de  $44,22 \pm 1,4$  (mg S/g de L) et une étendue de 29,15 pour les galles sphériques et ont varié de  $20,70 \pm 0,3$  mg S/g de L (pour **GSC.9.6**) à  $84,54 \pm 4,9$  mg S/g de L (pour **GSC.8.6**) avec une moyenne de  $44,30 \pm 1,8$  (mg S/g de L) et une étendue de 63,70 pour les galles semi-circulaires. Ainsi, la valeur la plus importante pour tous les échantillons a été obtenue chez les galles semi-circulaires en mois d'aout. Nos résultats sont proches de ceux de (**Guenane, 2017**) sur les huiles de fruits de *Pistacia atlantica*. En revanche, ils sont 2 fois inférieurs aux résultats obtenus par (**Harrat et al., 2018**) sur les huiles des feuilles de *P. lentiscus*.

**Tableau 09** : Teneurs en tocophérols totaux (TT) et stérols totaux (ST) dans les différents extraits des galles de *P. atlantica* récoltés en 2016.

Echantillons	TT (mg T/g de L)	ST (mg S/de L)
GS.8.1	0,70 <sup>fg</sup> ± 0,1	51,33 <sup>bc</sup> ±0.8
GS.9.2	1,24 <sup>defg</sup> ± 0,1	45,70 <sup>bcd</sup> ±5.4
GS.9.3	1,60 <sup>bcd</sup> ± 0,4	45,64 <sup>bcd</sup> ±3.3
GS.7.4	1,02 <sup>efg</sup> ± 0,2	43,20 <sup>cd</sup> ±1.3
GS.8.4	1,60 <sup>cde</sup> ± 0,2	50,22 <sup>bc</sup> ±10.0
GS.9.4	1,50 <sup>de</sup> ± 0,2	35,90 <sup>de</sup> ±5.6
GS.7.5	1,40 <sup>def</sup> ± 0,4	57,40 <sup>b</sup> ±2.7
GS.8.5	1,42 <sup>de</sup> ± 0,2	28,24 <sup>ef</sup> ±0.9
GS.8.6	0,52 <sup>g</sup> ± 0,1	38,98 <sup>cd</sup> ±5.1
GS.9.6	2,30 <sup>b</sup> ± 0,1	45,70 <sup>bcd</sup> ±5.8
GSC.7.5	1,83 <sup>bcd</sup> ± 0,2	36,10 <sup>de</sup> ±1.4
GSC.8.5	2,20 <sup>bc</sup> ± 0,2	35,90 <sup>de</sup> ±2.0
GSC.8.6	3,73 <sup>a</sup> ± 0,4	84,54 <sup>a</sup> ±4.9
GSC.9.6	1,74 <sup>bcd</sup> ± 0,2	20,70 <sup>f</sup> ±0.3

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f : indiquent des concentrations décroissantes.

### 1.5 Teneurs en composés phénoliques totaux

Au quotidien, les plantes sont confrontées à des conditions variables telles que le risque de l'indisponibilité des nutriments, des attaques de ravageurs ou toutes autres formes de maladies qui pourraient régesser sa croissance. C'est pour ces raisons qu'elles ont développées des stratégies efficaces pour l'accumulation des ressources et des moyens de défense telles que les composés phénoliques assurant leur survie dans l'écosystème (Royer *et al.*, 2013). En effet, l'impact des galles sur le fonctionnement de la plante-hôte constitue un parasitisme. Toutefois, semble bien supportée par la plante. Certains auteurs pensent que la formation de la galle est une sorte de moyen de défense qui permet à la plante de limiter l'impact négatif du parasite (Dauphin, 2012).

Afin d'évaluer la quantité des composés phénoliques dans les galles mâles et femelles de *Pistacia atlantica* récoltés en mois de juillet jusqu'au mois de novembre 2010, une analyse quantitative a été réalisée. Le **tableau 10** récapitule les résultats obtenus des teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), en flavonoïdes totaux (FT) et en tanins condensés totaux (TCT) des extraits méthanoliques des galles mâles et femelles de *P. atlantica*. Les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits méthanoliques des galles mâles de *P. atlantica* ont varié de  $159,80 \pm 6,6$  mg AG/g (pour **GM10**) à  $256,95 \pm 13,5$  mg AG/g (pour **GM09**) avec une

moyenne de  $206,23 \pm 5,96$  mg AG/g et une étendue de 97,15. Tandis que, ceux des galles femelles ont été entre  $143,25 \pm 8,6$  mg AG/g (pour **GF08**) à  $188,64 \pm 13,8$  mg AG/g (pour **GF07**) avec une moyenne de  $170,54 \pm 0,81$  mg AG/g et une étendue de 45,40. Parmi l'ensemble des extraits, la quantité la plus importante en CPT a été enregistrée chez les galles mâles et cela en mois de septembre.

En ce qui concerne, les extraits de 2016 récoltés au mois de juillet, août et septembre dans différents sites, une analyse quantitative a également été réalisée afin d'évaluer l'influence possible de la forme des galles (sphérique, semi-circulaire), du temps et des sites de récolte des galles *P. atlantica*. Les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins condensés dans les extraits méthanoliques sont également présentées dans le **tableau 10**. La teneur totale en composés phénoliques des différents extraits méthanoliques de galles sphériques ont varié de  $113,25 \pm 3,8$  mg AG/g (pour **GS. 9.4**) à  $328,61 \pm 12,6$  mg AG/g (pour **GS.8.1**) avec une moyenne de  $191,29 \pm 3,11$  (mg AG/g) et une étendue de 215,36. Les CPT des galles sphériques ont été proportionnels à l'altitude des sites à l'exception de l'échantillon **GS.8.1** qui est élevé à basse altitude. Tandis que ceux des galles semi-circulaires ont été compris entre  $103,1 \pm 2,5$  mg AG/g (pour **GSC.9.6**) et  $125,91 \pm 6,40$  mg AG/g (pour **GSC.7.5**) avec une moyenne de  $119,38 \pm 2,57$  (mg AG/g) et une étendue de 22,81. Les teneurs des formes sphériques ont été significativement plus élevés ( $p < 0,01$ ) que celles des formes semi-circulaires (3 fois). Parmi tous les extraits, des quantités importantes de CPT ont été atteintes en juillet et août et plus faibles en septembre. Nos résultats sont légèrement supérieurs aux extraits méthanoliques des galles étudiées par (**Chelghoum et al., 2021**).

## 1.6 Teneurs en flavonoïdes totaux

De même, les flavonoïdes suscitent un intérêt particulier en raison de leurs propriétés antioxydantes et de leurs effets synergiques avec d'autres antioxydants (**Ben Ahmed et al., 2017**). Les teneurs totales en flavonoïdes des extraits méthanoliques (2010) ont varié de  $0,50 \pm 0,06$  mg Q/g (pour **GM08**) à  $0,93 \pm 0,05$  mg Q/g (pour **GM09**) avec une moyenne égale à  $0,72 \pm 0,03$  mg Q/g et une étendue de 0,46 pour les galles mâles et des teneurs allant de  $0,72 \pm 0,07$  mg Q/g (pour **GF10**) à  $1,44 \pm 0,03$  mg Q/g (pour **GF09**) avec une moyenne égale à  $1,03 \pm 0,05$  mg Q/g et une étendue de 0,73 pour les galles femelles. Les flavonoïdes chez les galles femelles récoltées en mois de septembre ont enregistré une quantité plus élevée.

La différence de teneur totale en flavonoïdes de tous les extraits méthanoliques (2016) était significative ( $p = 0,0001$ ) allant de  $0,24 \pm 0,04$  mg Q/g (pour **GS.9.3**) à  $0,63 \pm 0,13$  mg Q/g

(pour **GS.8.5**) avec une moyenne égale à  $0,41 \pm 0,04$  (mg Q/g) et une étendue de 0,39 pour les galles sphériques et des teneurs variant de  $1,83 \pm 0,36$  mg Q/g (pour **SCG.8.6**) à  $2,87 \pm 0,50$  mg Q/g (pour **GSC.9.6**) avec une moyenne égale à  $2,37 \pm 0,51$  (mg Q/g) et une étendue de 1,04 pour les galles semi-circulaires. De plus, la quantité de flavonoïdes dans les galles semi-circulaires est six fois plus élevée que celle dans les galles sphériques, ceci a été confirmé par l'étude statistique qui démontre une influence significative de la forme ( $p = 0,0001$ ). En effet, cette constatation a aussi été observée par (**Chelghoum et al., 2021**), où ils ont enregistré une teneur allant de  $0,60 \pm 0,1$  mg Q/g à  $2,14 \pm 0,32$  mg Q/g pour les galles sphériques et une teneur entre  $2,33 \pm 1,12$  mg Q/g et  $3,15 \pm 1,22$  mg Q/g pour les galles semi-circulaires.

### 1.7 Teneurs en tanins condensés totaux

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal. Ils sont localisés dans les écorces, le bois, les racines, les feuilles, les fruits et les galles où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites (**Rhazi, 2015**). L'intérêt d'étudier les tanins condensés réside dans leur potentiel de plus en plus bénéfique pour la santé (**Ben Ahmed et al., 2017**). Les teneurs en TCT des galles récoltées en 2010 comme l'indique le **tableau 10**, sont largement supérieures environ 620 fois par rapport aux flavonoïdes oscillant entre  $409,60 \pm 19,3$  mg C/g (pour **GM10**) et  $661,50 \pm 77,3$  mg C/g (pour **GM09**) avec une moyenne de  $542,77 \pm 30,10$  mg C/g et une étendue de 251,90 pour les galles mâles et allant de  $366,40 \pm 8,9$  mg C/g (pour **GF10**) à  $726,20 \pm 58,6$  mg C/g (pour **GF07**) avec une moyenne de  $536,07 \pm 36,70$  mg C/g et une étendue de 359,80 pour les galles femelles. Il est à noter que le seuil maximal de TCT pour le genre mâle a été atteint au mois de septembre tandis que le genre femelle en mois de juillet. Dans l'ensemble, toutes les teneurs en CPT, flavonoïdes totaux et en tanins condensés des extraits méthanoliques des galles mâles et femelles sont plus élevées en mois de septembre. A l'exception des composés phénoliques et des tanins condensés des galles femelles, qui sont plus élevés en mois de juillet. Cependant, L'ANOVA n'a révélé aucune influence significative du genre et du mois de récolte sur les teneurs en composés phénoliques des galles de *P. atlantica*.

Par ailleurs, les quantités des tanins condensés totaux des galles récoltés en 2016 (**Tableau 11**) sont plus élevées environ 653 fois par rapport aux flavonoïdes compris entre  $257,55 \pm 59,3$  mg C/g (pour **GS.9.3**) et  $708,70 \pm 70,80$  mg C/g (pour **GS.8.5**) avec une moyenne de  $460,39 \pm 27,16$  (mg C/g) et une étendue de 451,15 pour les galles sphériques et allant de  $55,71 \pm 20,7$  mg C/g (pour **GSC.9.6**) à  $124,7 \pm 24,5$  mg C/g (pour **GSC.8.6**) avec une moyenne de  $108,83 \pm 20,68$  (mg C/g) et une étendue de 68,99 pour les galles semi-circulaires. En effet, l'ANOVA a

révélé des différences significatives de TCT ( $p = 0,0001$ ) entre les résultats. De même, les galles sphériques sont 5 fois plus riches en tanins condensés que les galles semi-circulaires. Cette différence a été prouvée par une influence significative de la forme ( $p = 0,0001$ ) et des différents sites de récolte ( $p = 0,011$ ). Il est à noter que le seuil le plus élevé de TCT pour les deux formes a été atteint en août, alors que le plus faible en septembre. En comparant, les résultats obtenus à ceux de (**Chelghoum et al., 2021**), la moyenne de l'ensemble de nos valeurs en TCT est 2 fois plus élevée. L'augmentation relative des écarts types des teneurs en tanins condensés démontre l'hétérogénéité de la composition des composés phénoliques pour un même site (**Guenane, 2017**). De plus, les valeurs en TCT des galles sphériques sont supérieures aux CPT ; cela peut être expliqué par le fait que le test Folin-Ciocalteu utilisé pour quantifier les CPT peut être sensible aux variations de la composition phénolique d'un échantillon, pouvant entraîner une sur- ou sous-estimation des valeurs. Il n'y a aucune méthode qui puisse détecter tous les composés phénoliques. Par conséquent, il est souvent nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes d'analyses spécifiques (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Mais aussi, le choix du standard (catéchine) utilisé peut-être un facteur causant l'augmentation des valeurs de TCT et de préconiser de remplacer le standard par l'acide tannique.

Certaines études sur les galles de différentes variétés de plantes ont été réalisées, rapportant des taux élevés de composés phénoliques en particulier les tanins en raison du développement nécrotique, de la résistance ou bien des réponses hypersensibles aux arthropodes chez certaines plantes (**Abrahamson et al., 1991**). D'après (**Abrahamson et al., 1991**), les galles de *Solidago altissima* formées au niveau de la tige avaient un teneur phénolique 3 à 5 fois supérieur à celle de la tige normale. En comparant nos travaux avec ceux de (**Ben Ahmed et al., 2017**) sur les feuilles de *Pisatcia atlantica* provenant des mêmes arbres de nos galles, nos résultats sont plus importants, en particulier les tannins condensés qui sont environ 103 fois plus élevés. De plus, la variabilité des teneurs en CPT dans nos extraits peut probablement être due aux facteurs génotypiques et édaphiques (**Tahar et al., 2015**). Selon (**Chelghoum et al., 2021**), ces facteurs ont un impact direct sur la biosynthèse des métabolites primaires et secondaires, même s'il y a la variation d'un seul facteur.

**Tableau 10** : Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes totaux (FT) et tanins condensés totaux (TCT) dans les différents extraits des galles de *P. atlantica* récoltés en 2010 et en 2016.

Echantillons (2010)	CPT (mg AG/g)	FT (mg Q/g)	TCT (mg C/g)
GM07	159,80 <sup>e</sup> ± 6,6	0,70 <sup>cd</sup> ± 0,03	600,30 <sup>abc</sup> ± 76,8
GM08	201,11 <sup>b</sup> ± 6,6	0,50 <sup>d</sup> ± 0,06	480,64 <sup>abc</sup> ± 77,1
GM09	256,95 <sup>a</sup> ± 13,5	0,93 <sup>b</sup> ± 0,05	661,50 <sup>ab</sup> ± 77,3
GM10	164,70 <sup>cde</sup> ± 8,3	0,63 <sup>cd</sup> ± 0,04	409,60 <sup>bc</sup> ± 19,3
GM11	248,63 <sup>a</sup> ± 2,7	0,92 <sup>b</sup> ± 0,02	561,60 <sup>abc</sup> ± 83,8
GF07	188,64 <sup>bc</sup> ± 13,8	0,90 <sup>b</sup> ± 0,18	726,20 <sup>a</sup> ± 58,6
GF08	143,25 <sup>e</sup> ± 8,6	0,73 <sup>bc</sup> ± 0,08	515,11 <sup>abc</sup> ± 63,4
GF09	177,50 <sup>bcd</sup> ± 20,2	1,44 <sup>a</sup> ± 0,03	500,94 <sup>abc</sup> ± 67,3
GF10	161,92 <sup>de</sup> ± 4,8	0,72 <sup>bc</sup> ± 0,07	366,40 <sup>c</sup> ± 8,9
GF11	181,40 <sup>bcd</sup> ± 5,8	1,35 <sup>a</sup> ± 0,06	571,80 <sup>abc</sup> ± 80,1
Echantillons (2016)			
GS.8.1	328,61 <sup>a</sup> ± 12,6	0,38 <sup>c</sup> ± 0,01	409,82 <sup>cd</sup> ± 37,6
GS.9.2	156,61 <sup>d</sup> ± 7,2	0,26 <sup>c</sup> ± 0,02	479,93 <sup>bc</sup> ± 10,6
GS.9.3	119,45 <sup>ef</sup> ± 2,4	0,24 <sup>c</sup> ± 0,04	257,55 <sup>ef</sup> ± 59,3
GS.7.4	121,22 <sup>ef</sup> ± 19,2	0,30 <sup>c</sup> ± 0,03	307,37 <sup>de</sup> ± 59,2
GS.8.4	155,19 <sup>d</sup> ± 1,8	0,29 <sup>c</sup> ± 0,03	395,70 <sup>cde</sup> ± 78,5
GS.9.4	113,25 <sup>ef</sup> ± 3,8	0,46 <sup>c</sup> ± 0,1	259,44 <sup>ef</sup> ± 77,2
GS.7.5	243,85 <sup>b</sup> ± 8,8	0,61 <sup>c</sup> ± 0,1	684,61 <sup>a</sup> ± 47,1
GS.8.5	237,13 <sup>b</sup> ± 6,0	0,63 <sup>c</sup> ± 0,1	708,70 <sup>a</sup> ± 70,8
GS.8.6	238,90 <sup>b</sup> ± 1,4	0,54 <sup>c</sup> ± 0,03	514,16 <sup>bc</sup> ± 33,5
GS.9.6	204,74 <sup>c</sup> ± 7,4	0,42 <sup>c</sup> ± 0,1	586,64 <sup>ab</sup> ± 33,1
GSC.7.5	125,91 <sup>e</sup> ± 6,4	2,31 <sup>ab</sup> ± 0,8	114,71 <sup>fg</sup> ± 21,1
GSC.8.5	120,60 <sup>ef</sup> ± 4,3	2,48 <sup>ab</sup> ± 0,7	110,25 <sup>g</sup> ± 19,0
GSC.8.6	122,54 <sup>e</sup> ± 2,8	1,83 <sup>b</sup> ± 0,4	124,70 <sup>fg</sup> ± 24,5
GSC.9.6	103,10 <sup>f</sup> ± 2,5	2,87 <sup>a</sup> ± 0,5	55,71 <sup>g</sup> ± 20,7

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f→g : indiquent des concentrations décroissantes.

### 1.8 Activités antioxydantes

Les propriétés antioxydantes, en particulier la neutralisation des radicaux libres, sont très importantes en raison de leur rôle nocif dans les systèmes biologiques (Peksel *et al.*, 2010). En outre, il a été suggéré qu'un niveau accru de radicaux libres pourrait être l'un des déclencheurs de la résistance à l'insuline (Khacheba *et al.*, 2017, 2014), notamment il pourrait être implication dans les maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie d'Alzheimer (Mongens, 2013). Leur diminution peut être une cible thérapeutique pour le contrôle glycémique (Khacheba *et al.*, 2017, 2014) mais aussi peut freiner les symptômes des troubles cognitifs. Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées, basées sur la capacité de piéger les

radicaux libres synthétiques, en utilisant des méthodes de génération de radicaux pour la détection du point final de l'oxydation (Mandade *et al.*, 2011). La diversité des méthodes analytiques est nécessaire car aucun test ne fournit totalement les informations souhaitées en raison de la complexité des interactions des antioxydants (Ben Ahmed *et al.*, 2020).

Ainsi, l'activité antioxydante des extraits méthanoliques (2010 et 2016) a été estimée par trois méthodes différentes, à savoir les tests DPPH<sup>\*</sup>, FRAP et ABTS<sup>\*\*</sup>, qui sont couramment utilisés dans les échantillons biologiques. Le test FRAP est basé uniquement sur le transfert d'électron, tandis que les deux tests DPPH<sup>\*</sup> et ABTS<sup>\*\*</sup> sont basés sur le transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène des antioxydants aux radicaux (Li *et al.*, 2018). Le choix de l'expression de la capacité antioxydante en équivalent d'un antioxydant standard tel que l'acide ascorbique permet de comprendre le potentiel d'un extrait végétal par rapport à celui d'antioxydant connu (Apak *et al.*, 2016). La valeur la plus élevée correspond à l'activité la plus forte. Autrement dit, la valeur obtenue est la quantité de composés naturels capables de neutraliser les radicaux libres. Il est donc recommandé d'exprimer l'activité antioxydante en unités d'antioxydant connu (Ben-Ahmed *et al.*, 2016), qui est définie comme : la concentration en mM ou mg/ml de l'échantillon étudié possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM ou 1 mg/ml de l'antioxydant de référence (acide ascorbique).

Les activités antioxydantes des extraits méthanoliques des galles récoltées en 2010 sont indiqués dans le **tableau 11** et représentés dans la **figure 69**. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement afin de vérifier les différences significatives et d'évaluer les influences possibles des facteurs étudiés (le genre et le mois de récolte). Concernant les résultats du test DPPH ont varié de  $129,14 \pm 20$  mg AA/g (pour **GM11**) à  $227,01 \pm 17$  mg AA/g (pour **GM07**) avec une moyenne égale à  $193,60 \pm 15$  mg AA/g et une étendue de 97,90 pour les galles mâles et des teneurs allant de  $122,31 \pm 14$  mg AA/g (pour **GF11**) à  $159,12 \pm 21$  mg AA/g (pour **GF08**) avec une moyenne égale à  $137,40 \pm 16,02$  mg AA/g et une étendue de 36,80 pour les galles femelles. D'après l'analyse ANOVA à un facteur, les résultats ont montré que le genre a eu un effet significatif sur la DPPH des galles de *P. atlantica* ( $p=0,019$ ). On peut donc déduire que le piégeage du radical DPPH par les extraits semblent se comporter différemment chez les deux genres.

Pour le test FRAP, les résultats ont fluctué de  $229,34 \pm 21$  mg AA/g (pour **GM10**) à  $433,92 \pm 13$  mg AA/g (pour **GM09**) avec une moyenne égale à  $296,05 \pm 15,90$  mg AA/g et une étendue de 204,60 pour les galles mâles et des teneurs oscillant entre  $193,10 \pm 19$  mg AA/g (pour **GF08**)

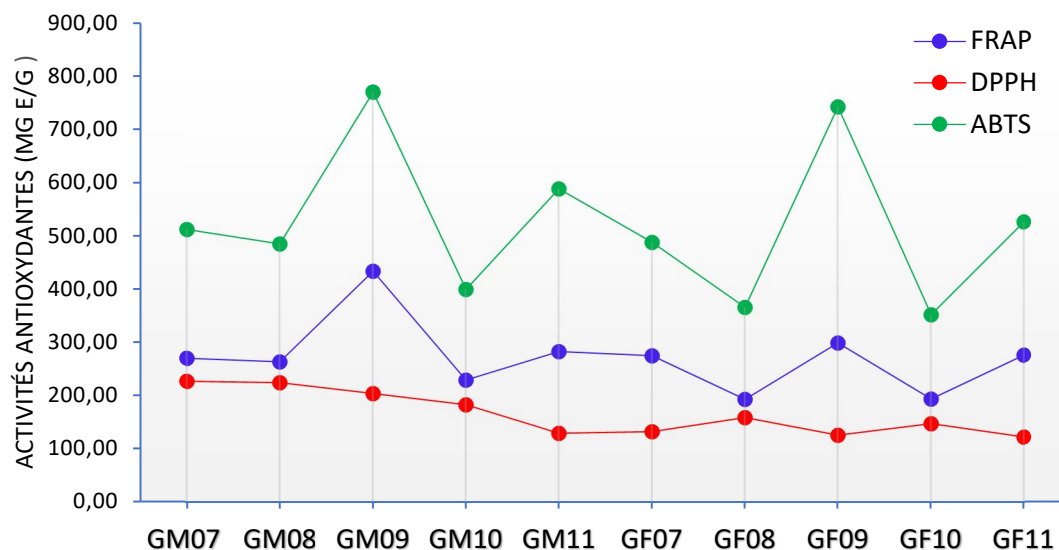
et  $299,30 \pm 19$  mg AA/g (pour **GF09**) avec une moyenne égale à  $247,40 \pm 13,92$  mg AA/g et une étendue de 106,20 pour les galles femelles. L'ANOVA à un facteur a identifiée une influence significative de mois de récoltes ( $p=0,024$ ) sur les résultats du pouvoir réducteur. Ainsi, les échantillons de mois de septembre sont significativement plus élevés par rapport aux autres.

Les résultats du test ABTS<sup>++</sup> indiquent que les galles mâles ont varié de  $399,70 \pm 95$  mg T/g (pour **GM10**) à  $770,63 \pm 16$  mg T/g (pour **GM09**) avec une moyenne de  $551,42 \pm 36,91$  (mg T/g) et une étendue de 370,94. Tandis que, chez les galles femelles, les valeurs ont été comprises entre  $352,32 \pm 18$  mg T/g (pour **GF10**) et  $742,82 \pm 18$  mg T/g (pour **GF09**) avec une moyenne de  $495,32 \pm 64,26$  (mg T/ g) et une plage de 390,50. Les extraits de mois de septembre ont été significativement plus élevés par rapport aux autres, confirmés par l'ANOVA à un facteur ( $p=0,013$ ). De plus, la capacité à piéger l'ABTS<sup>++</sup> a été plus élevée que celle des tests DPPH\* et FRAP. Cette différence peut être due à la présence d'antioxydants qui peuvent réagir sélectivement avec les radicaux ABTS<sup>++</sup>. Également, les galles mâles semblent avoir une capacité antioxydante plus élevée que les galles femelles.

**Tableau 11** : Activités antioxydantes des extraits méthanoliques de galles de *P. atlantica* récoltées en 2010.

Echantillons	DPPH (mg AA/g)	FRAP (mg AA/g)	ABTS (mg T/g)
<b>GM07</b>	227,01 <sup>a</sup> ±17	270,12 <sup>bc</sup> ±24	512.15 <sup>cd</sup> ±48
<b>GM08</b>	224,70 <sup>a</sup> ±23	263,90 <sup>bc</sup> ±10	485.50 <sup>cd</sup> ±55
<b>GM09</b>	203,90 <sup>ab</sup> ±18	433,92 <sup>a</sup> ±13	770.63 <sup>a</sup> ±16
<b>GM10</b>	183,10 <sup>abc</sup> ±14	229,34 <sup>cd</sup> ±21	399.70 <sup>cd</sup> ±95
<b>GM11</b>	129,14 <sup>d</sup> ±20	283,00 <sup>bc</sup> ±16	589.20 <sup>abc</sup> ±24
<b>GF07</b>	132,10 <sup>cd</sup> ±16	274,90 <sup>bc</sup> ±31	488.30 <sup>cd</sup> ±98
<b>GF08</b>	159,12 <sup>bcd</sup> ±21	193,10 <sup>d</sup> ±19	366.22 <sup>cd</sup> ±65
<b>GF09</b>	126,00 <sup>d</sup> ±13	299,30 <sup>b</sup> ±19	742.82 <sup>ab</sup> ±18
<b>GF10</b>	147,50 <sup>cd</sup> ±18	193,51 <sup>d</sup> ±24	352.32 <sup>d</sup> ±81
<b>GF11</b>	122,31 <sup>d</sup> ±14	276,24 <sup>bc</sup> ±5	527.00 <sup>bcd</sup> ±148

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d: indiquent des concentrations décroissantes. Abréviations : DPPH\* : 2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl ; FRAP : Ferric reducing antioxidant power ; ABTS<sup>++</sup> : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate).



**Figure 69** : Les activités antioxydantes (DPPH, FRAP et ABTS) des extraits méthanoliques de galles de *P. atlantica* récoltées en 2010.

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* collectés en 2016 a été déterminée et présentée dans le **tableau 12** et la **figure 70**. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement afin de vérifier les différences significatives et d'évaluer les influences possibles des facteurs étudiés (la forme, le site et le mois de récolte).

**Tableau 12** : Activités antioxydantes des extraits méthanoliques et hexaniques des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

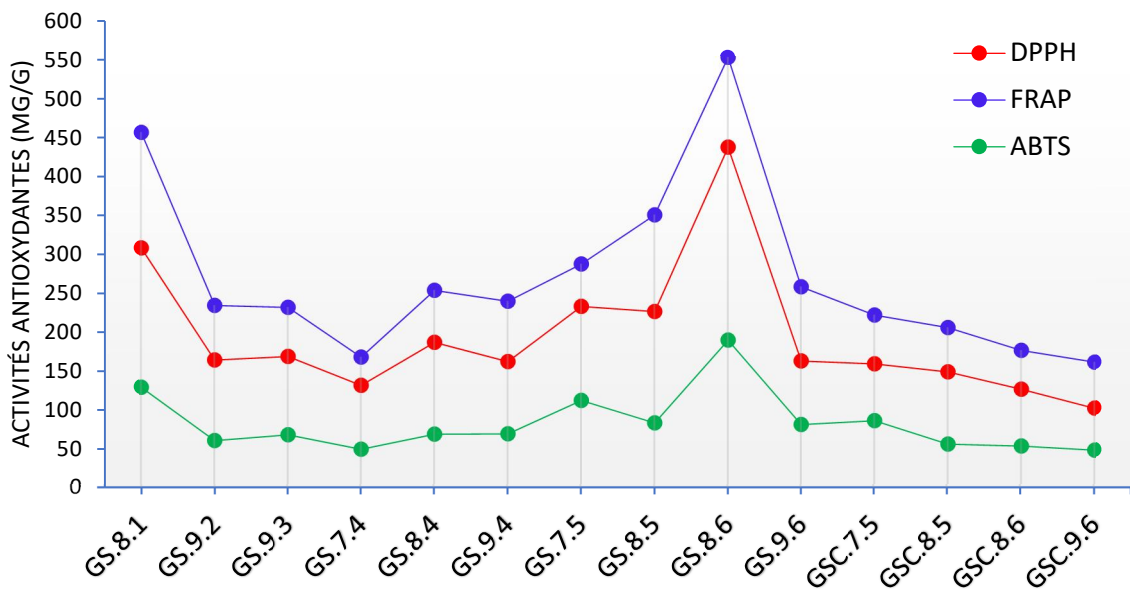
Echantillons	Extraits méthanoliques			DPPH* des extraits hexaniques	
	DPPH* (mg AA /g)	FRAP (mg AA /g)	ABTS** (mg T /g)	ELB (µg T /g)	FI (µg T /g)
<b>GS.8.1</b>	308,50 <sup>b</sup> ± 62,90	456,80 <sup>b</sup> ±7,7	129,93 <sup>b</sup> ±10,4	2,93 <sup>h</sup> ±0,20	11,50 <sup>ab</sup> ±1,30
<b>GS.9.2</b>	164,93 <sup>cd</sup> ± 24,00	235,14 <sup>ef</sup> ±9,0	61,92 <sup>d</sup> ±16,3	4,40 <sup>f</sup> ±0,20	7,20 <sup>de</sup> ±1,10
<b>GS.9.3</b>	169,73 <sup>cd</sup> ± 20,30	232,45 <sup>ef</sup> ±14,0	69,12 <sup>cd</sup> ±8,7	5,10 <sup>e</sup> ±0,20	10,63 <sup>abc</sup> ±0,50
<b>GS.7.4</b>	132,50 <sup>d</sup> ± 22,20	168,60 <sup>gh</sup> ±10,4	50,50 <sup>d</sup> ±16,0	4,34 <sup>f</sup> ±0,10	9,30 <sup>abcd</sup> ±0,10
<b>GS.8.4</b>	187,81 <sup>cd</sup> ± 16,60	254,35 <sup>de</sup> ±3,9	70,20 <sup>cd</sup> ±19,3	3,50 <sup>gh</sup> ±0,50	9,40 <sup>abcd</sup> ±0,80
<b>GS.9.4</b>	162,90 <sup>cd</sup> ± 10,70	240,20 <sup>ef</sup> ±12,0	70,60 <sup>cd</sup> ±6,1	7,50 <sup>cd</sup> ±0,20	6,93 <sup>de</sup> ±1,10
<b>GS.7.5</b>	233,74 <sup>bc</sup> ± 51,50	288,00 <sup>cd</sup> ±27,5	113,04 <sup>bc</sup> ±15,9	5,93 <sup>e</sup> ±0,20	7,90 <sup>cd</sup> ±1,60
<b>GS.8.5</b>	227,30 <sup>bc</sup> ± 30,50	315,20 <sup>c</sup> ±23,6	84,40 <sup>bcd</sup> ±17,8	8,04 <sup>bc</sup> ±0,03	7,81 <sup>cd</sup> ±1,30
<b>GS.8.6</b>	437,80 <sup>a</sup> ± 44,20	553,20 <sup>a</sup> ±5,4	190,45 <sup>a</sup> ±32,3	1,91 <sup>i</sup> ±0,10	3,20 <sup>f</sup> ±0,80
<b>GS.9.6</b>	163,73 <sup>cd</sup> ± 24,30	258,80 <sup>de</sup> ±17,6	82,47 <sup>bcd</sup> ±10,0	3,90 <sup>fg</sup> ±0,20	4,00 <sup>ef</sup> ±1,50
<b>GSC.7.5</b>	160,04 <sup>bcd</sup> ± 16,90	222,70 <sup>ef</sup> ±19,8	87,10 <sup>bcd</sup> ±11,3	7,81 <sup>bcd</sup> ±0,10	7,54 <sup>cd</sup> ±0,40
<b>GSC.8.5</b>	149,80 <sup>bcd</sup> ± 9,30	206,60 <sup>fg</sup> ±11,0	57,10 <sup>d</sup> ±18,6	8,24 <sup>b</sup> ±0,10	8,33 <sup>bcd</sup> ±0,60
<b>GSC.8.6</b>	127,60 <sup>d</sup> ± 7,70	177,41 <sup>gh</sup> ±14,1	54,73 <sup>d</sup> ±15,8	7,20 <sup>d</sup> ±0,30	12,00 <sup>a</sup> ±1,00
<b>GSC.9.6</b>	103,13 <sup>d</sup> ± 12,10	162,35 <sup>h</sup> ±8,8	49,51 <sup>d</sup> ±6,2	9,91 <sup>a</sup> ±0,30	10,80 <sup>abc</sup> ±1,80

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f→g→h→i: indiquent des concentrations décroissantes. Abréviations : ELB : Extrait lipidique brute ; FI : fraction insaponifiable.

Pour le piégeage des radicaux DPPH\*, les galles sphériques ont eu une moyenne de 218,90 ± 28,92 mg AA/g (valeurs entre 132,50 ± 22,20 mg AA/g (pour **GS.7.4**) et 437,80 ± 44,20 mg AA/g (pour **GS.8.6**)) et une étendue de 305,3. De plus, les galles semi-circulaires ont enregistré une moyenne de 135,14 ± 10,92 mg AA/g (valeurs comprises entre 103,13 ± 12,10 mg AA/g (pour **GSC.9.6**) et 160,04 ± 16,90 mg AA/g (pour **GSC.7.5**)) et une étendue de 56,91. D'après les résultats, la quantité d'antioxydants dans les galles sphériques est proportionnelle à l'altitude et deux fois plus riche que celle des galles semi-circulaires.

En ce qui concerne le test FRAP, le pouvoir réducteur dans les galles sphériques ont fluctué de 168,60 ± 10,40 mg AA/g (pour **GS.7.4**) à 553,20 ± 5,40 mg AA/g (pour **GS.8.6**) avec une moyenne de 300,30 ± 6,82 (mg AA/g) et une étendue de 384,60. Alors que, dans les galles semi-circulaires, les valeurs ont été comprises de 162,35 ± 8,80 mg AA/g (pour **GSC.9.6**) à 222,70 ± 20 mg AA/g (pour **GSC.7.5**) avec une moyenne de 192,25 ± 12,3 (mg AA/g) et une étendue de 60,35. Parmi l'ensemble des extraits, la valeur la plus élevée a été enregistrée chez les galles sphériques en août. Le pouvoir réducteur des galles sphériques a été significativement plus élevés ( $p=0,05$ ) que celui des galles semi-circulaires (2 fois).

Pour le test ABTS<sup>+</sup>, les galles sphériques ont présenté une moyenne de  $92,30 \pm 13,4$  mg T/g (valeurs comprises entre  $50,50 \pm 16,00$  mg T/g (pour **GS.7.4**) et  $190,45 \pm 32,30$  mg T/g (pour **GS.8.6**)) et une étendue de 139,15. De plus, les galles semi-circulaires ont enregistré une moyenne de  $62,09 \pm 11,9$  mg T/g (valeurs comprises entre  $49,51 \pm 6,20$  mg T/g (pour **GSC.9.6**) et  $87,10 \pm 11,30$  mg T/g (pour **GSC.7.5**)) et une étendue de 37,60. Selon les résultats, la quantité d'antioxydants dans les galles sphériques a été deux fois plus élevée que celle des galles semi-circulaires.

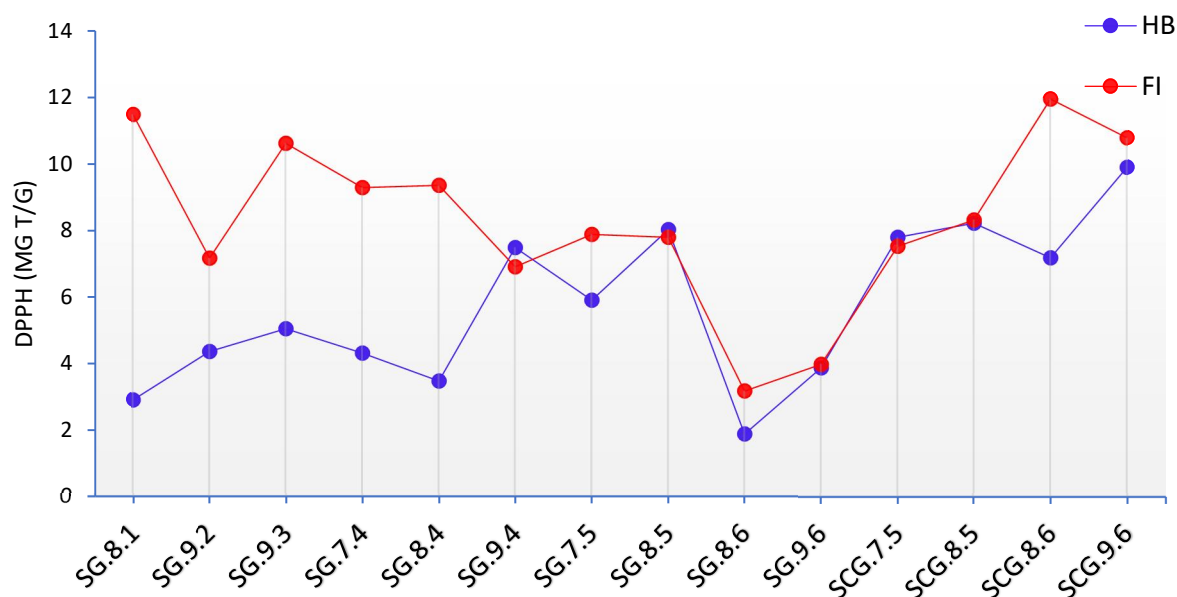


**Figure 70** : Les activités antioxydantes (DPPH, FRAP et ABTS) des extraits méthanoliques de galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

En comparant les résultats des extraits méthanoliques des deux années (2010 et 2016), les galles collectées en 2016 ont présenté des valeurs en CPT, FT, TCT et les activités antioxydantes (DPPH<sup>•</sup> et FRAP) plus élevées à l'exception du test ABTS<sup>+</sup>. Ce dernier peut être expliqué par le fait que les galles de 2016 ont été délipidées avant de réaliser une extraction méthanolique, déminuant ainsi les molécules bioactives ayant une affinité plus élevée à neutraliser le radical ABTS<sup>+</sup>.

Les résultats des extraits lipidiques sont mentionnés dans le **tableau 12** et présenté dans la **figure 71** ; les moyennes de l'activité antioxydante DPPH des extraits lipidiques brutes et des fractions insaponifiables des galles sphériques ont été de  $4,72 \pm 0,16$  µg T/g (valeurs comprises entre  $1,91 \pm 0,10$  µg T/g (pour **GS.8.6**) et  $8,04 \pm 0,03$  µg T/g (pour **GS.8.5**)) et de  $7,80 \pm 0,90$  µg T/g (valeurs comprises entre  $3,20 \pm 0,80$  µg T/g (pour **GS.8.6**) et  $11,5 \pm 1,30$  µg T/g (pour **GS.8.1**)), respectivement. Alors que les moyennes d'activité antioxydante des extraits lipidiques

brutes et des fractions insaponifiables des galles semi-circulaires ont été de  $8,29 \pm 0,01 \mu\text{g T/g}$  (valeurs comprises entre  $7,20 \pm 0,30 \mu\text{g T/g}$  (pour **GSC.8.6**) et  $9,91 \pm 0,30 \mu\text{g T/g}$  (pour **GSC.9.6**)) et de  $9,70 \pm 0,73 \mu\text{g T/g}$  (valeurs comprises entre  $7,54 \pm 0,40 \mu\text{g T/g}$  (pour **GSC.7.5**) et  $12,00 \pm 1,00 \mu\text{g T/g}$  (pour **GSC.8.6**)), respectivement. Les résultats obtenus montrent clairement que l'activité antioxydante des ELB est plus faible que celle de la FI, ce qui démontre que cette dernière contient des antioxydants naturels. L'activité antioxydante des extraits lipidiques brutes des galles semi-circulaires a été deux fois plus élevée que celle des galles sphériques. De plus, les résultats des fractions insaponifiables des galles sphériques sont inversement proportionnels à l'altitude. Les valeurs les plus élevées pour les deux types d'extrait (méthanolique et hexanique) ont été enregistrées majoritairement en août. Selon (**Ben-Ahmed et al., 2016**), la différence des valeurs de l'activité antioxydante dans l'ensemble des extraits peut être due à plusieurs facteurs qui affectent la production et la stabilité des antioxydants, tels que la localisation, la période de récolte (bien que dans le cas des échantillons 2016, ces deux facteurs n'ont pas été significatives), les conditions météorologiques et les structures moléculaires des composés antioxydants. En effet, certaines molécules de faible poids moléculaire ont une meilleure capacité à accéder au site radicalaire.



**Figure 71** : Le test DPPH des extraits lipidiques brutes (ELB) et de la fraction insaponifiable (FI) des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

Tous les extraits des galles de *Pistacia atlantica* ont montré un effet positif à piéger les radicaux libres et peuvent être utilisés comme source d'antioxydants naturels. Toutefois, les composés ayant la capacité de neutraliser le radical DPPH<sup>\*</sup> dans les extraits méthanoliques ont

été environ 30000 fois plus élevés par rapport à ceux dans les extraits lipidiques. En outre, Plusieurs études (Ahmed *et al.*, 2015; Ben-Ahmed *et al.*, 2016; Guenane, 2017; Maamri, 2008; Toul *et al.*, 2017) sur les différentes parties de la plante *Pistacia atlantica* (feuilles, fruits et bourgeons) ont rapportées sur sa richesse en composés phénoliques et leur rôle majeur dans le piégeage des radicaux libres. Ainsi que la confirmation que ces composés phénoliques ont été de puissants antioxydants, donneurs d'hydrogène grâce à leurs groupements hydroxyles (Cherbi *et al.*, 2016; Khacheba *et al.*, 2014; Tahar *et al.*, 2015; Toul *et al.*, 2017). D'après (Ben Ahmed *et al.*, 2017), les différences dans les résultats des dosages d'antioxydants pourraient être dues à la présence de composés ayant des affinités différentes pour neutraliser les radicaux DPPH•, ABTS<sup>•+</sup> ou réduire le Fe<sup>3+</sup>. Enfin, il apparaît que certains travaux sur les extraits lipidiques (Bentireche *et al.*, 2019; Maamri, 2008; Shad *et al.*, 2012) se sont rejoints sur le fait que le piégeage du radical DPPH• peut être attribué aux phytostérols totaux, tocophérols totaux, caroténoïdes, et d'autres composés lipidiques polaires. De plus, les tocophérols sont généralement les molécules les plus antioxydantes dans les huiles végétales (Bentireche *et al.*, 2019; Shad *et al.*, 2012).

### 1.9 Profils chromatographiques des composés phénoliques (récoltés en 2010)

L'analyse qualitative des composés phénoliques dans les extraits des galls de *P. atlantica* été réalisée par UPLC-ESI-QTOF-MS. Différentes valeurs d'énergie de collision ont été appliquées à chaque constituant afin d'acquérir des spectres de masse avec divers degrés de fragmentation à partir de l'ion précurseur et ainsi d'obtenir autant d'informations structurales que possible. Une tentative d'identification et caractérisation, nous a permis d'identifier cinq composés phénoliques, nous rappelons que le chromatogramme obtenu contient plus de 13 composés phénoliques. Toutes les données analytiques obtenues pour les composés identifiés sont répertoriées dans le **tableau 13**, y compris leurs temps de rétention, les absorptions UV maximales et le schéma de fragmentation. Le spectre de balayage complet des ions obtenus est illustré dans l'**annexe 03**.

**Tableau 13** : Données UPLC-ESI-QTOF-MS pour les composés phénoliques identifiés pour l'extrait analysé de galles de *P. atlantica*.

Molécules identifiées	Formule	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	(m/z)	UV (nm)
Acide quinique	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1,16	191	171, 127, 109, 93,85	272
Methyl gallate	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	3,12	183	169, 124,78	272
Acide digalloylquinique	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	3,39	495	343, 325, 191,161	274
Methyl digallate	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	8,61	335	183,168,124	278
Acide valoneique dilactone	C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	9,2	469	169,125,232	280

t<sub>R</sub>: Temps de rétention.

Le **composé 1** a montré une valeur m/z de 191 et une formule moléculaire de C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. Il a été identifié comme étant de l'acide quinique. Le schéma de fragmentation a montré la présence d'ions à m/z 173[-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 155 [-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 127 [-CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup> et 111 [-CO<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>. Le même schéma de fragmentation a également été observé par (Bastos *et al.*, 2019). Pour le **composé 3**, il a été identifié comme étant l'acide digalloylquinique en raison des pertes séquentielles d'une moitié galloyl (152 Da). Ce composé a été caractérisé par ion pseudo-moléculaire déprotoné à m/z 495. L'ion de fragmentation à m/z 343 a fourni d'autres fragments, tels que m/z 191, lié à l'élimination d'un groupe galloyle [M-152-H]<sup>-</sup> et le fragmentat correspondant à m/z 169, correspondant à l'élimination de l'acide quinique avec formation d'acide gallique déprotoné. Des composés avec différents degrés d'acides galloylquiniques ont également été signalés dans d'autres parties végétales de *P. atlantica*, ainsi que dans d'autres espèces de la même famille *Anacardiaceae*, telles que *P. lentiscus* (Abu-Reidah *et al.*, 2015; Ben-Ahmed *et al.*, 2016).

Le **composé 2** a présenté un m/z de 183 avec une formule moléculaire de C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>. Il a été identifié comme étant le gallate de méthyle. Le schéma de fragmentation a montré la présence d'ions à m/z 168 et à m/z 124. Le premier résulte de la perte d'un radical méthyle [M-H-15]<sup>-</sup> et le second correspond à l'élimination supplémentaire de CO<sub>2</sub> [M-H-44]<sup>-</sup>. Le méthyle de gallate est un dérivé de l'acide hydroxybenzoïque et il a été rapporté qu'il est un des constituants des feuilles de *P. atlantica* (Ben-Ahmed *et al.*, 2016).

Le **composé 4** a présenté un ion parent [M-H]<sup>-</sup> à m/z 335 avec des ions de fragments majeurs à m/z 183, à m/z 168 et à m/z 124, suggérant la présence d'une fraction gallate de méthyle. Sur la base de ces données, ce composé a été identifié comme un isomère de digallate de méthyle (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2017).

Le **composés 5** avec [M-H]<sup>-</sup> 469 a montré un fragment principal à m/z 169, c'est-à-dire une fraction galloyle. De plus, une perte de 300 Da qui correspond à une fraction de l'acide

ellagique. Ce composé a donc été identifié comme étant l'acide valonéique dilactone (Hatamnia *et al.*, 2014; Wyrepkowski *et al.*, 2014).

Les cinq composés identifiés peuvent être répartis en trois groupes structurellement apparentés, à savoir les dérivés estérifiés de l'acide gallique (Pics 2 et 4), les dérivés de l'acide quinique (Pics 1 et 3) et l'ellagitanin (Pic 5).

La comparaison du profil des composés phénoliques des extraits méthanoliques de galles de *P. atantica* dans cette étude avec celui des feuilles et des fruits de la même espèce, dans des études précédentes, a montré une variation. En effet, l'étude réalisée par (Amiri *et al.*, 2018) sur l'extrait méthanolique des fruits et des feuilles a identifié à l'aide d'UPLC-MS les composés suivants : la rutine, l'acide caféique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, l'acide syringique, l'acide férulique et l'acide sinapique dans les fruits. Tandis que la présence de dérivés d'acide gallique et de flavonoïdes glycosylés, de rutine, de quercétine et d'hétérosides dans les feuilles. De plus, (Ben-Ahmed *et al.*, 2016) ont identifié la glucogalline, l'acide galloylquinique, l'acide gentisique, l'acide galloylshikimique, l'acide digallique, le trigalloylglucose, le tétragalloylglucose et l'acide tétragalloylquinique dans la fraction acétate d'éthyle d'un extrait hydro-acétonique des feuilles. Ces composés phénoliques n'ont pas été détectés dans nos extraits analysés. Cependant, l'acide valonéique dilactone et le méthyle digallate ont été trouvés dans les galles mais pas dans les études citées au-dessus.

## 1.10 Tests d'inhibition enzymatique

### 1.10.1 Inhibition de l'activité $\alpha$ -Amylase (IAA)

Les paramètres cinétiques de  $\alpha$ -amylase fongique ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) ont été déterminés selon l'équation en double inverse de Line weaver Burk  $1/V_0 = f(1/S_0)$  et les données sont démontrés dans le tableau suivant.

**Tableau 14** : les paramètres cinétiques de  $\alpha$ 'amylase d'*Aspergillus oryzae*.

Paramètres	$K_m$ (mg/ml)	$V_{max}$ (mM/min)
Valeurs	$5,16 \pm 1,05$	$0,37 \pm 0,05$

L'une des stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement du diabète consiste à réduire l'hyperglycémie post-prandiale. Cela se fait en inhibant les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des glucides, telles que l' $\alpha$ -amylase. Cette dernière est impliquée dans la décomposition de l'amidon en disaccharides et oligosaccharides, avant que l' $\alpha$ -glucosidase intestinale ne catalyse la dégradation des disaccharides en glucose, qui est ensuite absorbé dans la circulation sanguine (Boussoussa *et al.*, 2018).

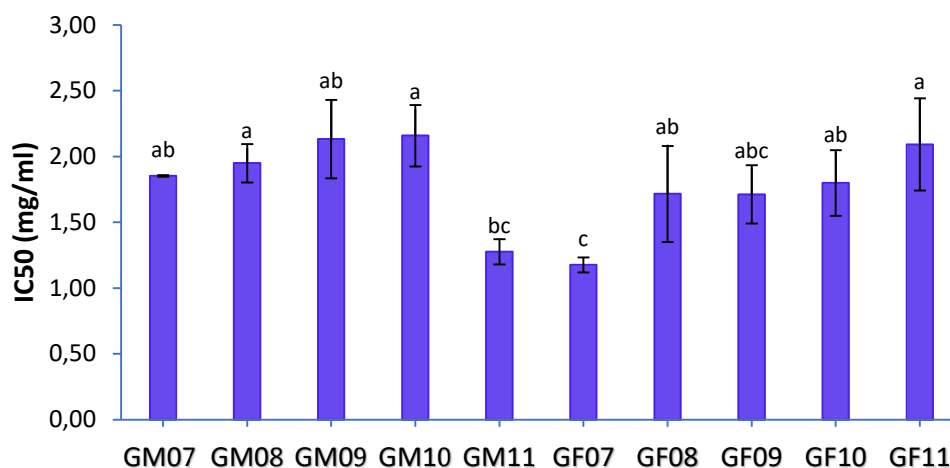
L'étude *in vitro* sur l'inhibition de  $\alpha$ -amylase a montré que les dix extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* de l'année 2010 présentent une activité inhibitrice. Le **tableau 15** et la **figure 72** regroupent l'ensemble des résultats exprimés en IC50 (concentration en mg/ml qui inhibe 50%, sachant que les valeurs de IC50 les moins élevées ont une efficacité plus élevée).

**Tableau 15** : Les concentrations inhibant 50% de l'activité  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* collectés en 2010.

Echantillons	IC50 (mg/ml)
<b>MG07</b>	1,85 <sup>ab</sup> ± 0,006
<b>MG08</b>	1,95 <sup>a</sup> ± 0,14
<b>MG09</b>	1,80 <sup>ab</sup> ± 0,68
<b>MG10</b>	2,16 <sup>a</sup> ± 0,23
<b>MG11</b>	1,28 <sup>bc</sup> ± 0,10
<b>FG07</b>	1,18 <sup>c</sup> ± 0,06
<b>FG08</b>	1,72 <sup>ab</sup> ± 0,36
<b>FG09</b>	1,71 <sup>abc</sup> ± 0,22
<b>FG10</b>	1,80 <sup>ab</sup> ± 0,25
<b>FG11</b>	2,09 <sup>a</sup> ± 0,35

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c: indiquent des concentrations décroissantes.

Les résultats sur l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase ont fluctué de  $1,28 \pm 0,10$  mg/ml (pour **GM11**) à  $2,16 \pm 0,23$  mg/ml (pour **GM10**) avec une moyenne de  $1,81 \pm 0,21$  mg/ml et une étendue de 0,88 pour les galles mâles et de  $1,18 \pm 0,06$  mg/ml (pour **GF07**) à  $2,09 \pm 0,35$  mg/ml (pour **GF11**) avec une moyenne de  $1,70 \pm 0,20$  et une étendue de 0,92 mg/ml pour les galles femelles. Ces dernières récoltées en mois de juillet ont révélé une meilleure inhibition contre  $\alpha$ -amylase et en mois de novembre pour les galles mâles. De plus, l'analyse ANOVA n'a pas révélée une influence significative ni par rapport au mois de récolte, ni le genre sur la concentration d'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -amylase.



**Figure 72** : Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* collectés en 2010.

Concernant les extraits méthanoliques et les extraits hexaniques des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016 ont également présenté une activité inhibitrice. Le **tableau 16** ainsi que la **figure 73** résument tous les résultats exprimés en IC50. Ces valeurs sont plus faibles par rapport au médicament utilisé comme référence, donc une efficacité plus élevée. Les analyses de variance indiquent qu'il existe des différences significatives ( $p = 0,001$ ) entre les différents extraits.

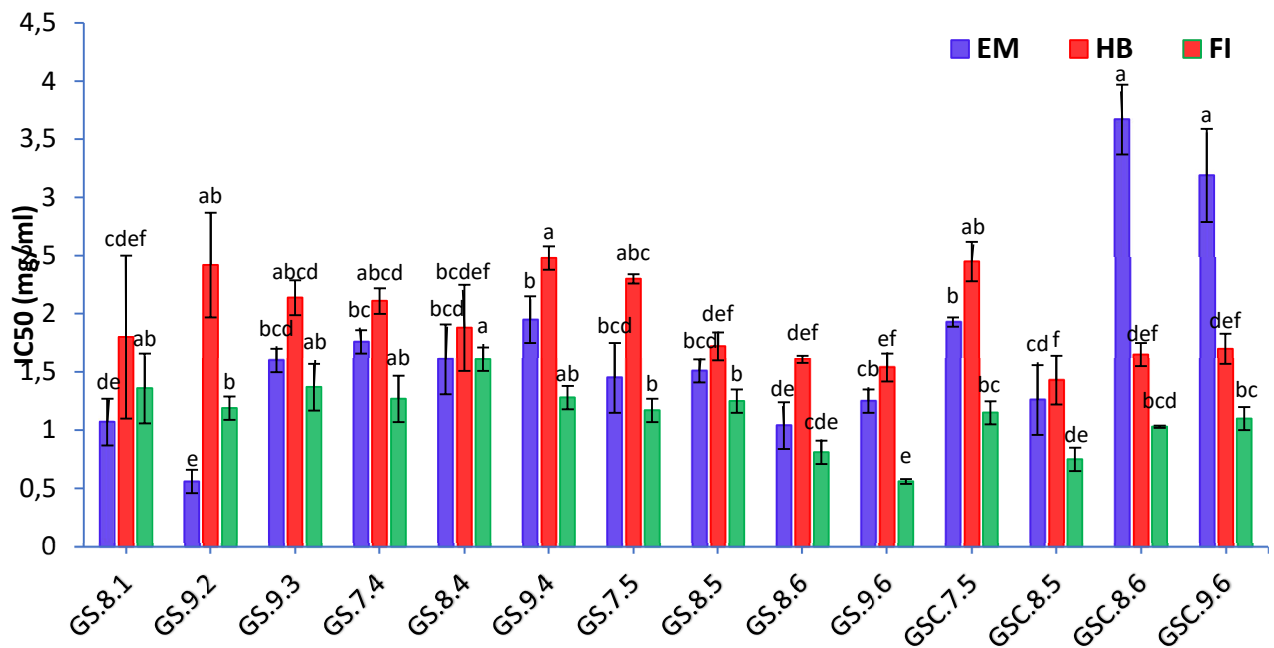
**Tableau 16** : Les concentrations inhibant 50% de l'activité  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques et hexaniques des galles de *P. atlantica* collectés en 2016.

Echantillons	IC50 (mg/ml)		
	Extraits méthanoliques	Extraits hexaniques	
		ELB	FI
<b>GS.8.1</b>	1,07 <sup>de</sup> ± 0,20	1,80 <sup>cdef</sup> ± 0,70	1,36 <sup>ab</sup> ± 0,30
<b>GS.9.2</b>	0,56 <sup>e</sup> ± 0,10	2,42 <sup>ab</sup> ± 0,45	1,19 <sup>b</sup> ± 0,10
<b>GS.9.3</b>	1,60 <sup>bcd</sup> ± 0,10	2,14 <sup>abcd</sup> ± 0,15	1,37 <sup>ab</sup> ± 0,20
<b>GS.7.4</b>	1,76 <sup>bc</sup> ± 0,10	2,11 <sup>abcd</sup> ± 0,11	1,27 <sup>ab</sup> ± 0,20
<b>GS.8.4</b>	1,61 <sup>bcd</sup> ± 0,30	1,88 <sup>bcd</sup> ± 0,37	1,61 <sup>a</sup> ± 0,10
<b>GS.9.4</b>	1,95 <sup>b</sup> ± 0,20	2,48 <sup>a</sup> ± 0,10	1,28 <sup>ab</sup> ± 0,10
<b>GS.7.5</b>	1,45 <sup>bcd</sup> ± 0,30	2,30 <sup>abc</sup> ± 0,04	1,17 <sup>b</sup> ± 0,10
<b>GS.8.5</b>	1,51 <sup>bcd</sup> ± 0,10	1,72 <sup>def</sup> ± 0,12	1,25 <sup>b</sup> ± 0,10
<b>GS.8.6</b>	1,04 <sup>de</sup> ± 0,20	1,61 <sup>def</sup> ± 0,03	0,81 <sup>cde</sup> ± 0,10
<b>GS.9.6</b>	1,25 <sup>cd</sup> ± 0,10	1,54 <sup>ef</sup> ± 0,12	0,56 <sup>e</sup> ± 0,02
<b>GSC.7.5</b>	1,93 <sup>b</sup> ± 0,04	2,45 <sup>ab</sup> ± 0,17	1,15 <sup>bc</sup> ± 0,10
<b>GSC.8.5</b>	1,26 <sup>cd</sup> ± 0,30	1,43 <sup>f</sup> ± 0,21	0,75 <sup>de</sup> ± 0,10
<b>GSC.8.6</b>	3,67 <sup>a</sup> ± 0,30	1,65 <sup>def</sup> ± 0,10	1,03 <sup>bcd</sup> ± 0,01
<b>GSC.9.6</b>	3,19 <sup>a</sup> ± 0,40	1,70 <sup>def</sup> ± 0,13	1,10 <sup>bc</sup> ± 0,10
<b>Gluconova</b>	9,37 ± 0,80	-	-

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f: indiquent des concentrations décroissantes. Abréviations : ELB : extrait lipidique brute ; FI : fraction insaponifiable.

Les valeurs de IC50 des extraits méthanoliques ont varié de  $0,56 \pm 0,10$  mg/ml (pour **GS.9.2**) à  $1,95 \pm 0,20$  mg/ml (pour **GS.9.4**) avec une moyenne de  $1,38 \pm 0,09$  mg/ml pour les galles sphériques et de  $1,26 \pm 0,30$  mg/ml (pour **GSC.8.5**) à  $3,67 \pm 0,30$  mg/ml (pour **GSC.8.6**) avec une moyenne de  $2,51 \pm 0,12$  mg/ml pour les galles semi-circulaires. Les résultats obtenus à partir des extraits hexaniques ont montré qu'ils ont varié d'un extrait à l'autre. En effet, les valeurs IC50 des extraits lipidiques brutes ont été comprises entre  $1,54 \pm 0,12$  mg/ml (pour **GS.9.6**) et  $2,48 \pm 0,10$  mg/ml (pour **GS.9.4**) avec une moyenne de  $2,00 \pm 0,02$  mg/ml pour les galles sphériques et entre  $1,43 \pm 0,21$  mg/ml (pour **GSC.8.5**) et  $2,45 \pm 0,17$  mg/ml (pour **GSC.7.5**) avec une moyenne de  $1,81 \pm 0,13$  mg/ml pour les galles semi-circulaires. Aussi, la moyenne des IC50 des fractions insaponifiables pour les galles sphériques a été de  $1,19 \pm 0,03$  mg/ml (valeurs oscillant de  $0,56 \pm 0,02$  mg/ml (pour **GS.9.6**) à  $1,61 \pm 0,10$  mg/ml (pour **GS.8.4**)) contre une moyenne de  $1,01 \pm 0,04$  mg/ml (valeurs variant de  $0,75 \pm 0,10$  mg/ml (pour **GSC.8.5**) à  $1,15 \pm 0,1$  mg/ml (pour **GSC.7.5**)) pour les galles semi-circulaires. Toutes les valeurs IC50 des échantillons de la fraction insaponifiable ont été inférieures à celles des extraits lipidiques brutes, donc plus efficaces. Ce qui démontre que les molécules constituant la

fraction insaponifiable sont responsables de l'inhibition d' $\alpha$ -amylase. Les extraits méthanoliques et lipidiques des galles sphériques récoltées en septembre ont révélé une meilleure inhibition. Cependant, pour les galles semi-circulaires, la meilleure inhibition a été enregistrée en août. En comparant l'ensemble de nos résultats à ceux de (Chelghoum *et al.*, 2021) sur les extraits méthanoliques des galles, ces derniers ont obtenu des valeurs de IC50 entre  $0,77 \pm 0,06$  mg/ml et  $11,42 \pm 0,10$  mg/ml, dont un grand nombre sont 2 fois supérieures à nos résultats, indiquant une diminution de l'effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase.



**Figure 73 :** Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques (EM) et lipidiques (ELB et FI) des galles de *P. atlantica* collectés en 2016.

De nombreuses études ont confirmé que l'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -amylase a été due à la présence de substances actives dans les plantes appartenant aux différentes classes de métabolites secondaires (par exemple : composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes) (Abeysekera *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2018; Sales *et al.*, 2012; Telli, 2017). Selon (Abirami *et al.*, 2014; Mamun-or-Rashid *et al.*, 2014), les constituants actifs les plus couramment impliqués dans l'inhibition de l'enzyme sont les flavonoïdes, les tanins, les phénols et les alcaloïdes. De plus, (Firdaus *et al.*, 2015) a attribué l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase des espèces de *Sargassum* à leur forte teneur en polyphénols. En soulignant leur capacité à chélater les enzymes, entraînant une précipitation et une altération de la structure, associées à une perte de fonctions biologiques. De même, la variété de polyphénols peut

présenter des effets synergiques, conduisant à une efficacité plus élevée de l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase (Nagappan *et al.*, 2017; Telli, 2017). Dans les travaux effectués par (Ahmad *et al.*, 2012), sur des graines de *Momordica charantia* contre les deux enzymes  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase, ils ont démontré que l'huile de ces graines était un puissant agent antidiabétique. Mais encore d'après (Conforti *et al.*, 2005), le squalène et d'autres composés de la fraction insaponifiable peuvent également contribuer à l'inhibition globale des performances de l' $\alpha$ -amylase. Ces données appuient fortement les résultats obtenus dans notre étude à savoir l'inhibition de  $\alpha$ -amylase par la fraction insaponifiable des extraits lipidiques des galles.

### 1.10.2 Inhibition de l'activité Acétylcholinestérase (IAAChE)

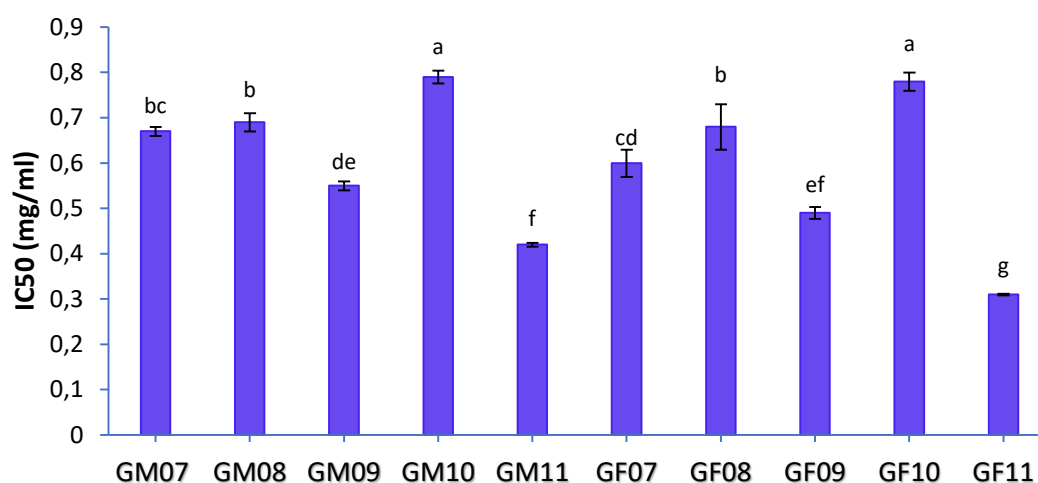
Les activités inhibitrices des extraits méthanoliques et lipidiques des galles de *P. atlantica* sur l'acétylcholinestérase ont été déterminées en utilisant le donépézil comme composés de référence. Les résultats obtenus sont exprimés en IC50 (mg/ml), présentés dans les deux tableaux, **tableau 17** pour les échantillons de 2010 et **tableau 18** pour les échantillons 2016 et illustrés dans les deux **figures 74 et 75**.

Les valeurs IC50 des extraits méthanoliques des galles de 2010 ont varié de  $0,42 \pm 0,004$  mg/ml (pour **GM11**) à  $0,79 \pm 0,014$  mg/ml (pour **GM10**) avec une moyenne de  $0,63 \pm 0,004$  mg/ml pour les galles mâles et de  $0,31 \pm 0,002$  mg/ml (pour **GF11**) à  $0,78 \pm 0,02$  mg/ml (pour **GF10**) avec une moyenne de  $0,57 \pm 0,02$  mg/ml pour les galles femelles. Les galles mâles et femelles récoltées au mois de novembre ont présenté une meilleure inhibition. De même, l'ANOVA a révélé une influence significative du mois de récolte ( $p= 0,002$ ) sur l'activité inhibitrice des extraits méthanoliques.

**Tableau 17** : Les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques des galls de *P. atlantica* collectés en 2010.

Echantillons	IC50 (mg/ml)
MG07	0,67 <sup>bc</sup> ± 0,01
MG08	0,69 <sup>b</sup> ± 0,02
MG09	0,55 <sup>de</sup> ± 0,01
MG10	0,79 <sup>a</sup> ± 0,014
MG11	0,42 <sup>f</sup> ± 0,004
GF07	0,60 <sup>cd</sup> ± 0,03
GF08	0,68 <sup>b</sup> ± 0,05
GF09	0,49 <sup>ef</sup> ± 0,013
GF10	0,78 <sup>a</sup> ± 0,02
GF11	0,31 <sup>g</sup> ± 0,002

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f→g: indiquent des concentrations décroissantes.



**Figure 74** : Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques des galls de *P. atlantica* collectés en 2010.

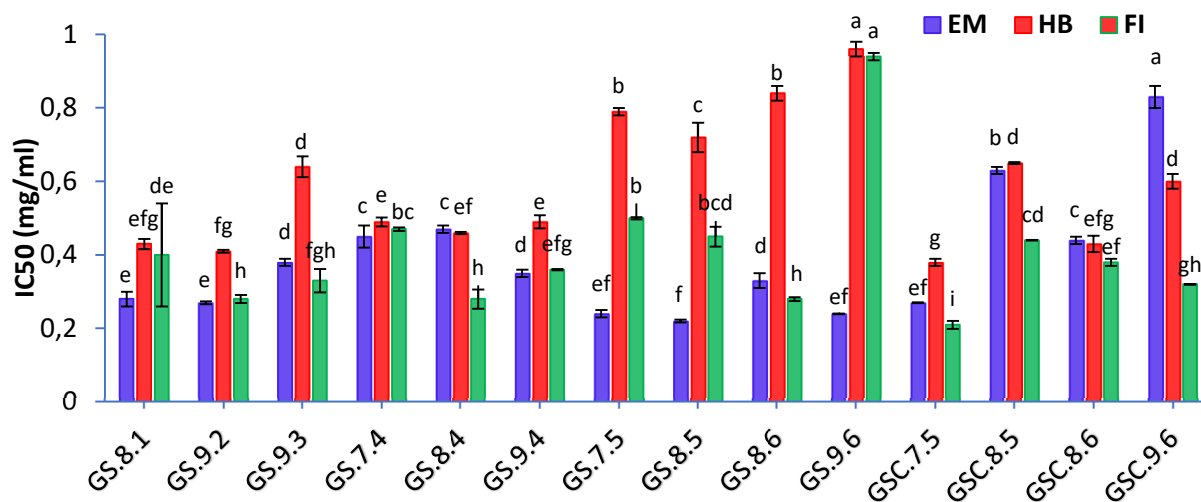
En ce qui concerne les galls de 2016, les valeurs IC50 des extraits méthanoliques ont été de  $0,22 \pm 0,004$  mg/ml (pour **GS.8.5**) à  $0,47 \pm 0,01$  mg/ml (pour **GS.8.4**) avec une moyenne de  $0,32 \pm 0,0004$  mg/ml pour les galls sphériques et de  $0,27 \pm 0,001$  mg/ml (pour **GSC.7.5**) à  $0,83 \pm 0,03$  mg/ml (pour **GSC.9.6**) avec une moyenne de  $0,60 \pm 0,002$  mg/ml pour les galls semi-circulaires. Les résultats des extraits lipidiques brutes ont été comprises entre  $0,41 \pm 0,004$  mg/ml (pour **GS.9.2**) et  $0,96 \pm 0,02$  mg/ml (pour **GS.9.6**) avec une moyenne de  $0,62 \pm 0,01$  mg/ml pour les galls sphériques et entre  $0,38 \pm 0,01$  mg/ml (pour **GSC.7.5**) et  $0,65 \pm 0,003$  mg/ml (pour **GSC.8.5**) avec une moyenne de  $0,51 \pm 0,01$  mg/ml pour les galls semi-circulaires. Tandis que, la moyenne d'IC50 des fractions insaponifiables pour les galls sphériques est de

0,43 ± 0,003 mg/ml (valeurs variant de 0,28 ± 0,011 mg/ml (pour **GS.9.2** et **GS.8.6**) à 0,94 ± 0,01 mg/ml (pour **GSC.9.6**)) et une moyenne de 0,33 ± 0,0001 mg/ml (valeurs variant de 0,21 ± 0,011 mg/ml (pour **GSC.7.5**) à 0,44 ± 0,01 mg/ml (pour **GSC.8.5**)) pour les galles semi-circulaires. Toutes les valeurs d'IC50 des échantillons de la fraction insaponifiable sont inférieurs à celles des extraits lipidiques brutes, donc plus efficaces, démontrant ainsi l'implication de ces molécules dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Les extraits méthanoliques et hexaniques des galles sphériques récoltés au mois d'août et septembre ont révélé une meilleure inhibition. Par contre, ceux des galles semi-circulaires, la meilleure inhibition a été enregistré au mois de juillet. L'ANOVA a révélé une absence d'influence significative de la forme, du mois et des sites sur l'activité inhibitrice des extraits hexaniques, à l'exception des extraits méthanoliques. En effet, une influence significative du mois de récolte ( $p=0,024$ ) a été enregistrée sur l'activité inhibitrice contre AChE. De plus, Tous les extraits ont été moins puissants que le standard Donepezil ( $IC_{50} = 0,18 \pm 0,002 \mu\text{g/ml}$ ). Aucun rapport n'a été trouvé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase des galles de *Pistacia atlantica*. Cependant, quelques travaux sur d'autre parties de la plante ont été trouvés, citons les travaux réalisés par (**Peksel et al., 2013, 2010**) sur les feuilles de *Pistacia atlantica*, qui ont enregistré des valeurs de IC50 de ( $60,33 \pm 0,08 \mu\text{g / ml}$  et  $31,51 \pm 0,29 \mu\text{g / ml}$ ) pour les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle, respectivement, puis en 2013 ont enregistré une valeur de  $58,05 \pm 0,12 \mu\text{g / ml}$  pour les extraits aqueux. Mais encore, l'étude réalisée par (**Benamar et al., 2018**) sur l'extrait d'acétate d'éthyle, aqueux et de n-butanol des feuilles de *Pistacia atlantica*, ont montré une activité inhibitrice contre AChE qui a été de l'ordre de  $8,04 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$ ,  $9,36 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$  et  $80,96 \pm 2,04 \mu\text{g/ml}$ , respectivement. Il a été rapporté que les plantes qui possèdent une teneur élevée en composés phénoliques tels les acides phénoliques, les tanins et les flavonoïdes ont des propriétés anticholinestérases importantes (**Gomathi et Manian, 2015**).

**Tableau 18** : Les concentrations inhibant 50% de l'activité Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques et hexaniques des galls de *P. atlantica* collectés en 2016.

Echantillons	IC 50 (mg/ml)		
	Extraits méthanoliques	Extraits hexaniques	
		ELB	FI
GS.8.1	0,28 <sup>e</sup> ± 0,02	0,43 <sup>efg</sup> ±0,014	0,40 <sup>de</sup> ±0,14
GS.9.2	0,27 <sup>e</sup> ± 0,004	0,41 <sup>fg</sup> ±0,004	0,28 <sup>h</sup> ±0,011
GS.9.3	0,38 <sup>d</sup> ± 0,01	0,64 <sup>d</sup> ±0,028	0,33 <sup>fgh</sup> ±0,032
GS.7.4	0,45 <sup>c</sup> ± 0,03	0,49 <sup>e</sup> ±0,012	0,47 <sup>bc</sup> ±0,005
GS.8.4	0,47 <sup>c</sup> ± 0,01	0,46 <sup>ef</sup> ±0,003	0,28 <sup>h</sup> ±0,026
GS.9.4	0,35 <sup>d</sup> ± 0,01	0,49 <sup>e</sup> ±0,018	0,36 <sup>efg</sup> ±0,002
GS.7.5	0,24 <sup>ef</sup> ± 0,01	0,79 <sup>b</sup> ±0,01	0,50 <sup>b</sup> ±0,003
GS.8.5	0,22 <sup>f</sup> ± 0,004	0,72 <sup>c</sup> ±0,04	0,45 <sup>bcd</sup> ±0,027
GS.8.6	0,33 <sup>d</sup> ± 0,02	0,84 <sup>b</sup> ±0,02	0,28 <sup>h</sup> ±0,005
GS.9.6	0,24 <sup>ef</sup> ± 0,001	0,96 <sup>a</sup> ±0,02	0,94 <sup>a</sup> ±0,01
GSC.7.5	0,27 <sup>ef</sup> ± 0,001	0,38 <sup>g</sup> ±0,01	0,21 <sup>i</sup> ±0,011
GSC.8.5	0,63 <sup>b</sup> ± 0,01	0,65 <sup>d</sup> ±0,003	0,44 <sup>cd</sup> ±0,001
GSC.8.6	0,44 <sup>c</sup> ± 0,01	0,43 <sup>efg</sup> ±0,022	0,38 <sup>ef</sup> ±0,01
GSC.9.6	0,83 <sup>a</sup> ± 0,03	0,60 <sup>d</sup> ±0,02	0,32 <sup>gh</sup> ±0,001
Donepezil (µg/ml)	0,18 <sup>g</sup> ±0,002	-	-

Notes : Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test post hoc de Tukey. Lettres a→b→c→d→e→f→g→h: indiquent des concentrations décroissantes. Abréviations : ELB : extrait lipidique brute ; FI : fraction insaponifiable.



**Figure 75** : Histogramme représentant les concentrations inhibant 50% de l'activité  $\alpha$ -amylase des extraits méthanoliques (EM) et lipidiques (ELB et FI) des galls de *P. atlantica* collectés en 2016.

### 1.11 Corrélation entre les différents paramètres étudiés

La corrélation calculée par le test de Pearson entre le contenu des extraits et des activités biologiques étudiées nous a permis de vérifier s'il y a une relation significative. Les deux tableaux (**20** et **21**) illustrent l'ensemble des corrélations calculées.

Pour les résultats des galles 2010 (**Tableau 19**), ils n'ont révélé aucune corrélation entre les teneurs (CPT, FT et TCT). Cependant, deux corrélations ont été enregistrées entre CPT et les deux activités antioxydantes FRAP et ABTS<sup>•+</sup> (0,784 et 0,675 ;  $p < 0,01$ , respectivement). En effet, les composés phénoliques sont considérés comme de puissants antioxydants permettant la réduction et l'inactivation des chaînes de radicaux libres (**Cherbi et al., 2016**). La concentration en composés phénoliques semble influencer l'activité antioxydante. Également, deux autres inversement proportionnelle entre FT et DPPH<sup>•</sup> et entre FT et l'IC<sub>50</sub> d'inhibition de l'acétylcholinestérase (-0,701 ;  $p < 0,05$  et -0,800 ;  $p < 0,01$ , respectivement) ont été révélées. Sachant qu'une valeur inférieure d'IC<sub>50</sub> indique une activité inhibitrice élevée et inversement. Le résultat obtenu suggère clairement que les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes totaux interviennent dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase, cependant ces flavonoïdes ne sont pas les principaux composés responsables de la neutralisation de radical DPPH<sup>•</sup>. De plus, une corrélation significative entre FRAP et ABTS<sup>•+</sup> a été observé.

A propos des galles de 2016 (**Tableau 20**), une corrélation effectuée entre le CPT, le FT et le TCT a indiqué qu'il y avait une corrélation significative positive entre le CPT et le TCT (0,725 ;  $p < 0,01$ ) et une relation inversement proportionnelle entre le FT et le TCT (-0,689 ;  $p < .01$ ). Ceci démontre la variation non simultanée entre les teneurs. D'autre part, il y a eu une relation significative entre CPT et les activités antioxydantes DPPH<sup>•</sup> (0,760 ;  $p < 0,01$ ), FRAP (0,820 ;  $p < 0,05$ ), et ABTS<sup>•+</sup> (0,740 ;  $p < 0,05$ ) et une corrélation positive entre FRAP et TCT (0,551 ;  $p < 0,05$ ). Aussi, une forte corrélation positive a été enregistrée entre les activités antioxydantes, DPPH<sup>•</sup> et FRAP ; DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> ; FRAP et ABTS<sup>•+</sup> (0,980, 0,970 et 0,941 ;  $p < 0,05$ , respectivement). Cependant, l'absence de corrélation entre le FT et les activités antioxydantes peut être expliqué par le fait que la plupart des flavonoïdes peuvent être sous forme glycoside, qui est moins efficaces que la forme aglycone (**Ben Ahmed et al., 2017**).

En ce qui concerne les extraits lipidiques brutes et les fractions insaponifiables, il y a eu une corrélation positive significative entre les teneurs TT et ST (0,713 ;  $p < 0,05$ ). Aussi, une corrélation significative a été enregistrée entre l'activité des ELB à neutraliser le DPPH<sup>•</sup> et les deux teneurs (TT et ST) (0,715, 0,708 ;  $p < 0,05$ , respectivement) et entre la capacité des

fractions insaponifiables à piéger le radical DPPH<sup>•</sup> et ST (0,620 ;  $p < 0,05$ ). L'étude menée par (Guenane, 2017) sur l'huile de fruit de *Pistacia atlantica* a démontré une corrélation significative entre l'activité antioxydante, les tocophérols et les stérols. Par conséquent, une analyse qualitative des tocophérols et des phytostérols dans les extraits lipidiques des galles de *P. atlantica* ainsi que la vérification d'une éventuelle corrélation avec l'activité antioxydante s'impose.

Au sujet d'une éventuelle corrélation entre les activités inhibitrices des enzymes ( $\alpha$ -amylase (IAA) et acétylcholinestérase (IAAChE)) et les teneurs en composés phénoliques. Les résultats ont révélé d'une part une corrélation négative significative entre IC50 (IAA) et TCT (-0,606 ;  $p < 0,05$ ) et une relation positive significative entre IC50 (IAA) et FT (0,590 ;  $p < 0,05$ ) et d'autre part une corrélation inversement proportionnelle entre IC50 (IAAChE) et les deux teneurs (CPT et TCT) (-0,572 ;  $p < 0,05$  et -0,721 ;  $p < 0,051$ , respectivement) et également une relation significative positive entre IC50 (IAAChE) et FT (0,653 ;  $p < 0,05$ ). Ces résultats démontrent nettement que les composés phénoliques et spécifiquement les TCT sont responsables de l'inhibition des deux enzymes. Effectivement, les tanins sont des puissants agents chélateurs des métaux, pouvant former des complexes insolubles avec les protéines et conduisant par la suite à leur précipitation (Telli, 2017). Aussi l'étude réalisé par (Gonçalves *et al.*, 2011) a démontré la relation étroite entre cette capacité et le degré de polymérisation des tanins.

Toutefois, pour les extraits lipidiques, une absence de corrélation significative entre les valeurs IC50 et les teneurs (TT et ST) a été relevée. Ces activités inhibitrices peuvent être attribuées à la présence de molécules actives individuelles telles que les tocophérols, les stérols, les huiles essentielles, etc. Leur identification et l'étude de leur capacité individuelle d'inhibition semblent nécessaires pour renforcer cette hypothèse. Une corrélation modérée positive a été observée entre l'activité antioxydante et la capacité à inhiber  $\alpha$ -amylase des fractions insaponifiables (0,566 ;  $p < 0,05$ ). Cette observation prouve que les extraits ayant une meilleure activité antioxydante sont moins efficaces pour l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase. Enfin, trois autres corrélations ont été observées entre les activités inhibitrices des enzymes, deux négatives entre IAA des FI et IAAChE des ELB et entre IAA des FI et IAAChE des FI (-0,626 et -0,559 ;  $p < 0,05$ , respectivement) et une positive entre IAAChE des ELB et FI (0,655 ;  $p < 0,05$ ). Cette constatation indique que les extraits lipidiques n'ont pas la même affinité pour les deux enzymes.

**Tableau 19 :** Corrélation par le test Pearson entre les teneurs, les activités antioxydantes et les activités inhibitrices enzymatiques des galles de *P. atlantica* récoltées en 2010.

	CPT	FT	TCT	DPPH	FRAP	ABTS (mg T/g)	IAA IC50 (mg/ml)	IAAChE IC50 (mg/ml)
CPT (mg AG/g)	1				0,784**	0,675*		
FT (mg Q/g)		1		-0,701*				-0,800**
DPPH (mg AA/g)				1				
FRAP (mg AA/g)					1	0,891**		

**Tableau 20 :** Corrélation par le test Pearson entre les teneurs, les activités antioxydantes et les activités inhibitrices enzymatiques des galles de *P. atlantica* récoltées en 2016.

	CPT	FT	TCT	TT	ST	DPPH EM	FRAP EM	DPPH ELB (mg T/g)	DPPH FI (mg T/g)	IAA ELB	IAA FI	IAAChE EM	IAAChE FI
CPT (mg AG/g)	1		0,725**										-0,572*
FT (mg Q/g)	-0,445	1											0,653*
TCT (mg C/g)		-0,689**	1										-0,721**
DPPH EM	0,760**	-0,400	0,520										
FRAP EM (mg AA/g)	0,820*	-0,404	0,551*			0,980*							
ABTS EM (mg T/g)	0,740*	-0,304	0,485			0,970*	0,941*						
IAA EM	-0,503	0,590*	-0,606*										0,538*
TT (mg T/g de L)					0,713*			0,715*	0,190	-0,318	-0,181		
TS (mg S/g de L)								0,708*	0,620*	-0,258	-0,331		
DPPH FI													0,566*
IAAChE ELB				-0,077	-0,194							-0,626*	0,655*
IAAChE FI				0,229	0,102							-0,559*	

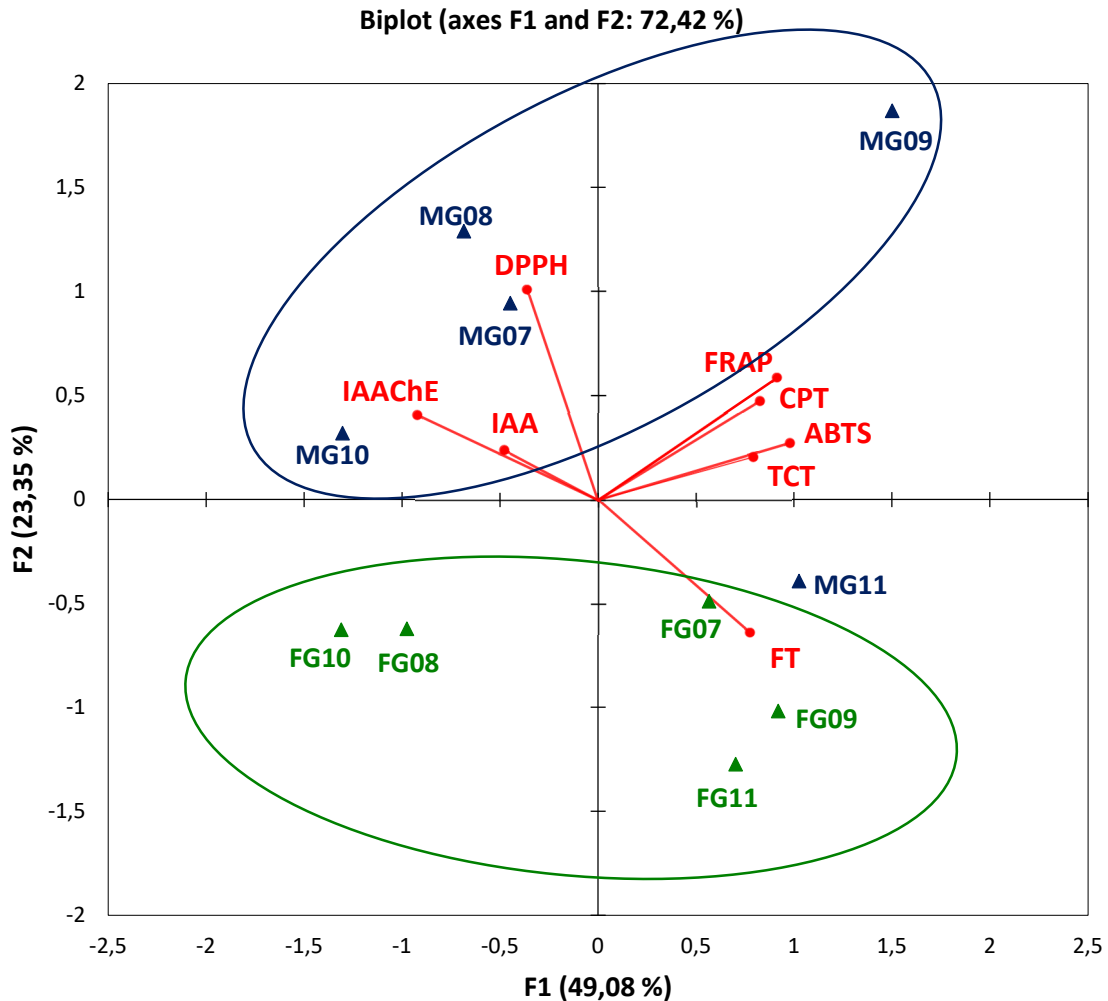
Notes : \* La corrélation est significative au niveau de 0,05 (bilatéral). \*\*La corrélation est significative au niveau de 0,01 (bilatéral). Abréviations : EM : extraits méthanoliques; ELB : extrait lipidique brut; FI : fraction insaponifiable ; CPT : composés phénoliques totaux; FT: flavonoïdes totaux; TCT, tanins condensés totaux; TT : tocophérols totaux ; ST : stérols totaux; DPPH, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle; FRAP: Ferric reducing antioxidant power; ABTS: 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate); IAA: inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase et IAAChE: inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase.

### 1.12 Analyse des données par ACP

Afin de mieux comprendre les relations entre le contenu des extraits et les activités étudiées ainsi que différencier les groupes dans l'ensemble des variables, le calcul ACP (analyse des composants principaux) a été réalisé pour visualiser les données. En effet, l'ACP est une méthode qui permet de fournir une image simplifiée, en analysant un ensemble de données quantitatives dans un espace multidimensionnel tout en conservant un maximum d'information (Fagbohoun, 2014). Lorsque deux variables (vecteurs) sont proches les unes par rapport aux autres, elles sont alors positivement corrélées. Si elles sont symétriquement opposées par rapport au centre, elles sont alors négativement corrélées. Mais si elles sont orthogonales les unes par rapport aux autres, alors elles ne sont pas corrélées (Smith, 2002). Les figures 76 et 77 présentent les vecteurs des variables (CPT, FT, TCT, DPPH<sup>\*</sup>, FRAP, ABTS<sup>++</sup>, IAA et IAACHÉ) et la répartition de tous les extraits méthanoliques étudiés (2010 et 2016, respectivement) dans le plan défini par les valeurs des deux composantes principales. L'examen du plan factoriel de l'ACP a montré en premier lieu que les deux premières composantes principales ont représenté 72,42 % de la variance totale des données, dont 49,08 % le long de la première composante principale **F1** (axe horizontal) et 23,35 % le long de la seconde **F2** (axe vertical) pour les échantillons 2010 (Figure 76) et 82,49% de la variance totale des données, dont 65,22 % le long de la première composante principale **F1** et 17,27 % le long de la seconde **F2** pour les échantillons 2016 (Figure 77). En second lieu, l'ACP permet de visualiser la répartition des différents échantillons qui se présentent sous forme de points, en fonction des composantes **F1** et **F2**.

Pour les échantillons des galles 2010, la distribution de tous les paramètres étudiés a montré que les vecteurs représentant les deux teneurs CPT et TCT et les activités antioxydantes (ABTS<sup>++</sup> et FRAP) sont orientés dans la même direction, vers la partie positive de l'axe F1 et les angles qu'elles forment sont inférieurs à 90 °C. Ceci suggère qu'elles sont corrélées positivement. Par ailleurs, le test DPPH<sup>\*</sup> et les deux activités inhibitrices des deux enzymes (IAA et IAACHÉ) sont positivement corrélées entre elles mais négativement corrélées avec les teneurs CPT, TCT et les tests FRAP et ABTS<sup>++</sup>. De même, une variation orthogonale entre FT et les autres activités restantes (DPPH<sup>\*</sup>, IAA et IAACHÉ), démontrant clairement que les flavonoïdes n'ont pas été les principales molécules bioactives responsables de la neutralisation des DPPH<sup>\*</sup> et l'inhibition des enzymes. Il est intéressant de noter qu'il y a la formation de deux groupes dans l'axe F2, toutes les galles femelles sont situées dans la partie inférieure (valeurs négatives), alors que toutes les galles mâles à l'exception de GM11 sont situées dans la partie

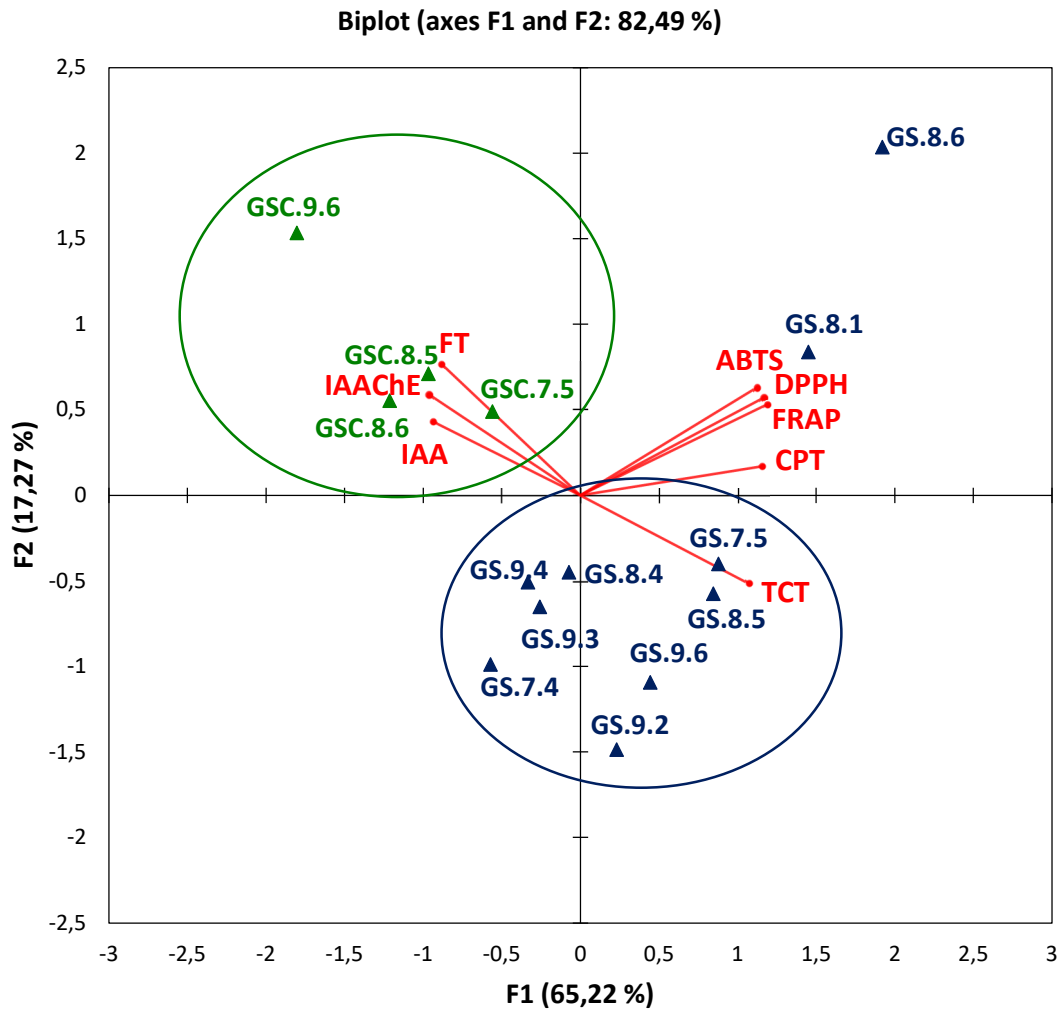
supérieure (valeurs positives), ce résultat démontre que le genre a influencé sur le comportement de distribution des échantillons.



**Figure 76 :** Distribution de 10 extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* collectés en 2010 par rapport à la position des paramètres étudiés (CPT, FT, TCT, DPPH, FRAP, ABTS, IAA et IAChE) réalisée par ACP.

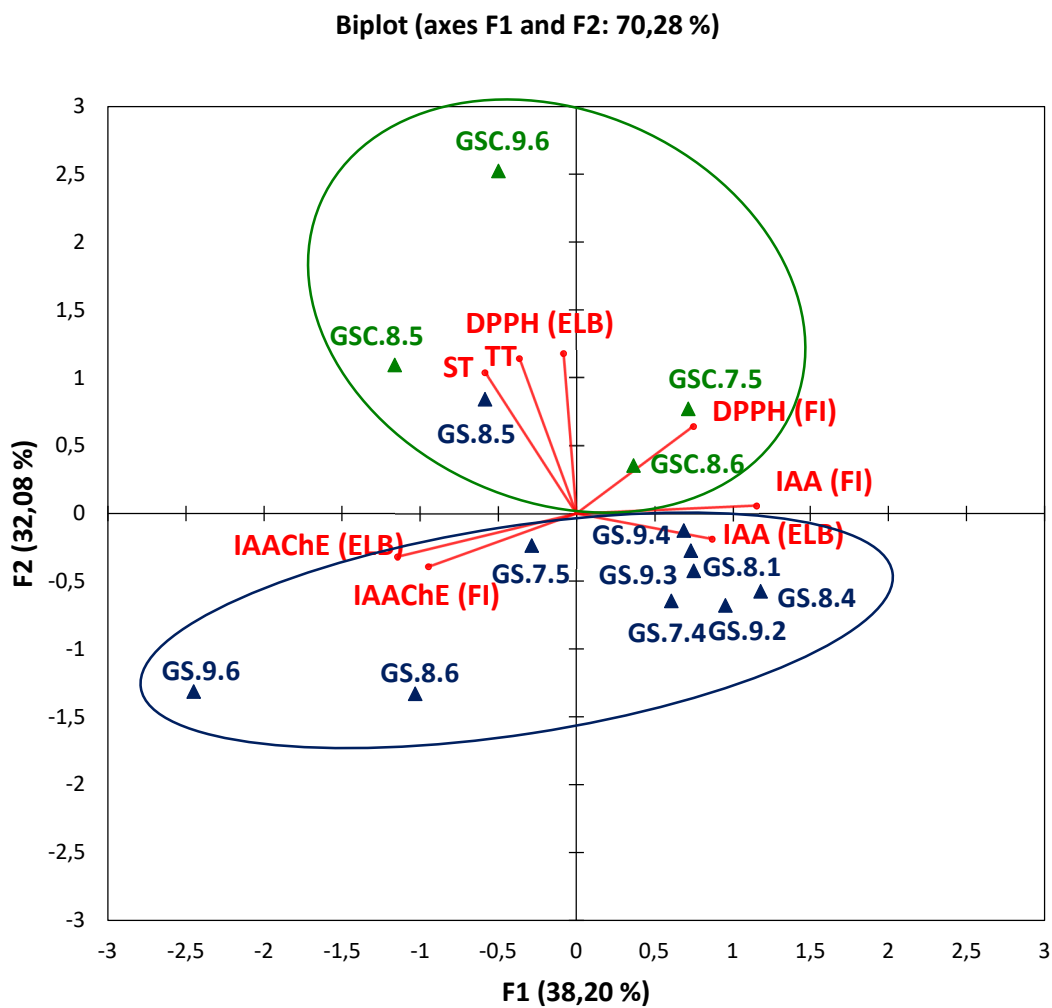
Les résultats des échantillons 2016 ont révélé que la capacité de piégeage des radicaux libres (DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup>), le pouvoir de réduction des ions ferriques FRAP et le CPT ont été chargés sur F1. Ces activités antioxydantes se sont comportées de manière similaire et davantage ont été liées aux CPT, ce qui suggère que les composés phénoliques sont de bons antioxydants. L'ACP a également permis d'avoir un aperçu des similitudes et des différences entre les formes, les sites et les mois de récolte. La distance entre les échantillons est directement proportionnelle à leur degré de similitude ou de différence. La **figure 89** a montré que les galles sphériques récoltées en août sont situées en hauteur de F1 dû à leurs activités antioxydantes qui sont les

plus élevées. Dans le facteur 2, les galles semi-circulaires constituaient un groupe distinctif caractérisé par des niveaux élevés de FT. Cependant, ce groupe a eu les valeurs d'activité inhibitrice sur l' $\alpha$ -amylase (IAA) et l'acétylcholinestérase (IAAChE) les plus élevées indiquant un potentiel plus faible. Il est intéressant de noter également qu'il y a la formation de deux groupes dans l'axe F2, toutes les galles sphériques à l'exception de **GS.8.6** et **GS.8.1** sont situées dans la partie inférieure, alors que toutes les galles semi-circulaires sont situées dans la partie supérieure, démontrant ainsi une influence du comportement de distribution des échantillons selon la forme. Les sites n'ont pas été différenciés sur le graphe. Ce résultat indique que la localité n'a pas influencée les paramètres CPT, FT, TCT, DPPH\*, FRAP, ABTS\*<sup>+</sup> et IAA AIA, IAACHÉ.



**Figure 77** : Distribution de 14 extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* collectés en 2016 par rapport à la position des paramètres étudiés (CPT, FT, TCT, DPPH, FRAP, ABTS, IAA et IAACHÉ) réalisée par ACP.

La **figure 78** représente les vecteurs des variables (TT, ST, DPPH<sup>\*</sup> (FI), DPPH<sup>\*</sup> (ELB), IAA (FI), et IAA (ELB), IAACHÉ (FI) et IAACHÉ (ELB)) de tous les échantillons sur l'espace bidimensionnel formée par les facteurs F1 et F2. Les deux premières composantes principales ont représenté 70,28 % de la variance totale des données, dont 38,20 % le long de la première composante principale **F1** et 32,08 % le long de la seconde **F2**. En examinant le diagramme de dispersion, les résultats ont montré que les variables, telles que la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH par les extraits lipidiques brutes, TT et ST sont situées dans la partie supérieure du diagramme F2 et donc corrélés positivement. Ce qui suggère que la capacité de piégeage des radicaux libres du DPPH a été liée au TT et au ST. Dans la partie F2, les galles semi-circulaires situées en hauteur ont des valeurs élevées de tocophérols et stérols totaux, indiquant une meilleure activité antioxydante. Cependant, les échantillons situés dans la partie inférieure du graphique indiquent une activité inhibitrice plus élevée. L'opposition de l'emplacement des deux activités (IAA et IAACHÉ) confirme que les échantillons n'ont pas la même affinité pour les deux enzymes. Mais aussi, il y a la formation de deux groupes distincts, prouvant encore une influence de distribution des échantillons selon la forme.



**Figure 90** : Distribution de 14 extraits lipidiques des gales de *P. atlantica* collectés en 2016 par rapport à la position des paramètres étudiés (TT, ST, DPPH (ELB), DPPH (FI), IAA (ELB), IAA (FI), IAACHe (ELB) et IAACHe (FI)) réalisée par ACP

*Chapitre*

---

3

***Etude in silico (Docking moléculaire)***

## 1 Introduction

A l'heure actuelle, la recherche en biologie ne peut se passer des outils informatiques pour le traitement des données. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus exactement l'amarrage moléculaire (connu sous le terme anglo-saxon "docking") (Bouchagra, 2018).

La modélisation moléculaire (MM) est un terme employé pour désigner un ensemble de méthodes permettant d'étudier le comportement de systèmes de molécules (Bidouil, 2012). Elle utilise des méthodes de calcul théorique dont les principales sont la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire et la mécanique quantique pour définir la géométrie des atomes d'une molécule et ses propriétés physicochimiques (Lalout, 2016; Santiso et Gubbins, 2004). La MM permet de fournir des informations complémentaires (structurales et dynamiques) plus détaillées à celles obtenues par des méthodes expérimentales (Bidouil, 2012; Hercend, 2012). En effet, elle a été conçue pour prévoir la structure tridimensionnelle des biomolécules et de comprendre le comportement et les interprétations formées entre elles ou avec des petites molécules (Mala et Takeuchi, 2008). Par ailleurs, elle a été également développées pour diminuer le coût ainsi que le temps nécessaire pour découvrir de nouveaux médicaments, de classer les molécules les plus active et de filtrer ceux qui sont toxiques ou présentant des effets indésirables (Rayar, 2017). Cependant, l'utilisation de chaque méthode doit mettre en considération les hypothèses (validité de la reproduction des valeurs expérimentales), les approximations (champ de force utilisé) et les limitations du modèle choisi (ex : temps de simulation) (Hercend, 2012).

Ce chapitre a été consacré à l'application de la technique « Docking moléculaire » et qui consiste à étudier l'inhibition de deux enzymes  $\alpha$ -amylase et acétylcholinestérase l'une impliquée dans la maladie de diabète de type 2 et l'autre dans la maladie d'Alzheimer avec cinq inhibiteurs naturels identifiés dans les galls de *Pistacia atlantica*, afin de prédire les interactions moléculaires entre les enzymes (Récepteurs) et les inhibiteurs (Ligands).

## 2 Docking moléculaire

Docking est le nom accordé aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont associées pour étudier les modes d'interaction probables entre deux molécules (Ayachi, 2017). Longtemps, le docking a été basé sur le concept « clé-serrure », selon lequel les corps, le ligand qui représente la clé et la protéine qui représente la serrure étaient tous deux rigides, capables d'interagir uniquement s'ils présentent une compatibilité géométrique parfaite

(Brut, 2009). On parlait alors de docking « rigid-body » (Dias *et al.*, 2013; Elkaim, 2011). Par la suite, l'idée s'est progressivement imposée que les molécules ne sont pas figées, mais peuvent subir des changements conformationnels importants lors d'une interaction. Les procédures sont donc orientées vers une flexibilité ou partielle, des systèmes mis en jeu (Brut, 2009).

Dans la plupart des cas, les structures mises en jeu dans le docking moléculaire sont un récepteur macromoléculaire (cible de docking) composé d'acides aminés pouvant être soit une enzyme ou un récepteur protéique et un ligand qui est une petite molécule (substrat, activateur ou inhibiteur) qui va se fixer sur le récepteur (Moroy, 2005). C'est pour cette raison, que le terme docking seul est souvent employé pour désigner un « docking protéine-ligand » (Warren *et al.*, 2012).

L'étude du docking est une première étape primordiale dans la détermination des interactions entre une protéine et son ligand, en cherchant les orientations dans l'espace et les conformations favorables pour la fixation du ligand à la protéine (Duhovny *et al.*, 2002). En effet, comprendre le mode de fonctionnement et démontrer les résidus impliqués, est donc essentiel pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules (Benarous, 2014; Brut, 2009). Le docking est divisé en deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (Bouchagra, 2018) (Figure 79):

**-Docking** (première étape) : étape de la sélection des conformations, des positions et des orientations possibles les plus favorables en se reposant sur le fait de positionner le ligand dans le site actif du récepteur (Lalout, 2016). Cette étape est réalisée automatiquement à l'aide d'algorithmes de docking, permettant ainsi l'augmentation de la vitesse d'exécution et l'amélioration de la précision des simulations (Ayachi, 2017).

**-Scoring** (seconde étape) : étape de classement qui permet l'évaluation de l'affinité entre chaque complexe sélectionné dans l'étape précédente (Ayachi, 2017). Cette étape est effectuée par des outils informatiques appelés fonction de score. Cette dernière calcule l'énergie qui permet la stabilisation des complexes protéine-ligand, puis les classe en fonction des modes d'interaction les plus probables (Ayachi, 2017; Halperin *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les interactions entre molécules peuvent être étudiés par des méthodes expérimentales telles que la cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire. Cependant, la réalisation de ces techniques requiert la cristallisation du complexe enzyme-ligand qui est une pratique très difficile car la durée d'existence de ces espèces est très

courte (Bouchagra, 2018). Mais aussi, elles sont incapables de détailler la totalité de ces interactions (Grosdidier, 2007).

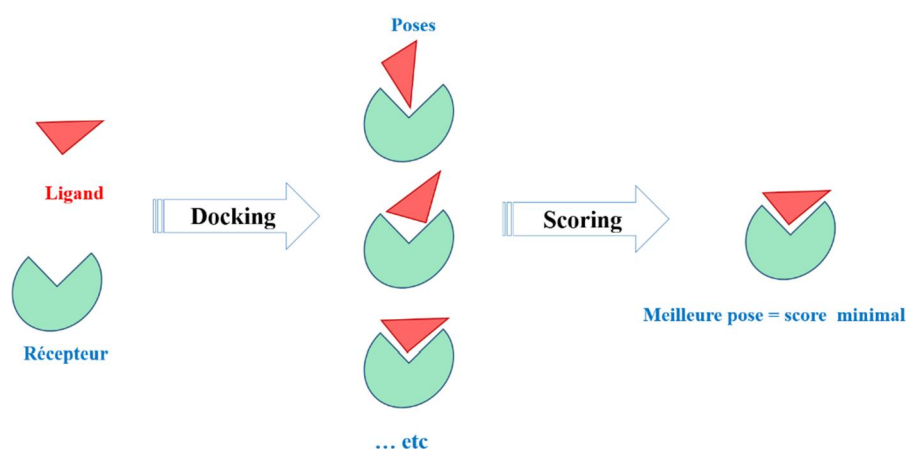


Figure 79 : Principe du docking moléculaire

### 3 Algorithmes de docking

Les algorithmes de docking ont été conçus pour une recherche rapide et efficace les modes d'interaction entre protéine-ligand les plus favorables (Bidouil, 2012). Ces algorithmes peuvent être classés selon le degré de flexibilité du ligand et/ou du récepteur: docking rigide, docking semi-flexible et docking flexible (Pachoulide, 2021).

- Dans un **docking rigide**, les méthodes employées sont simples et prennent en compte uniquement la complémentarité géométrique des deux molécules, limitant ainsi la précision et la spécificité des résultats (Bidouil, 2012). Ce type de docking est encore utilisé pour le docking protéine-protéine (Bouchagra, 2018).

-Le **docking semi-flexible** considère la protéine comme étant un corps rigide et le ligand flexible (Pachoulide, 2021). L'exploitation de la cavité catalytique du récepteur peut être réalisée par trois types de méthodes ou d'algorithmes: les méthodes systématiques, les méthodes aléatoires (stochastiques) et les méthodes de simulation (Brut, 2009).

- **Méthodes systématiques (combinatoires)** : Dans ce type d'approche, chaque degré de liberté du ligand est représenté par une grille de valeurs qui sont explorées de manière combinatoire (Brooijmans et Kuntz, 2003). Par ailleurs, l'augmentation de degré de liberté rend l'espace d'exploration plus grande, ce qui peut engendrer une surcharge voir des problèmes de calcul (Brut, 2009; Pachoulide, 2021). C'est pour cette raison que le ligand est fragmenté en parties rigides et flexibles. En première lieu les parties

rigides sont mises en interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont ajoutées de manière progressive avec une exploration des angles de torsion (Merzoug *et al.*, 2012). Cette méthode a été incorporée dans plusieurs logiciels tels que Dock (Kuntz, 1992), FlexX (Rarey *et al.*, 1996) et CORINA (Pachoulide, 2021).

- **Méthodes aléatoires (stochastiques):** Cette approche consiste à changer aléatoirement la structure tridimensionnelle du ligand (Bouchagra, 2018). Parmi les méthodes stochastiques, il y a la méthode de Monte Carlo, la méthodes Tabou, l'algorithme évolutionnaire (le plus connu est l'algorithme génétique) et le méthodes d'optimisation Swarm (Pachoulide, 2021). Concernant la méthode de Monte Carlo, le ligand subit des changements au niveau des translations, des rotations et des torsions et cela à chaque mouvement. L'énergie de la conformation obtenue qui est le critère de sélection est calculée. Si la valeur est validée, alors la conformation sera sauvegardée et le programme générera automatiquement la prochaine conformation (Bouchagra, 2018). Cette méthode est utilisée par des logiciels comme AutoDock, ICM, MCDOCK, AutoDock Vina et ROSETTALIGAND (Pachoulide, 2021).
- **Méthodes de simulation (déterministes):** Il s'agit de la dynamique moléculaire et la minimisation d'énergie (Brut, 2009). Cependant, cette méthode est rarement employée en docking en raison de ces conditions (Bouchagra, 2018). Quant à la minimisation d'énergie est généralement incorporée comme complément des techniques précédemment citées (Brut, 2009).

-Le **docking flexible** traite la flexibilité des deux molécules (Bouchagra, 2018). En effet, certaines protéines peuvent présenter des régions de grande flexibilité conduisant à des changements conformationnels en présence d'un ligand, ce qui ne permet pas de négliger cette flexibilité pour éviter une décadence de la fiabilité des résultats (Lalout, 2016). Des approches tenant compte de la flexibilité du système entier ont été élaborées telles que les approches étudiant les différentes conformations du récepteur (single receptor conformation input) et celles qui étudient plusieurs structures du récepteur avec différentes conformations (multiple input receptor conformations) (Pachoulide, 2021). Toutefois, ces méthodes sont moins souvent utilisées du au gain de précision qui est beaucoup plus faible par rapport au temps de simulation qu'il faut pour leur exécution (Lalout, 2016; Zavodszky et Kuhn, 2005).

#### 4 Fonctions de score

Les fonctions de score sont des méthodes approximatives développées pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur (**Bouchagra, 2018**) et par la suite évaluer et classer les meilleurs complexes parmi ceux générés par une procédure de docking (**Jain, 2006**). Ces fonctions de score sont divisées en trois catégories : les fonctions de scores basées sur les champs de force, les fonctions de score empiriques et les fonctions de score basées sur les connaissances « knowledge-based » (**Kitchen *et al.*, 2004**).

- Les fonctions de score basées sur les champs de force : reposent sur les champs de force de la mécanique moléculaire et calculent l'énergie d'une pose en additionnant deux termes énergétiques, l'une représentant l'énergie d'interaction ligand-récepteur et l'autre l'énergie interne du ligand. L'avantage de cette catégorie est sa rapidité de calculer l'énergie du système (**Kitchen *et al.*, 2004; Rayar, 2017**).

- Les fonctions de score empiriques : calculent l'énergie de liaison en additionnant plusieurs coefficients des différents termes qui sont obtenues par des analyses de régression utilisant les données expérimentales d'affinité et les données structurales de cristallographie. Les avantages de cette catégorie sont : leur forme est plus simple que celles basées sur les champs de force ainsi que les temps de calculs sont relativement rapides (**Rayar, 2017; Sousa *et al.*, 2006**). Toutefois, cette méthode reste dépendante des données expérimentales (**Kitchen *et al.*, 2004; Rayar, 2017**).

- Les fonctions de scores basées sur les connaissances ou « knowledge-based » : analysent les structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés par des données expérimentales (**Bouchagra, 2018**). Des analyses statistiques déterminent la géométrie préférentielle des interactions (**Bouchagra, 2018**), la fréquence et la distribution des paires d'atomes entre le ligand et la protéine pour définir les potentiels d'interaction (**Kitchen *et al.*, 2004; Rayar, 2017; Sousa *et al.*, 2006**).

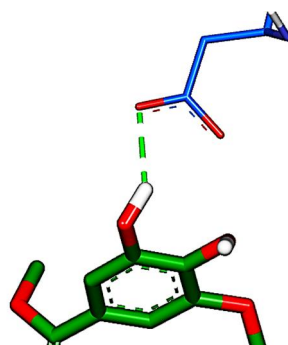
#### 5 Interaction protéine-ligand

La complémentarité de forme est une caractéristique importante car elle permet de laisser entrer le ligand, toutefois insuffisante pour qu'il reste et se stabilise au sein de la protéine. C'est pour cette raison que des interactions non-covalentes doivent se former (**Desaphy, 2013**). En effet, le fonctionnement des systèmes biologiques ne peut s'exprimer que par l'intermédiaire d'interactions spécifiques de faible énergie qui s'établissent, de façon souvent réversible

(Bouchagra, 2018). De nombreux types d'interactions non-covalentes peuvent exister entre le complexe ligand/protéine : les liaisons d'hydrogène, les interactions ioniques (électrostatiques) et les interactions hydrophobes.

### 5.1 Liaisons d'hydrogène

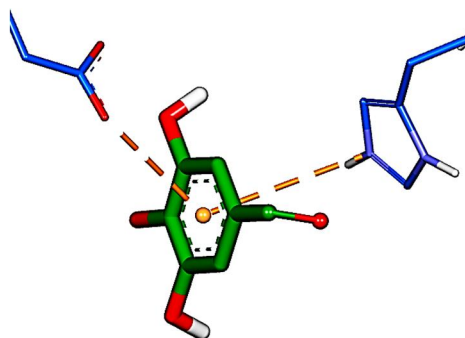
Les liaisons hydrogène sont des liaisons chimiques non covalentes de type dipôle-dipôle entre deux molécules ou entre deux groupements d'une molécule (Bouchagra, 2018). Elles mettent en jeu un atome d'hydrogène lié à un atome donneur de liaison hydrogène qui est plus électronégatif que l'hydrogène, tel que (O, N, F ou dans une moindre mesure C) et un atome accepteur de liaison hydrogène qui est un hétéroatome polarisable (Figure 80). Ce sont des liaisons importantes pour le repliement protéique, les changements conformationnels et la reconnaissance protéine/ ligand (Desaphy, 2013). Leurs énergies sont estimées entre 2 à 4 Kcal/mol, agissant dans les systèmes biologiques à très courte distance. Ils s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°) (Lalout, 2016).



**Figure 80** : Exemple de liaison hydrogène entre l'hydrogène du groupement hydroxyle du ligand (en vert) et l'oxygène d'un acide aminé du récepteur (en bleu)

### 5.2 Interactions ioniques

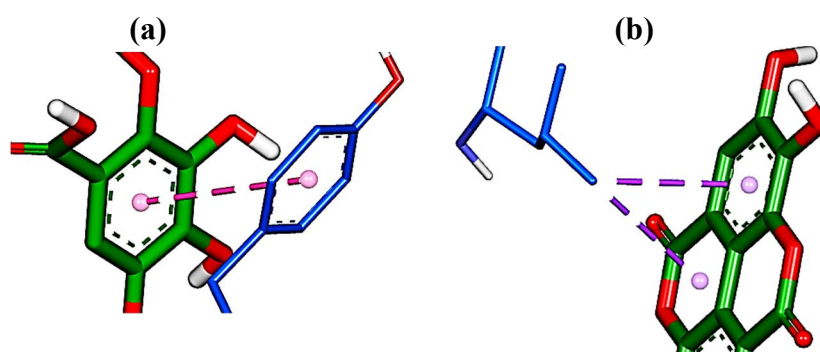
Les interactions ioniques se forment par une force d'attraction électrostatique entre deux atomes de charges opposées (Figure 81). La nature et la force de ces interactions sont très dépendantes du contexte atomique des protagonistes et de leur distance. L'énergie associée à cette interaction est inversement proportionnelle à la distance qui les sépare, impliquant ainsi une composante énergétique favorable à longue distance et par conséquent une reconnaissance protéine/ligand renforcée (Desaphy, 2013).



**Figure 81** : Exemple de de deux interactions électrostatiques, entre le noyau benzénique du ligand (en vert) et deux atome (O et N) de deux acides aminés du récepteur (en bleu).

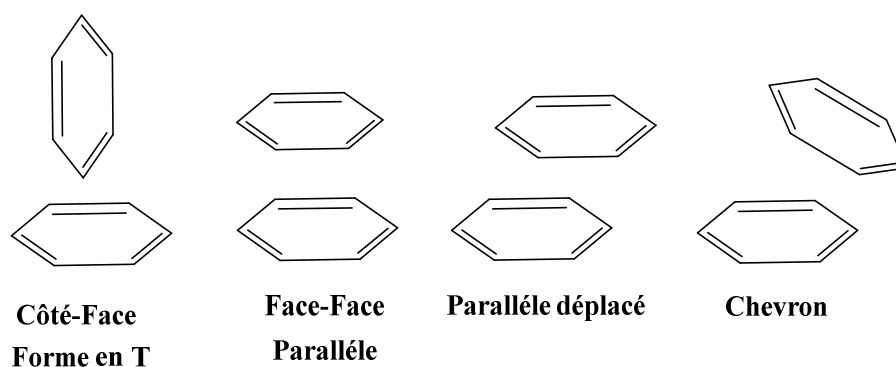
### 5.3 Interactions hydrophobes

Il s'agit d'interactions entre molécules ou groupements peu polaires voir non polaires et qui ont très peu d'affinité pour le solvant où ils sont dissouts tel que l'eau. Les groupements se placent de façon à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau et forment des interactions hydrophobes qui permettent la stabilisation du complexes (**Figure 82**). Il existe divers type d'interactions hydrophobiques tels que les interactions aromatiques entre deux cycles aromatique ou encore entre le centre d'un cycle aromatique et d'un amide ou des groupements méthyle (**Bouchagra, 2018**).



**Figure 82** : Exemple de deux interactions hydrophobes, (a) entre le cycle du ligand (en vert) et un second cycle d'un acide aminé du récepteur (en bleu) et (b) entre deux cycles du ligand (en vert) et l'atome carbone d'un acide aminé du récepteur (en bleu).

Il existe plusieurs types de positionnement entre deux cycles aromatiques (**Figure 83**): la forme en T où un cycle se positionne perpendiculairement au plan et dans l'axe du centre du second; la position parallèle où les deux cycles sont coplanaires; le parallèle déplacé, équivalent au parallèle mais avec un décalage de l'un des deux cycles et la position nommée chevron où les plans des deux cycles ne sont ni parallèles ni perpendiculaires (**Desaphy, 2013**).



**Figure 83** : Les superpositions existantes entre deux cycles aromatiques (Desaphy, 2013).

## 6 Autres paramètres importants dans la réalisation du docking moléculaire

### 6.1 Importance de la structure des protéines

La qualité de la structure des protéines cibles est l'une des éléments indispensables pour l'obtention de résultats fiables lors de la réalisation du docking (Taylor *et al.*, 2003). La source d'information de ces structures provient de l'un de trois techniques expérimentales, la cristallographie aux rayons X, la diffraction des neutrons et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Spyrakis *et al.*, 2010). La cristallographie aux rayons X est la méthode la plus utilisée car elle est relativement moins coûteuse pour obtenir une structure protéique. Par ailleurs, la diffraction des neutrons donne de bonne résolution par rapport à la cristallographie aux rayons X qui permet souvent l'observation directe des positions de l'hydrogène dans les structures. Toutefois, c'est une technique beaucoup plus coûteuse car elles nécessitent une source de neutrons provenant d'un accélérateur. Concernant la RMN, c'est une méthode limitée par la taille des protéines. Cependant, elle permet l'examen de la structure en solution et fournit des informations sur la flexibilité (Spyrakis *et al.*, 2010). En outre, la qualité de ces structures doit être évaluée à l'aide de différents paramètres (Rayar, 2017):

-La **résolution** permet de mesurer la précision avec laquelle le modèle cristallographique reproduit les données expérimentales. Globalement, une valeur inférieure à 2 Å signifie une bonne résolution qui est considérée comme une source de donnée beaucoup plus fiable (Spyrakis *et al.*, 2010). En effet, plus la résolution est élevée, plus il y a de données expérimentales et plus on peut s'attendre à ce que le modèle résultant soit fiable (en termes d'exactitude et de précision). À haute résolution (<1,5 Å), le modèle est proche de plus de 95 % des données expérimentales observées. Cependant, à une faible résolution (> 2,5 Å), les détails de la structure protéique sont beaucoup plus subjectifs (Davis *et al.*, 2003).

-Le facteur R libre ou **R-free** permet d'évaluer le pourcentage de différence entre la structure cristallographique et les résultats des données expérimentales (**Pachoulide, 2021**). **Brünger (1997) (Brünger, 1997)** suggère une valeur seuil de 0,40 pour la valeur R-free, c'est-à-dire que les modèles avec des valeurs de R-free supérieures à 0,40 doivent être traités avec prudence.

-Le **facteur B** également appelé facteur de température car l'une de ses fonctions est la mesure des mouvements des atomes le long des trois axes dus au mouvement thermique isotrope (**Spyrakis et al., 2010**). Il permet aussi de fournir une indication relative utile de la fiabilité des différentes parties du modèle ainsi que les régions pour lesquelles il y a une ambiguïté structurale (**Pachoulide, 2021**). Par exemple, si le facteur-B est élevé, pour une chaîne latérale de lysine, cela signifie généralement que peu ou pas de densité électronique a été observée pour les atomes de cette chaîne latérale et que les coordonnées sont donc moins fiables (**Davis et al., 2003**).

## 6.2 Importance du solvant

Au cours de la simulation moléculaire entre le récepteur et le ligand, la majorité des logiciels de docking ne prennent pas en compte le solvant. Cependant, cette approche est assez éloignée de la réalité si on veut simuler le milieu biologique dans lequel la protéine et le ligand vont entrer en contact. En effet, l'eau joue un rôle primordial dans les interactions ligand-protéine en agissant comme un médiateur de liaison hydrogène lorsqu'ils sont trop éloignés pour interagir directement (**Elkaim, 2011**). Elle peut servir de pont entre la protéine et le ligand permettant ainsi la stabiliser du complexe. Aussi, la disposition des molécules d'eau dans le site actif permet à la protéine d'adopter une conformation pour accueillir le ligand (**Rayar, 2017**). Selon une étude réalisée par (**Søndergaard et al., 2009**) sur 1300 structures plus de 88% ont présenté au moins une molécule d'eau au niveau du site actif à proximité du ligand (dans un rayon de 3.5 Å).

## 7 Logiciel utilisé « AutoDock Vina »

AutoDock Vina est un programme de docking dérivé d'AutoDock4. Il a été développé par le groupe de Arthur J. Olson au " Scripps Research Institute " (<http://autodock.scripps.edu/>) (**Trott et Olson, 2009**). Toutefois, malgré son nom, ce logiciel contient un algorithme de recherche et une fonction de scoring différents de ceux d'Autodock (**Elkaim, 2011**). Son principal objectif est d'être plus rapide et cela en conservant des résultats à la hauteur voire meilleurs qu'AutoDock4. L'algorithme de positionnement des ligands de ce programme est

une application de recherche de type itérative locale (“ Iterated Local Search global optimizer ”) (Martz, 2014). Lors du docking, plusieurs calculs parallèles vont être effectués à partir de conformations aléatoires, suivie d’une étape d’optimisation locale réalisée selon la méthode Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS). Les résultats de tous les calculs sont ensuite rassemblés et classés en fonction de leur score (Elkaim, 2011). La fonction de scoring d’Autodock Vina et de type hybride, combine la fonction de score empirique et la fonction “ knowledge-based ” (Trott et Olson, 2009), lui conférant la possibilité de déterminer les valeurs d’affinité des ligands et les préférences conformationnelles des complexes (Elkaim, 2011).

## 8 Matériels et Méthodes

### 8.1 Etape de docking moléculaire

La procédure de docking moléculaire à mettre en place pour prédire les interactions, démontrer l’affinité, la distance des liaisons et l’énergie d’interaction entre un ligand et son récepteur est présentée dans la **figure suivante** :

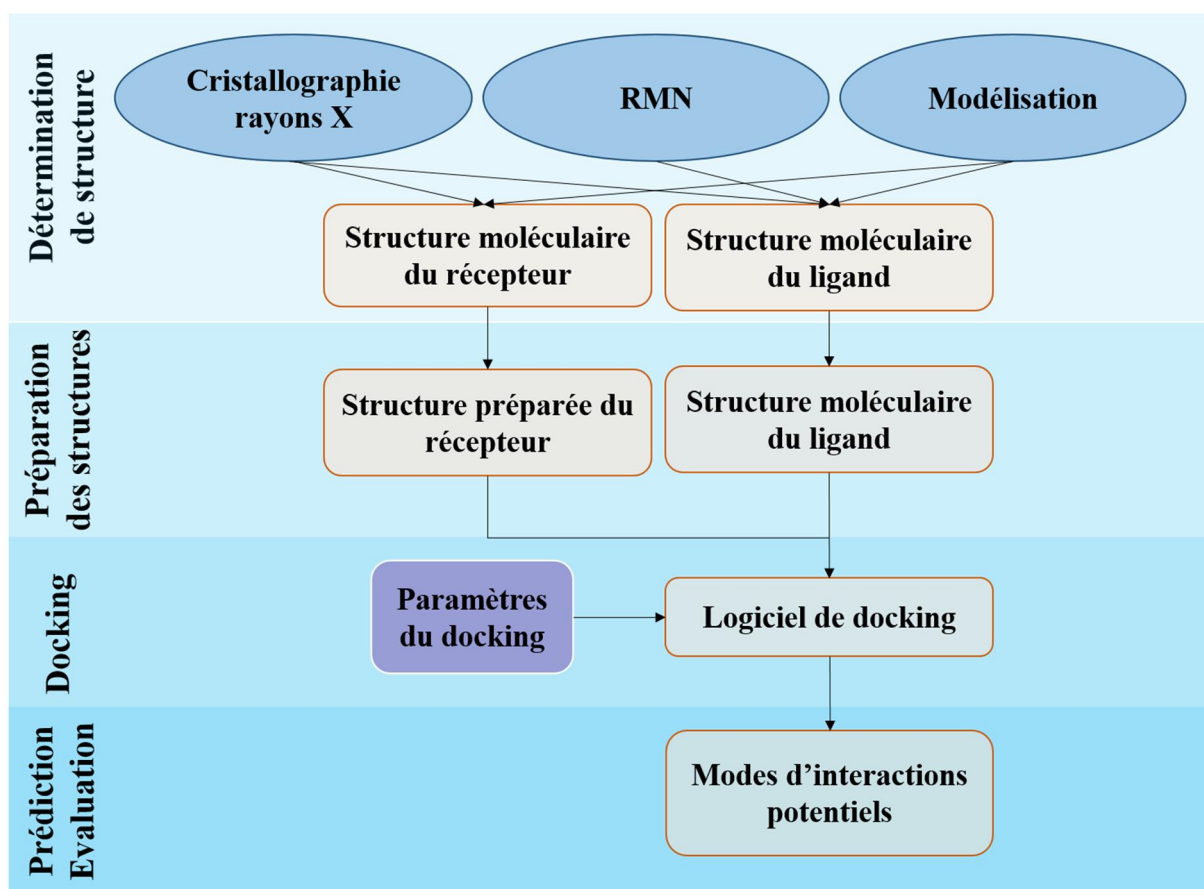


Figure 84 : Etapes de la procédure du docking moléculaire (Grosdidier, 2007).

### 8.1.1 Détermination des structures

#### 8.1.1.1 Protéines cibles (Récepteurs)

Dans cette étude, nous avons choisi comme enzyme :  $\alpha$ -amylase provenant de la moisissure (*Aspergillus oryzae*) et acétylcholinestérase humaine (HuAChE). Les structures cristallines de  $\alpha$ -amylase (PDB ID : 7TAA) et de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE) (PDB ID : 6O4W) ont été téléchargées à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Le modèle HuAChE a été pris en compte car seule trois structures de l'EeAChE sont déposées avec les codes PDB 1C20, 1C2B (Bourne *et al.*, 1999) et 1EEA. Ces structures ne peuvent pas être considérées comme des modèles de bonne qualité selon les critères rapportés dans la littérature (Warren *et al.*, 2012). De plus, les modèles utilisés des deux enzymes ont été choisi en tenant compte de certains paramètres, tels que l'absence de mutation, la présence d'un ligand réversible, la résolution et la valeur R libre (R-free) (Blow, 2002; Bortolami *et al.*, 2020; Warren *et al.*, 2012). Leur structure tridimensionnelle a été obtenue par cristallographie aux rayons X. L'enzyme HuAChE a été simplifié, en retenant seulement un monomère pour la simulation moléculaire. Le tableau suivant résume les données cristallographiques des deux enzymes.

**Tableau 21** : Données cristallographique des deux enzymes.

Enzymes	Origine	Classification	Ligands de Co-Cristallisation	Chaîne	Résolution	R-free	Référence
$\alpha$ -amylase (7TAA)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hydrolase	Acarbose, Ca <sup>+2</sup>	A	1,98 Å	0,23 6	(Brzowski et Davies, 1997)
HuAChE (6O4W)	Humaine	Hydrolase	Donepezil, Glycérol et NO <sub>3</sub>	A, B	2,35 Å	0,18 6	(Gerlits <i>et al.</i> , 2019)

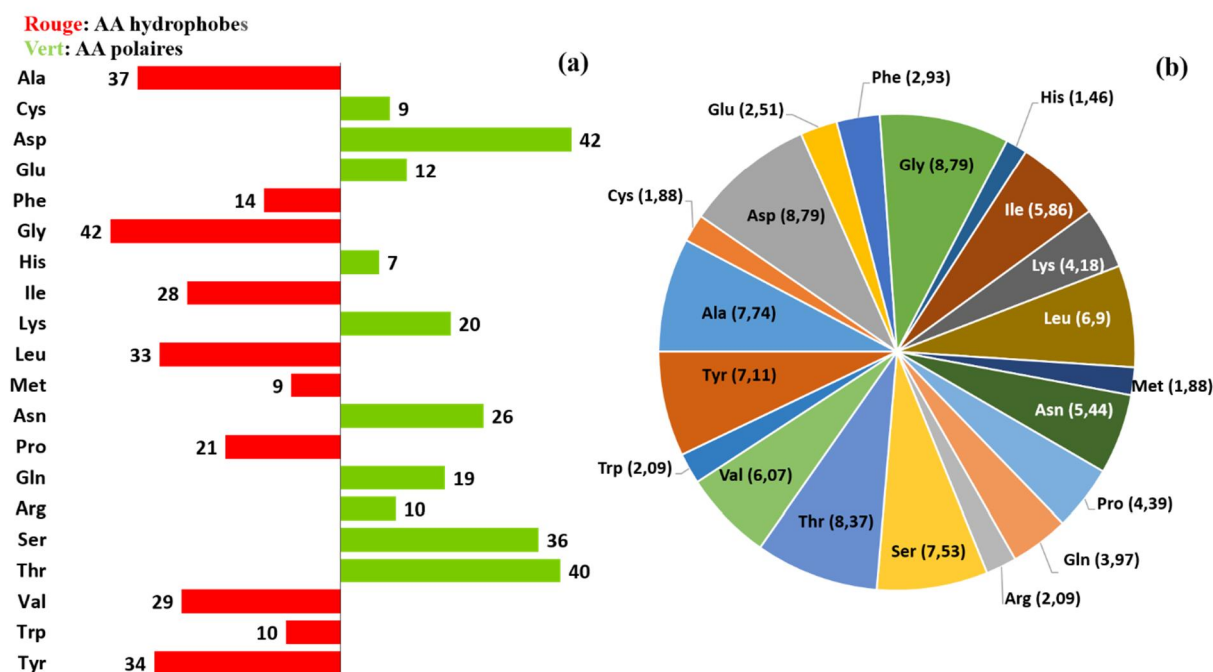
#### 8.1.1.2 Composition des acides aminés des deux enzymes

Afin de déterminer la composition en acides aminés hydrophobes et polaires des deux séquences protéiques, nous avons téléchargé les séquences des deux enzymes (format FASTA) à partir de la base de données Protein Data Bank et utilisé le logiciel BioEdit (Hall, 2004).

##### 8.1.1.2.1 $\alpha$ -amylase

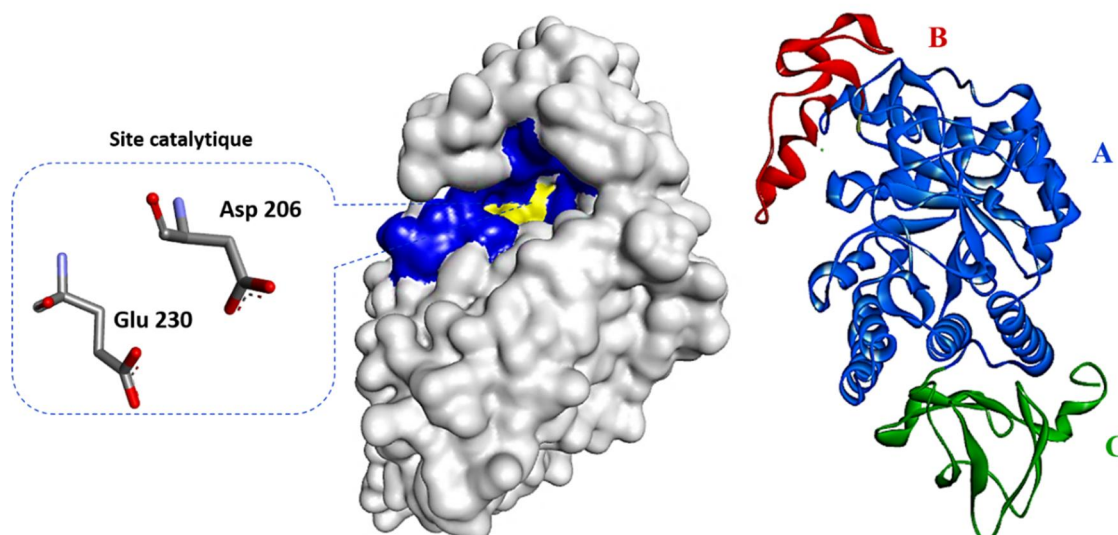
$\alpha$ -amylase fongique (PDB code: 7TAA) est une enzyme qui comprend une seule chaîne de 478 résidus avec un poids moléculaire (PM) de 52486,52 Daltons. La répartition des AA selon le caractère de polarité a montré que l'enzyme est composée de 223 AA hydrophobes avec un pourcentage molaire de 46,65 % et 255 AA polaires avec un pourcentage molaire de 53,35 %.

Il est à noter que les AA hydrophobes majoritaires sont Gly et Ala avec un nombre de 42 et 37 et un pourcentage molaire de 8,79 % et 7,74 %, respectivement. Tandis que, les AA polaires dominants sont Asp et Thr avec un nombre de 42 et 40 et un pourcentage molaire de 8,79 % et 8,37 %, respectivement (**Figure 85**).



**Figure 85** : Le nombre de chaque acide aminé (a) et le pourcentage molaire (b) de  $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA)

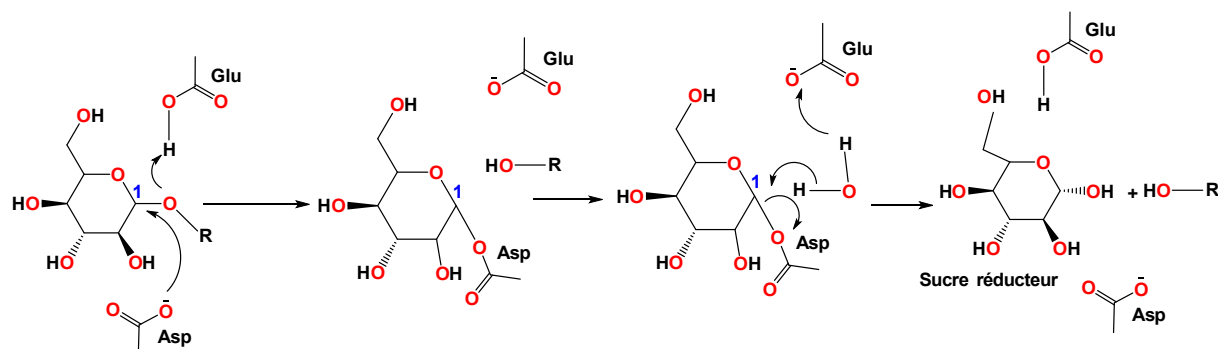
L' $\alpha$ -amylase est un métalloenzyme calcique, contenant un ion calcium. Cet ion ne participe pas directement à la formation de complexe enzyme-substrat mais il permet le maintien de l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité (Noudri, 2011). Structuellement, l' $\alpha$ -amylase fongique se divise en trois domaines : A, B et C (**Figure 86**). Le domaine A contient le site actif qui est composé de deux résidus (Asp206, Glu230) et il est lié au domaine C en feuille  $\beta$  à huit brins C-terminal. Le troisième domaine B joue un rôle dans la stabilité de l'enzyme et dans la liaison. L'interface entre les domaines A et le B est maintenu par un site calcique. Ce dernier est constitué par des résidus tels que : Asp175, Asn121, Glu162, His122 et His210. En plus, d'autres résidus peuvent aussi intervenir dans la liaison tel que : His80, His296, Lys209, Tyr82, Trp83, Gly234, Asp297, Asp340, Arg344 et Gln35 (Brzowski et Davies, 1997).



**Figure 86** : Structure tridimensionnelle et les acides aminés du site catalytique de de  $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA).

### -Mécanisme d'action

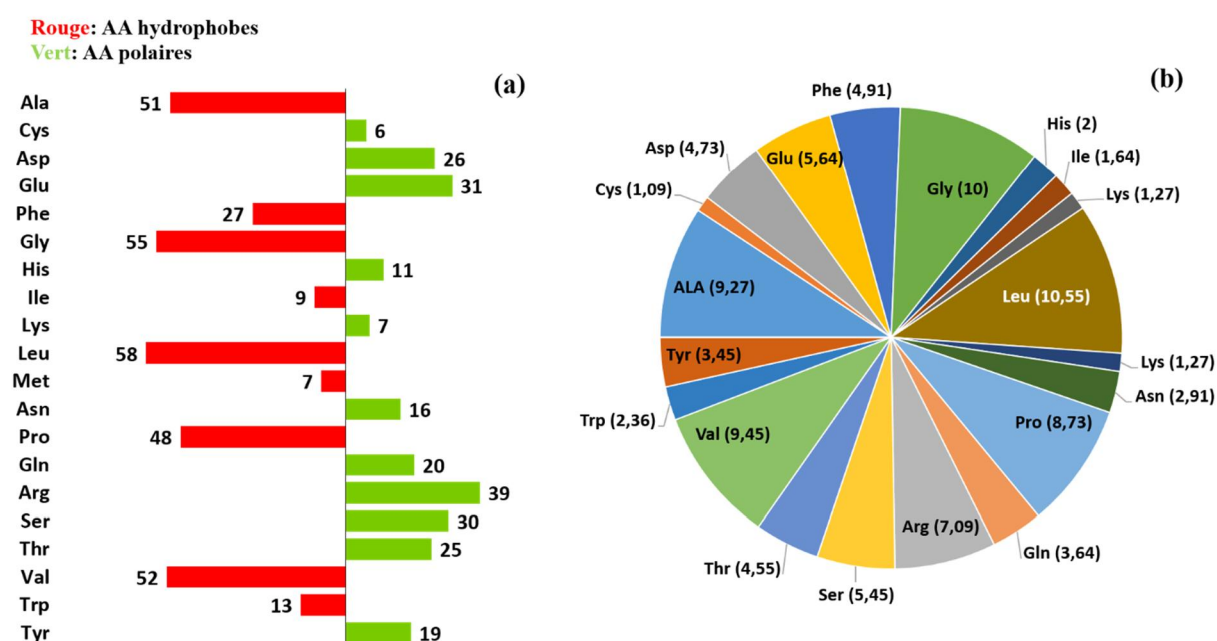
L'hydrolyse de la liaison osidique nécessite la participation de deux acides aminés du site actif: un donneur de protons (Glu) et un nucléophile (Asp) (**Davies et Henrissat, 1995**). Cette réaction fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre ces résidus et le substrat (**Noudri, 2011**)(**Figure 87**). Le groupe carboxylique du résidu acide/base (Glu) cède un proton à l'oxygène de la liaison osidique. En même temps, le carbone C1 du sucre est attaqué par le nucléophile (Asp), produisant un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme et aussi libérant la partie réductrice du substrat. Par la suite, une molécule d'eau est activée par l'acide aminé déprotoné (Glu), permettant ainsi la libération du sucre par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de Asp et le C1 du sucre (**Davies et Henrissat, 1995; Maktouf, 2013; Nielsen et al., 2001**).



**Figure 87**: Mécanisme d'action de l' $\alpha$ -amylase (**Davies et Henrissat, 1995**).

### 8.1.1.2.2 Acétylcholinesterase

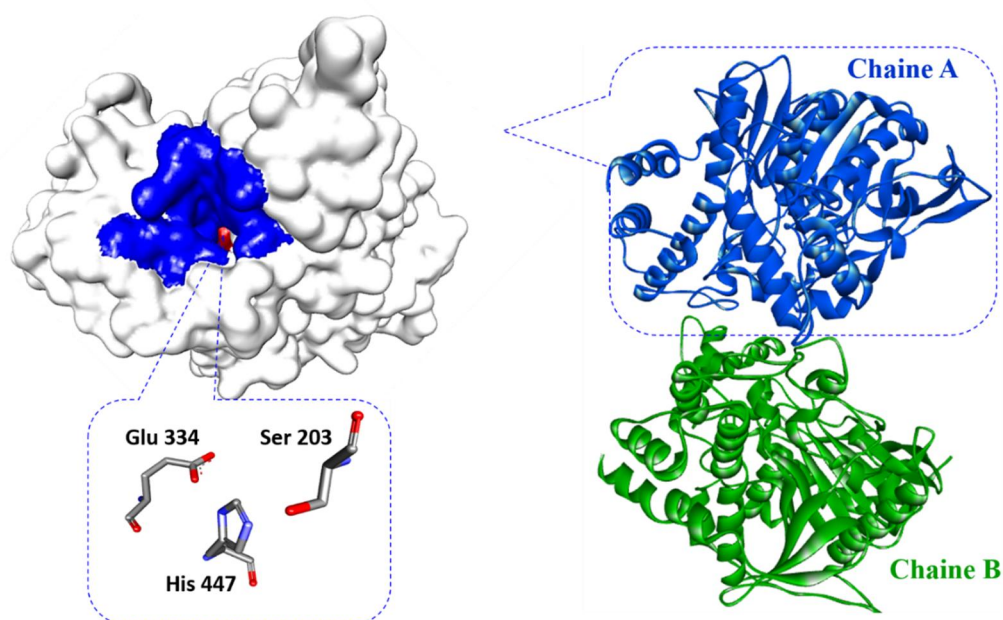
HuAChE (code PDB : 6O4W) est constitué de deux chaînes peptidiques similaires ayant chacun un nombre de 550 résidus et un poids moléculaire de 60228,06 Daltons. La chaîne A de HuAChE est composée de 320 AA hydrophobes et 230 AA polaires avec des proportions molaires de 58,18% et 41,82%, respectivement. De plus, cette enzyme est composée d'une grande partie d'AA hydrophobes tels que Leu, Gly, Val et Ala avec un nombre de 58, 55, 52 et 51 et un pourcentage molaire de 10,55 %, 10%, 9,45% et 9,27%, respectivement. En revanche, les AA polaires majoritaires sont Arg, Glu et Ser avec un nombre de 39, 31 et 30 et un pourcentage molaire de 7,09%, 5,64% et 5,45%, respectivement (**Figure 89**).



**Figure 89 :** Le nombre de chaque acide aminé (a) et le pourcentage molaire (b) de HuAChE (code PDB : 6O4W).

Le monomère de l'AChE est un repliement de modèle  $\alpha/\beta$  hydrolase, constitué de 15 hélices  $\alpha$  et 11 feuillets  $\beta$ . Le dimère de l'enzyme est formé par l'union de deux hélices  $\alpha$  de chaque monomère garantissant sa stabilité (**Figure 90**) (**Benamar, 2016**). L'étude structurale de l'HuAChE a révélé qu'elle a un site actif de 20 Å de profondeur (**Sussman *et al.*, 1991**). Ce site contient une triade catalytique (Ser203, His447, Glu334) situé au fond d'une gorge profonde et étroite (**Bortolami *et al.*, 2020**), mais aussi un deuxième site (site anionique) ou site périphérique situé à l'interface du site catalytique et contient de nombreuses chaînes latérales aromatiques constituées de résidus tels que Trp86, Trp286 et Tyr337, (**Bortolami *et al.*, 2020**;

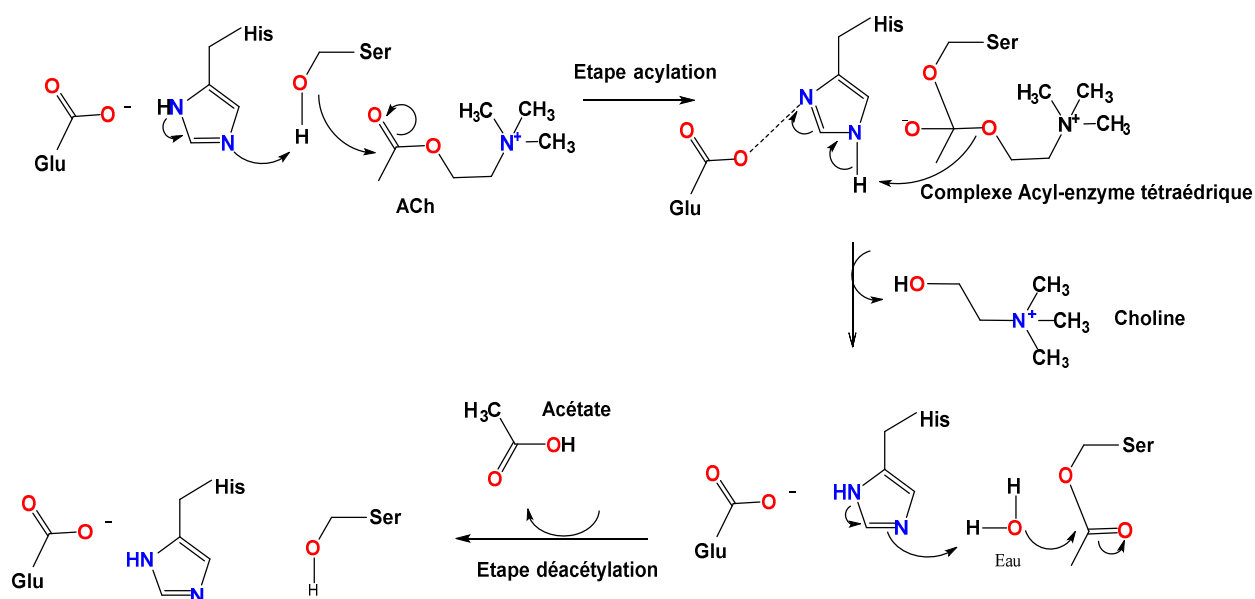
**Cheung *et al.*, 2013**). Ce site périphérique contribue à l'efficacité catalytique en orientant les molécules vers le site catalytique (**Cheung *et al.*, 2013; Szegletes *et al.*, 1999; Tara *et al.*, 1998**). De plus, d'autres résidus et molécules d'eau peuvent intervenir dans les interactions pour stabiliser le ligand tels que: Phe295, Phe338, Tyr72, Tyr341, Ser293 (**Gerlits *et al.*, 2019**).



**Figure 90** : Structure tridimensionnelle et les acides aminés du site catalytique de HuAChE (code PDB : 6O4W).

### -Mécanisme d'action

L'hydrolyse de l'acétylcholine s'effectue en deux étapes (**Figure 91**). Dans un premier temps, le groupement acétyle de l'ACh se lie à l'oxygène de la Ser et l'His se fixe au proton de la Ser pour former le complexe acyl-enzyme tétraédrique. Quant au Glu, il polarise et maintient l'His dans une position convenable aux transferts des protons, suivi de la libération de la choline lors de sa fixation avec de ce proton. Cette étape est appelée étape de l'acylation. La deuxième étape (étape de déacylation) fait intervenir une molécule d'eau pour libérer l'acétate de la Ser (**Benamar, 2016**).



**Figure 91** : Mécanisme d'action de l'Acétylcholinestérase (Benamar, 2016; Bennion *et al.*, 2015).

### 8.1.1.3 Ligands

Toutes les molécules identifiées à partir des galls de *Pistacia atlantica* ainsi que les principes actifs des deux médicaments, l'un traitant le diabète de type 2 (acarbose) et l'autre ralentissant les effets de l'Alzheimer (donépézil) ont été téléchargées à partir de la base de données PubChem (Kim *et al.*, 2016), à l'exception de la molécule digallate de méthyle qui a été préparée par le logiciel Chem3D (version 15.0). De plus, la règle de cinq de Lipinski a également été analysée pour confirmer l'efficacité de la structure des ligands. Le data mining de ces ligands a été appliqué à partir du logiciel Knime (<http://www.knime.org/>) (Figure 92).

**Figure 92** : Data mining des ligands à partir du le logiciel Knime.

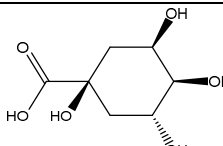
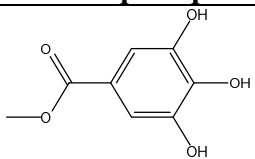
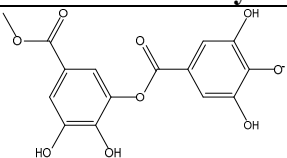
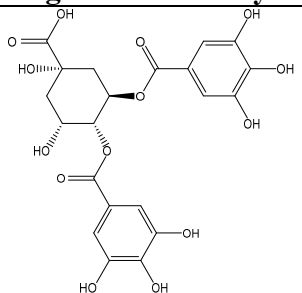
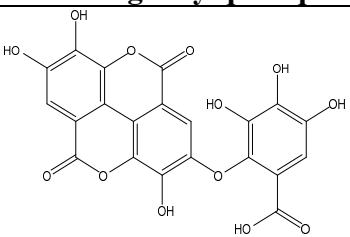
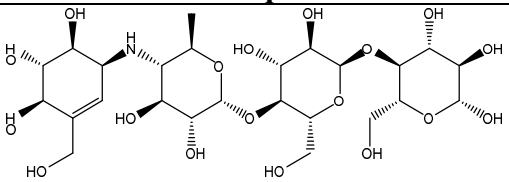
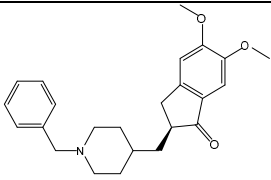
Le Konstanz Information Miner (KNIME) est un logiciel qui prend en charge un large éventail de fonctionnalités notamment dans le domaine de la chimie et de la bio-informatique (Beisken *et al.*, 2013). Les nœuds « nodes » représentent des instructions liées entre elles,

chaque exécution réussite (nœud) permet de sortir et d'entamer une autre exécution (le nœud suivant) (Gally *et al.*, 2017). Pour l'application de la règle de cinq de Lipinski sur les ligands étudiés plusieurs nœuds ont été employés (Bouchareb, 2016):

- Le premier nœud utilisé pour la lecture des fichiers de ligands.
- Le deuxième nœud pour analyser et afficher les structures.
- Le troisième nœud pour additionner l'hydrogènes manquants au niveau des structures.
- Le quatrième nœud pour calculer la valeur de XLog de chaque ligand.
- Le cinquième nœud pour filtrer les structures.
- Le sixième nœud pour regrouper les données obtenues après l'exécution des nœuds au-dessus.
- Le septième nœud pour donner les 5 paramètres de la règle cinq de Lipinski.

Le **tableau 22** résume les différentes informations structurales de ces ligands.

Tableau 22 : Résultats de la règle de Lipinski des molécules testées.

Molécules	PM <sup>a</sup> (g/mol)	Xlog	DLH <sup>b</sup>	ALH <sup>c</sup>	LR <sup>d</sup>
 <b>Acide quinique</b>	192,17	-1,97	5	6	1
 <b>Gallate de méthyle</b>	184,15	1,33	3	5	2
 <b>Digallate de méthyle</b>	335	2,45	4	9	4
 <b>Acide digalloylquinique</b>	496,4	1,09	9	14	7
 <b>Acide valonique dilactone</b>	470,30	3,54	7	13	3
 <b>Acarbose</b>	645,6	-8,5	14	19	9
 <b>Donépézil</b>	379,5	4,3	0	4	6

PM<sup>a</sup> : poids moléculaire, DLH<sup>b</sup> : nombre de donneurs de liaisons hydrogène, ALH<sup>c</sup> : nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène, LR<sup>d</sup> : liaison rotative.

## 8.1.2 Préparation des structures

### 8.1.2.1 Préparation des protéines cibles

Pour l'amarrage, les protéines ont été préparées en éliminant les molécules d'eau inutiles, les hétéroatomes et les ligands. Des molécules d'eau spécifiques impliquées dans les interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme ont été définies. Ainsi, les hydrogènes polaires et les charges partielles ont été ajoutés à la structure à l'aide des outils Autodock (ADT) (version 1.5.6) (Martins *et al.*, 2011).

### 8.1.2.2 Préparation des ligands

Toutes les molécules ont été assemblées avec le logiciel Discovery Studio (version 20.1). Des torsions flexibles dans les ligands ont été attribuées et les angles dièdres acycliques ont été autorisés à tourner librement à l'aide des outils Autodock (ADT) (version 1.5.6) (Martins *et al.*, 2011).

## 8.1.3 Analyse et visualisation du docking moléculaire

L'étude docking moléculaire a été réalisée à l'aide du programme AutoDock Vina (Trott et Olson, 2009). Dans ce programme, les ligands sont flexibles tandis que les protéines sont considérées comme une structure rigide. Le logiciel utilise des boîtes rectangulaires pour le site de reliure. La grille pour chaque enzyme a été établie avec des points de grille séparés de 1 Å et positionnée au milieu du site actif. Les valeurs des paramètres de la boîte de grille pour  $\alpha$ -amylase ont été ajustées comme  $x = 36,894$ ,  $y = 43,262$ ,  $z = 24,886$  avec taille (24x24x24). De même, pour HuAChE, les valeurs de grille ont été ajustées comme  $x = 88,200$ ,  $y = 79,590$ ,  $z = -15,580$  avec une taille de (26x28x22). Le nombre de conformations de sortie a été défini sur un. De plus, le nombre de tours d'amarrage a été fixé à 50 tours de façon aléatoire. La visualisation graphique en 2D et en 3D de tous les complexes d'amarrage a été réalisée à l'aide du logiciel Discovery Studio (version 20.1).

*Chapitre*

---

4

***Résultats et Discussion  
de l'étude in silico***

## 1 Résultats et discussion

### 1.1 Simulation d'amarrage moléculaire

L'étude de l'activité inhibitrice *in vitro* des extraits méthanoliques des galles de *Pistacia atlantica* envers l'enzyme  $\alpha$ -amylase et acétylcholinestérase, nous a incité à explorer les molécules bioactives et à réaliser une simulation d'amarrage (docking) en ciblant le site actif de la structure cristalline des deux enzymes (PDB ID : 7TAA et 6O4W) et en étudiant la nature, le type et l'affinité de liaison adoptée par les ligands. La stabilité du complexe récepteur-ligand s'effectue par une évaluation de la complémentarité chimique. Celle-ci tient compte des interactions chimiques telles que les liaisons hydrogènes (Arunan *et al.*, 2011), les charges électrostatiques (McCoy *et al.*, 1997) ou encore les interactions hydrophobes (Blalock et Smith, 1984). Nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage pour chaque inhibiteur, en fonction du nombre de répétitions et de l'énergie de liaison minimale existant dans 50 solutions.

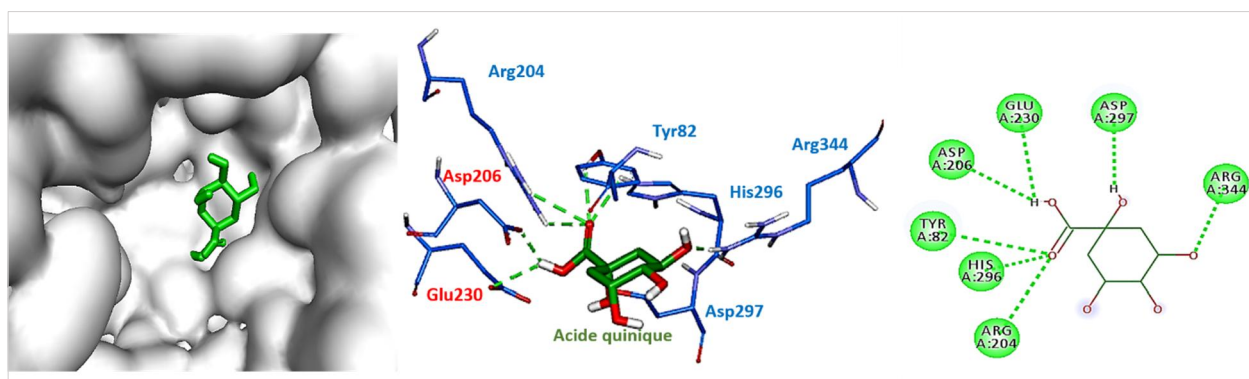
#### 1.1.1 Amarrage moléculaire pour $\alpha$ -amylase

L'énergie de liaison obtenu entre  $\alpha$ -amylase et les inhibiteurs testés est compris entre -9,5 et -5,7 kcal / mol. Le composé 5 a donné une meilleure affinité (-9,5 kcal / mol). Tandis que les autres composés 3, 4, acarbose, 2 et 1 ont enregistré un score énergétique de -8,6 kcal / mol, -8,5 kcal / mol, -8,5 kcal / mol, -6,2 kcal / mol et -5,7 kcal / mol, respectivement. Les détails des interactions des molécules : acide quinique (1), gallate de méthyle (2), digallate de méthyle (3), acide digalloylquinique (4), acide valoneique dilactone (5) et l'acarbose avec  $\alpha$ -amylase sont résumés dans le **tableau 23**. Le résultat de la conformation des ligands a montré que l'inhibiteur 5 a obtenu une répétition avec un taux de 100%, suivi des molécules 4, 2, acarbose, 3 et 1 qui ont eu un taux de répétition égal à 96%, 94%, 94%, 72% et 54%, respectivement.

Tableau 23 : Résultats du docking moléculaire pour l' $\alpha$ -amylase (PDB : 7TAA).

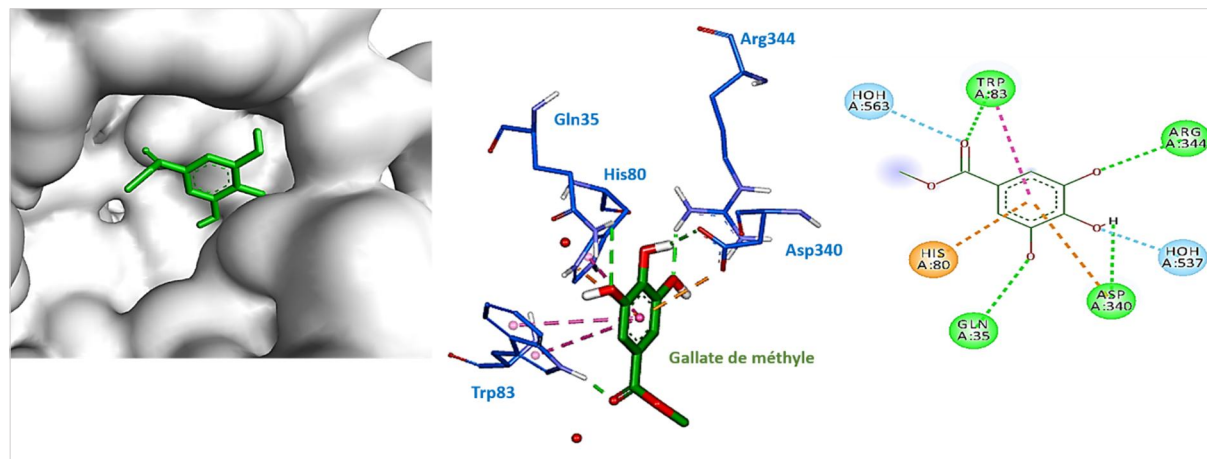
Molécules	Nbre de répétition (%)	EL (kcal/mol)	Catégorie	Types	Résidus	Distance (Å)	
Acide quinique (1)	54	-5,7	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Arg204 (2)	2,90/2,42	
				/	His296	2,45	
				/	Arg344	1,88	
				/	Tyr82	2,38	
				/	Glu230	2,61	
				/	Asp206	2,21	
Gallate de méthyle (2)	94	-5,9	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Trp83	1,36	
				/	Gln35	2,94	
				/	Arg344	2,06	
				/	Asp340	2,20	
				Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ T- shaped	Trp83 (2)	5,12/5,32
					$\pi$ - $\pi$ Stacked	His80	4,61
Digallate de méthyle (3)	72	-8,6	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Arg204	2,86	
				/	His122	2,66	
				/	Arg344 (2)	2,13/2,24	
				/	Asp297	2,41	
				/	Tyr82	2,98	
				Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ Stacked	His80	4,80
	/	Tyr82	3,98				
	$\pi$ - $\pi$ T-shaped	Trp83	5,19				
Acide digalloylquinique (4)	96	-8,6	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Arg204	2,86	
				/	His122	2,66	
				/	Arg344 (2)	2,13/2,24	
				/	Asp297	2,41	
				/	Tyr82	2,98	
				Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ Stacked	His80	4,80
	/	Tyr82	3,98				
	$\pi$ - $\pi$ T-shaped	Trp83	5,19				
Acide valoneique dilactone (5)	100	-9,5	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Trp83	2,69	
				/	His210	2,15	
				/	Arg344	2,08	
				/	Asp206 (2)	2,34/2,37	
				/	Glu230	2,73	
				Electrostatique	$\pi$ - Anion	Glu230 (2)	4,10/4,26
	/	Asp297	3,60				
Acarbose	94	-8,2	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Trp83 (2)	2,11/2,68	
				/	Asp206	2,15	
				/	Arg344 (2)	2,26/2,54	
				/	Asp340	2,56	
				/	Asp297	2,68	
				/	Asn339	2,98	

L'acide quinique (**composé 1**) est un composé phénolique qui contient dans sa structure cinq groupements hydroxyles et un atome d'oxygène, ces derniers peuvent soit agir comme des accepteurs ou bien des donneurs de proton formant des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif de l'enzyme. En effet, il a interagi avec les deux résidus catalytiques de l'enzyme (Asp206 et Glu230) et avec quatre autres résidus du site de liaison (Arg204 (double liaison), His296, Arg344 et Asp297) par une liaison hydrogène. La longueur des liaisons hydrogène étaient de 2,21 Å, 2,61 Å, (2,42 Å, 2,90 Å), 2,45 Å, 1,88 Å et 2,75 Å, respectivement. Les interactions observées entre le site actif de l'enzyme et l'acide quinique sont présentés dans la **figure 93**.



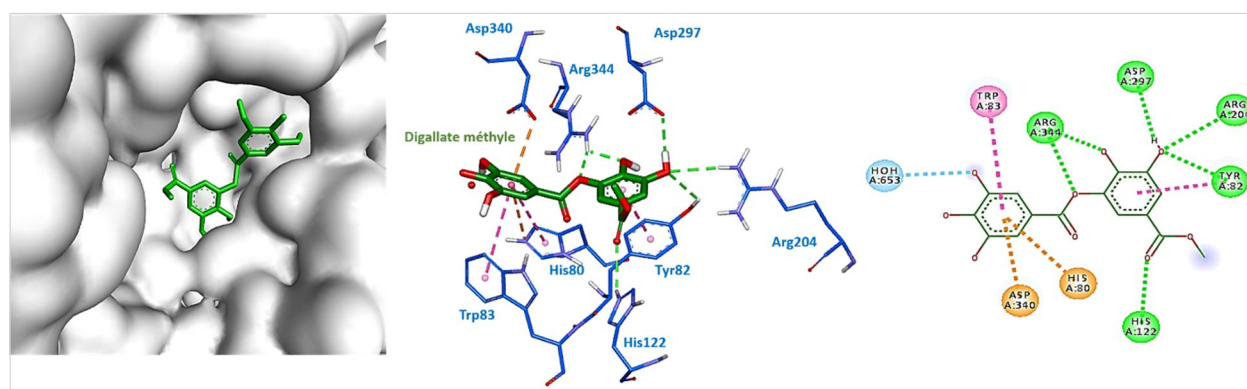
**Figure 93** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide quinique au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Azyzae*.

Quant au gallate de méthyle (**composé 2**) qui renferme trois groupements hydroxyles et un atome d'oxygène a formé quatre liaisons hydrogène avec des acides aminés du site de liaison (Gln35= 2,94 Å, Trp83= 1,36, Arg344= 2,06 Å et Asp340= 2,20 Å) et deux liaisons avec deux molécules d'eau (HOH537= 2,13 Å et HOH563= 2,59 Å). De plus, il contient un cycle aromatique, ce qui a permis la production de cinq interactions, trois sont hydrophobes (une de type  $\pi$ - $\pi$  stacked avec His80= 4,61 Å et deux de type  $\pi$  -  $\pi$  T- shaped avec Trp83 (double liaison ; 5,32 Å et 5,12 Å)) et deux autres sont électrostatiques (de type  $\pi$ -cation et  $\pi$  -anion avec His80= 4,02 Å et Asp340= 3,96 Å) (**Figure 94**).



**Figure 94** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de gallate de méthyle au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Aryzae*.

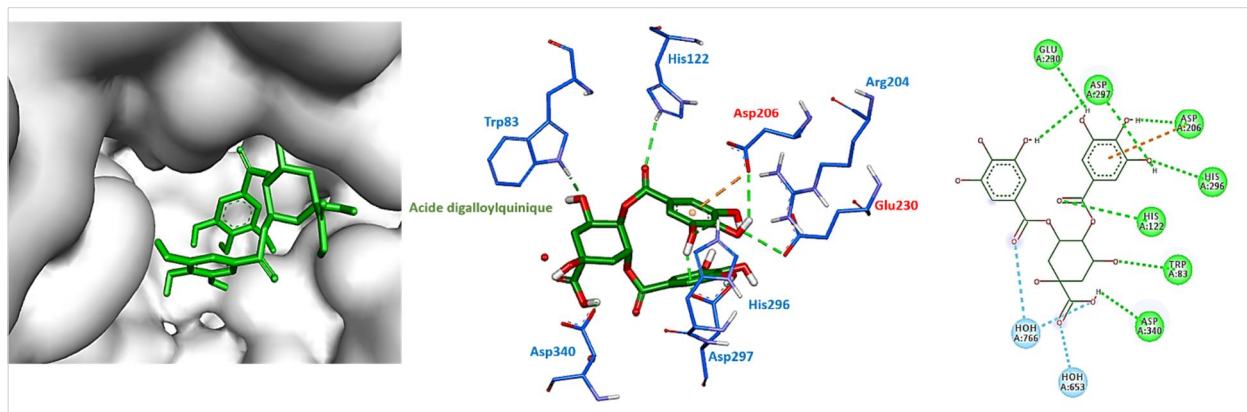
Pour le digallate de méthyle (**composé 3**), il comporte quatre groupements hydroxyles et trois atomes d'oxygènes. Les résultats ont montré qu'il a formé six liaisons hydrogène au niveau des résidus Tyr82, His122, Arg204, Arg344 (2), Asp297 à des distances qui ont varié de 2,13 Å à 2,98 Å et une liaison avec une molécule d'eau (HOH653= 2,71 Å). Également, il y a eu d'autres interactions avec les cycles benzéniques telles que : trois interactions hydrophobes (deux de type  $\pi$ -  $\pi$  stacked avec His80 (4,90 Å) et Tyr82 (3,98 Å) et une de type  $\pi$ -  $\pi$  T-shaped avec Trp83 (5,19 Å)) et deux autres électrostatiques (une de type  $\pi$ -cation avec His80= 4,18 Å et l'autre de type  $\pi$ -anion avec Asp340= 3,89 Å) (**Figure 95**).



**Figure 95** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de digallate de méthyle au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Aryzae*.

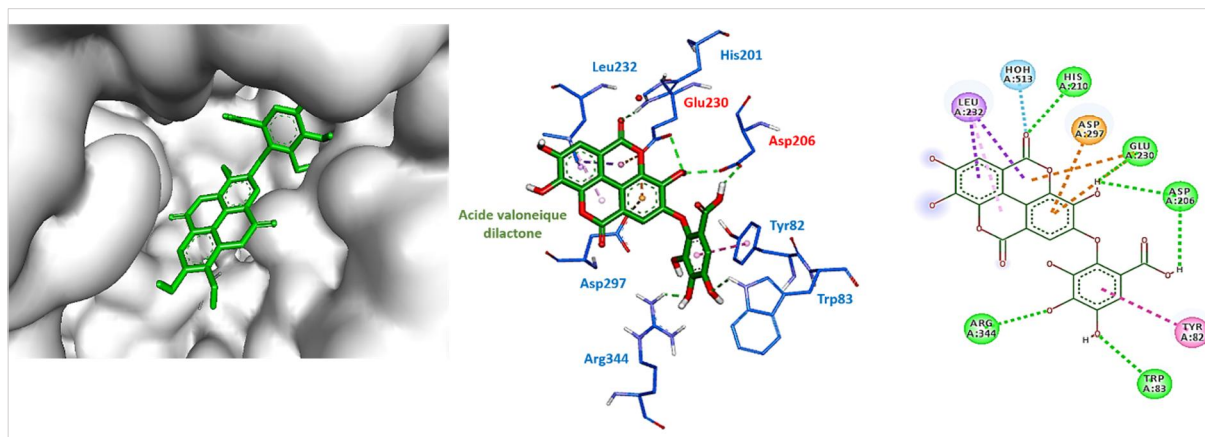
Concernant l'acide digalloylquinique (**composé 4**) qui renferme neuf groupements hydroxyles et trois atomes d'oxygènes, a occupé le site actif en interagissant avec sept résidus dont deux sont des acides aminés catalytiques tels que : Trp83, His122, His296, Asp297 (2), Asp206, Glu230, Asp340. Huit liaisons hydrogène ont été établies avec les résidus Trp83 (2,03 Å), His122 (2,63

Å), His296 (2,85 Å), Asp297 (2 ; 1,87 Å/ 2,25 Å), Asp206 (2,65 Å) et Glu230 (2,90 Å). De plus, il y a eu quatre liaisons hydrogène avec deux molécules d'eau (HOH653 (2,33 Å) et HOH766 (3 ; 1,91 Å/ 2,71 Å/ 3,05 Å) et une interaction électrostatique avec Asp206 (de type  $\pi$ -anion ; 3,65 Å), La **figure 96** montre les interactions entre le site actif de l'enzyme et l'acide digalloylquinique.



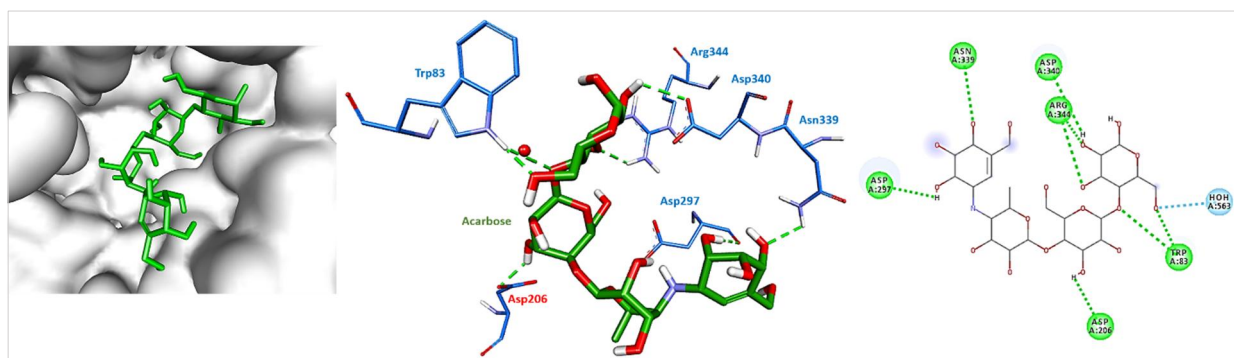
**Figure 96** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide digalloylquinique au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Azyae*.

L'acide valoneique dilactone (**composé 5**) est largement entouré de résidus tels que Trp83, His210, Arg344, Asp206, Glu230, Asp297, Leu232 et Tyr82. C'est un composé phénolique qui contient sept groupements hydroxyles et deux atomes d'oxygènes. Les résultats ont enregistré six liaisons hydrogène formées avec des résidus dont deux du site catalytique Trp83 (2,69 Å), His210 (2,15 Å), Arg344 (2,08 Å) Asp206 (2 ; 2,34 Å/ 2,37 Å) et Glu230 (2,73 Å) et deux liaisons hydrogène formées avec HOH513 (2 ; 2,24 Å/ 2,29 Å). Trois interactions électrostatiques de type  $\pi$ -anion ont été identifiées deux avec Glu230 (4,10 Å / 4,26 Å) et une avec Asp297 (3,60 Å). De plus. Quatre autres hydrophobes ont été formées, deux de type  $\pi$ -sigma avec Leu232 (3,70 Å / 3,92 Å), une de type  $\pi$ -alkyl avec Leu232 (5,35 Å) et une dernière de type  $\pi$ - $\pi$  stacked avec Tyr82 (4,43 Å). Les différentes interactions observées entre le site actif de l'enzyme et l'acide valoneique dilactone sont présentés dans la **figure 97**.



**Figure 97** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide valonique dilactone au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Aryzae*.

L'acarbose est un principe actif employé pour traiter le diabète de type 2. Son mode de liaison avec le site actif montre qu'il y a huit liaisons hydrogène dont un avec un acide amine du site catalytique, quatre groupes hydroxyles interagissent avec les résidus Asp206 (2,15 Å), Arg344 (2,26 Å), Asp340 (2,56 Å) et Asp297 (2,68 Å) et les quatre autres résidus Trp83 (2 ; 2,11 Å / 2,68 Å), Arg344 (2,54 Å) et Asn339 (2,98 Å) interagissent avec l'atome d'oxygène du ligand. Une liaison hydrogène supplémentaire a été trouvée avec une molécule d'eau HOH563 (2,51 Å), La **figure 98** présente les interactions entre le site actif de l'enzyme et l'acarbose.



**Figure 98** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acarbose au site actif de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus Aryzae*,

La visualisation des résultats du docking montre que les complexes formés entre l'enzyme (7TAA) et les ligands ont été stabilisés au sein du site actif principalement par des liaisons hydrogène, suivi de plusieurs interactions hydrophobes et électrostatiques. L'attention est souvent placée sur l'interaction et la longueur des liaisons hydrogène en raison de leurs rôles clés dans la reconnaissance moléculaire, la catalyse et la stabilité structurelle du système biologique (Ogunwa et Ayenitaju, 2017; Senthil *et al.*, 2019). Selon (Imberty *et al.*, 1991) lorsque les distances entre

ligands et les acides aminés varient entre :  $2,5 \text{ \AA} < R < 3,1 \text{ \AA}$  c'est une interaction forte ; entre  $3,1 \text{ \AA} < R < 3,55 \text{ \AA}$  c'est une interaction moyenne et lorsque  $R > 3,55 \text{ \AA}$  c'est une interaction faible, Sur la base de l'observation de nos résultats (Tableau 24), la plupart des interactions des complexes protéines-ligands ont plus de cinq liaisons hydrogène et une longueur qui varie souvent de  $2,5 \text{ \AA}$  à  $3,1 \text{ \AA}$ . De plus, l'une des liaisons hydrogène estimée la plus importante est celle qui se forme avec les résidus du site catalytique de la protéine, renforçant ainsi l'idée que la fixation de l'inhibiteur sur ce résidu est bien responsable de l'inhibition de l'enzyme. D'après les études de (Milella *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019), il peut y avoir deux modes de liaisons avec l'enzyme digestive  $\alpha$ -amylase ; soit les inhibiteurs se lient aux acides aminés situés dans la « poche », ce qui est considéré comme une inhibition compétitive. En effet, d'après la théorie du « verrou et clé », le substrat se lie d'abord au centre du site actif de l'enzyme avant que les acides aminés catalytiques ne rompent la liaison glycosidique. Ou encore, les inhibiteurs se lient avec des résidus en dehors du centre actif qui sont importants pour maintenir la conformation de l'enzyme. Ces inhibiteurs peuvent donc fermer le canal, empêchant ainsi l'entrée du substrat et ceci est généralement associé à une inhibition non compétitive. Par conséquent, l'affinité et l'interaction des composés 1, 4, 5 et l'acarbose avec les acides aminés catalytiques prédisent un mode inhibiteur compétitif, Par contre l'interaction des deux composés 2 et 3 uniquement avec les acides aminés du site de liaison ne prédit pas un mode inhibiteur compétitif.

Par ailleurs, l'énergie de liaison est également un critère important pour considérer les interactions enzymatiques et inhibiteurs. Une faible énergie de liaison est considérée comme plus stable, tandis qu'une énergie de liaison élevée est considérée comme moins stable (Chu et Wang, 2016; Senthil *et al.*, 2019). En termes de l'énergie, l'acide valoneique dilactone s'avère être le meilleur inhibiteur contre  $\alpha$ -amylase (PDB code :7TAA). De plus, selon (Zhu *et al.*, 2019), une forte inhibition est généralement associé à des inhibiteurs plus hydrophobes, à plus de liaisons H et à une conjugaison  $\pi$ - $\pi$  plus étendue formée entre l'inhibiteur et les résidus du site actif. En termes des facteurs cités à savoir l'énergie de liaison, le taux de répétition, le nombre de liaisons avec les acides aminés catalytiques ainsi que les liaisons hydrophobes, l'acide valoneique dilactone s'avère être le meilleur inhibiteur contre  $\alpha$ -amylase (PDB code :7TAA), se liant avec les deux acides aminés catalytiques de l'enzyme (Asp206 et Glu230) par trois liaisons hydrogène et formant quatre liaisons hydrophobes.

### 1.1.2 Amarrage moléculaire pour HuAChE

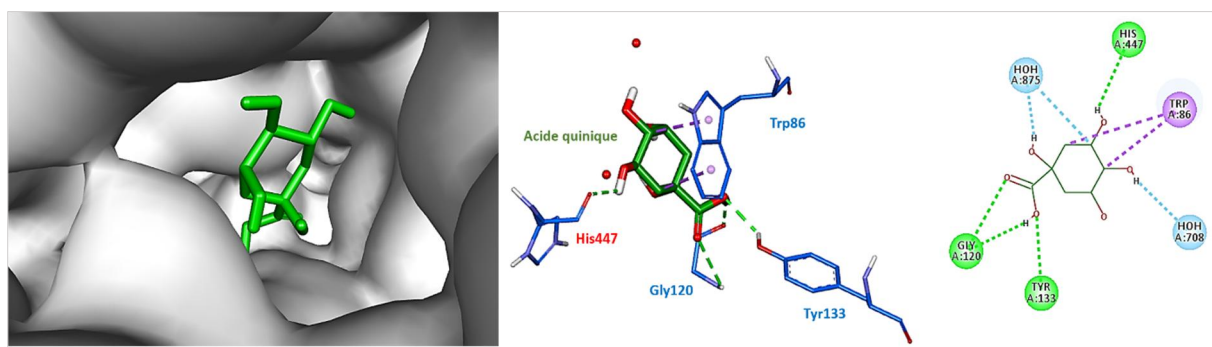
Afin de prédire le mode de liaison et les affinités des cinq composés identifiés à partir des galles de *Pistacia atlantica* et le standard donépézil dans la gorge du site actif de l'enzyme cible HuAChE, une étude d'amarrage a été réalisée et les interactions des composés avec HuAChE ont été évaluées. La quantité d'énergie de liaison obtenue entre HuChE et les inhibiteurs testés a été comprise entre -9,2 et -5,1 kcal / mol. Le donépézil et le composé 3 ont donné une meilleure affinité (-9,2 kcal / mol et -9,1 Kcal/ mol, respectivement), suivi des trois composés 2, 1, 4 qui ont donné une énergie de liaison de -6,8 kcal / mol, -6,3 kcal / mol, -6,3 kcal / mol, respectivement et enfin le composé 5 a enregistré une plus faible affinité de l'ordre de -5,1 kcal / mol. Tandis que les résultats de la conformation des cinq ligands et le donépézil (**Tableau 24**) ont montré que l'inhibiteur 2 a obtenu une répétition avec un taux de 100%, suivi des molécules 5, 3, 1, 4 et le donépézil qui ont eu un taux de répétition égal à 94%, 74%, 68%, 58% et 28%, respectivement.

D'après les résultats de l'amarrage moléculaire, les interactions observées pour stabiliser les complexes récepteur-ligand se sont avérées être les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène. Ainsi que l'implication de deux molécules d'eau HOH708 et HOH875 dans la formation des liaisons hydrogène avec tous les ligands testés.

Tableau 24 : Résultats du docking moléculaire pour HuAChE (PDB : 6O4W).

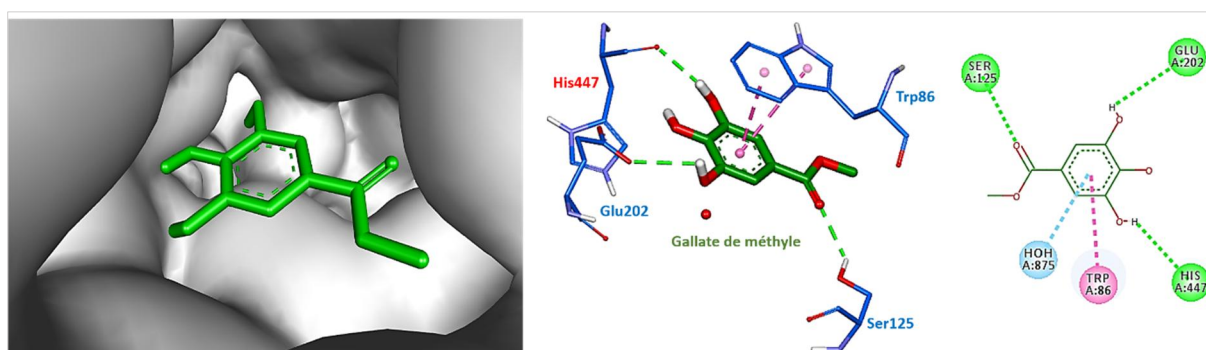
Molécules	Nbre de répétition (%)	EL (kcal/mol)	Catégorie	Types	Résidus	Distance (Å)			
Acide quinique (1)	68	-6,3	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Tyr133	2,36			
				/	Gly120 (2)	3,04/2,07			
			Hydrophobe	$\pi$ -Sigma	His447	2,52			
Gallate de méthyle (2)	100	-6,8	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Trp86 (2)	3,52/3,58			
				/	Ser125	2,44			
			Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ Stacked	His447	2,47			
Digallate de méthyle (3)	74	-9,1	Liaison hydrogène	/	Glu202	2,80			
				/	Tyr124	1,68			
			Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ Stacked	Ser125	2,24			
				/	Tyr133	2,32			
			/	/	Glu202	2,67			
			/	/	Trp86 (2)	4,23/4,59			
Acide digalloylquinique (4)	58	-6,3	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Phe338	4,71			
				/	Tyr341	4,89			
			Hydrophobe	Amide- $\pi$ Stacked	Gly120	3,95			
				$\pi$ -Sigma	Trp86	3,86			
				$\pi$ - $\pi$ Stacked	Tyr341	4,03			
			Acide valoneique dilactone (5)	94	-5,1	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	Gly126	2,78
							/	Gly120 (2)	2,11/2,75
Hydrophobe	/	Asp74				2,93			
	$\pi$ - $\pi$ Stacked	Glu202				2,22			
/	/	Trp83 (8)				4,14/4,54/4,56/4,64/4,74/5,05/5,26/5,30			
/	/	Tyr341				4,12			
/	/	Tyr337	5,87						
Donepezil	28	-9,2	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène	HOH875	3,51			
				/	Ser125	2,44			
			Hydrophobe	$\pi$ - $\pi$ Stacked	Tyr341	4,53			
				/	Trp86 (2)	4,21/4,58			
				$\pi$ -Alkyl	Trp86	5,20			
/	Alkyl	Val294	5,43						
/	$\pi$ - $\pi$ T shaped	Leu130	5,05						
					Phe297	5,69			

Les complexes (1, 2, 3, 4, 5 et le donépézil) ont tous révélé une caractéristique commune qui est l'interaction hydrophobe avec le cycle indole Trp86. L'interaction de l'acide quinique (**composé 1**) dans la gorge du site actif de l'HuAChE a été dominée par des liaisons hydrogène avec trois résidus (Tyr133 ; 2,36 Å, double liaison avec Gly120 ; 2,07 Å / 3,04 Å et un résidu catalytique His447 ; 2,52 Å) et deux molécules d'eau (HOH708 ; 2,54 Å et double liaison HOH875 ; 1,69 Å / 3,41 Å). Cette interaction a été renforcée par deux interactions hydrophobes ( $\pi$ - Sigma) entre deux atomes de carbone du ligand et le cycle indole de Trp86 (3,52 Å / 3,58 Å) (**Figure 99**).



**Figure 99** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide quinique au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).

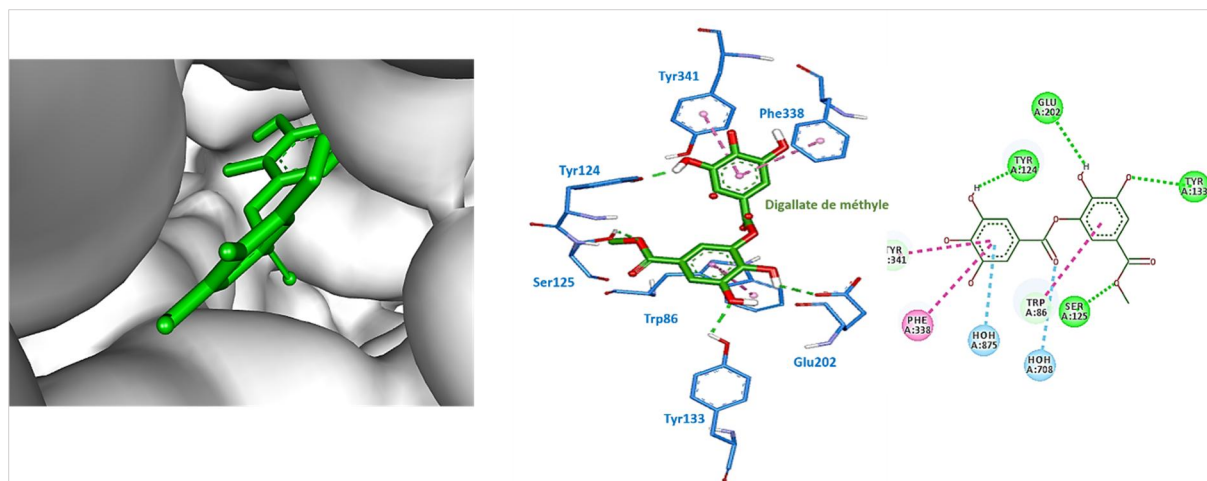
Pour le complexe 2 HuAChE-gallate de méthyle a été stabilisé par double interaction hydrophobe ( $\pi$ - $\pi$  Stacked) entre le cycle benzénique du méthyl gallate et Trp86 (3,82 Å / 4,27 Å). De plus, quatre liaisons hydrogène ont été formées, trois avec des acides aminés (Ser125 ; 2,44 Å, His447 ; 2,47 et Glu202 ; 2,80 Å) et une avec une molécule d'eau (HOH875 ; 3,36 Å) (**Figure 100**).



**Figure 100** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de gallate de méthyle au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).

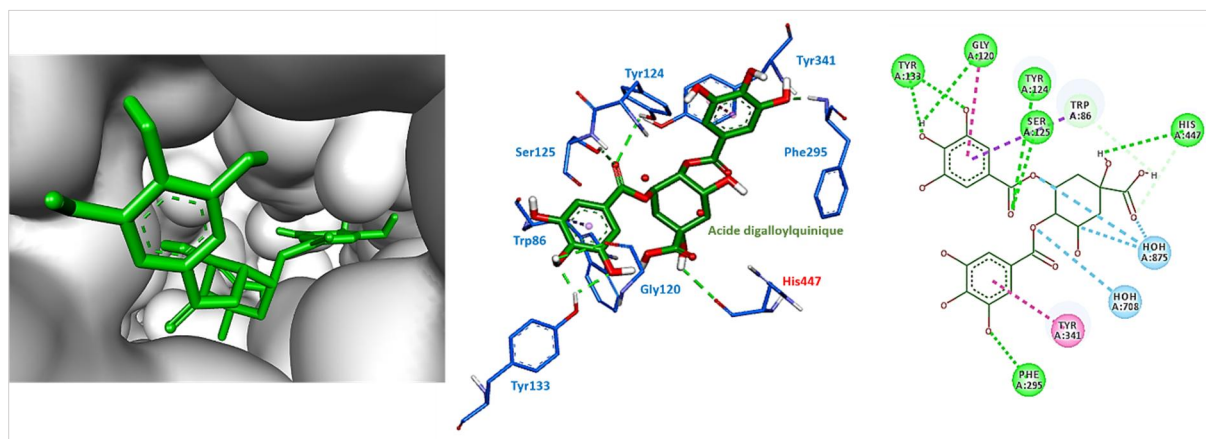
Concernant le digallate de méthyle (**composé 3**) (**Figure 101**), le ligand a été accueilli dans le site actif par des interactions hydrophobes de type  $\pi$ -  $\pi$  stacked avec les cycles

benzéniques de Trp86 (4,23 Å /4,59 Å), Phe338 (4,71 Å) et Tyr341 (4,89 Å). Ces interactions ont été renforcées par des liaisons hydrogène formées entre le ligand et les résidus Tyr124 (1,68 Å), Ser125 (2,24 Å), Tyr133 (2,32 Å) et Glu202 (2,67 Å) ainsi que deux molécules d'eau HOH708 (3,11 Å) et HOH875 (4,17 Å).



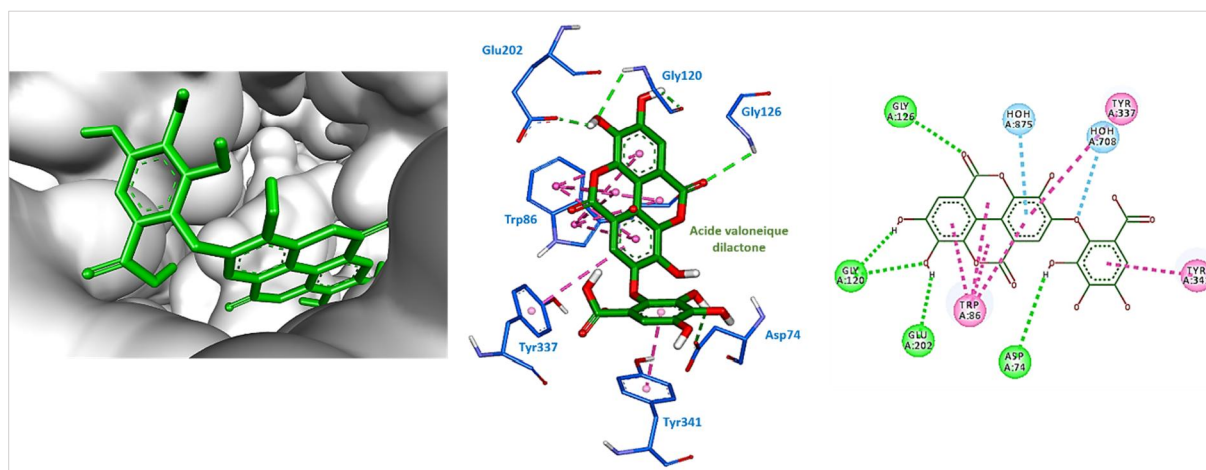
**Figure 101** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de digallate de méthyle au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).

L'acide digalloylquinique (**composé 4**) a occupé le site actif en interagissant avec six résidus dont un est un acide aminé catalytique tels que : Ser125, Tyr124, Tyr133, Phe295, Asp206, His447 et Gly120, formant des liaisons hydrogène ayant des distances de 2,25 Å, 2,84 Å, (1,82 Å /2,15 Å), 1,89 Å, 2,56 Å, 2,88 Å, respectivement. Également, il y a eu quatre liaisons hydrogène avec deux molécules d'eau, une avec HOH708 (3,16 Å) et trois avec HOH875 (2,64 Å /2,81 Å /3,27 Å). Trois interactions hydrophobes supplémentaires ont été observées, une avec Gly120 (type Amide  $\pi$ -Stacked ;3,95 Å), une autre avec Trp86 (type  $\pi$ -Sigma ; 3,86 Å) et une dernière avec Tyr341 (type  $\pi$ -  $\pi$  Stacked ;4,03 Å), La **figure 102** illustre les interactions entre le site actif de l'enzyme et l'acide digalloylquinique.



**Figure 102** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide digalloylquinique au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).

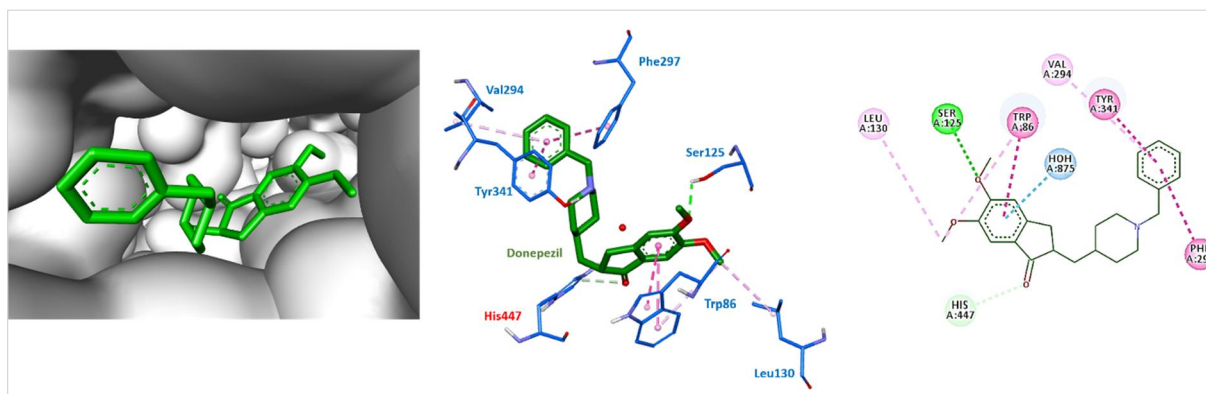
Quant à l'acide valoneique dilactone (**composé 5**), il existe dix interactions de type  $\pi$ - $\pi$  Stacked avec le cycle aromatique des résidus Trp86, Tyr337 et Tyr341. Huit d'autre elles ont été observées avec Trp86 à des distances égales de 4,14 Å, 4,45 Å, 4,56 Å, 4,64 Å, 4,74 Å, 5,05 Å, 5,26 Å et 5,30 Å, une avec Tyr341 (4,12 Å) et la dernière avec Tyr337 (5,87 Å). Ce complexe est encore intensifié par des liaisons hydrogène formées entre la molécule et les résidus Gly126 (2,78 Å), Gly120 (2,11 Å /2,75 Å), Asp74 (2,93 Å) et Glu (2,22 Å), ainsi que deux liaisons supplémentaires avec deux molécules d'eau HOH408 (2,87 Å) et HOH875 (3,51 Å) (**Figure 103**).



**Figure 103** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison de l'acide valoneique dilactone au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE).

Comme le montre la **figure 104**, le donépézil a été impliqué dans deux liaisons hydrogène, une avec le résidu Ser125 (2,44 Å) et l'autre avec une molécule d'eau HOH875 (4,05 Å). Plusieurs interactions hydrophobes ont été observées avec les résidus Tyr341, Trp86,

Val294, Leu130 et Phe297. A savoir, Trp86 a interagi avec le donépézil de deux façons, en formant une double interaction  $\pi$ -  $\pi$  Stacked entre le cycle indole et le cycle benzénique du ligand avec une longueur de 4,12 Å et 4,58 Å et une interaction  $\pi$ -Alkyl (5,20 Å). Les autres résidus interagissent différemment avec le donépézil par interaction  $\pi$ -  $\pi$  Stacked avec Tyr341 (4,53 Å), par interaction  $\pi$ -Alkyl avec Val294 (5,43 Å), par interaction  $\pi$ -  $\pi$  T shaped avec Phe297 (5,69 Å) et enfin par une interaction Alkyl avec Leu130 (5,05 Å).



**Figure 104** : Représentation en 2D et 3D du mode de liaison du donépézil au site actif de l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE),

L'affinité et l'interaction des **composés 1 et 2** avec les acides aminés catalytiques prédisent un mode inhibiteur compétitif. Par contre l'interaction des autres molécules **3, 4, 5** et le donépézil interagissant avec les résidus du site anionique périphérique (PAS) de l'HuAChE indique que le mode d'inhibition n'est pas compétitif.

## 1.2 Évaluations de la règle de cinq de Lipinski (RO5) sur les ligands sélectionnés

La règle de 5 de Lipinski formulée par Christopher A, Lipinski en 1997 est en relation directe avec les propriétés biologiques d'absorption, de digestion, de métabolisme et d'excrétion des molécules étudiées. Cette règle est basée sur le fait que les molécules doivent être petites et lipophiles, En général, un médicament actif par voie orale doit avoir cinq critères (**Lipinski, 2004; Lipinski et al., 1997**):

- Un poids moléculaire (PM) maximum de 500g/mol,
- Nombre de rotation de liaison <5,
- LogX calculée (-2 <Xlog <5),
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5 (DLH) (OH ou NH),
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10 (ALH) (O ou N).

Le **tableau 22** mentionné dans le chapitre 03 (Etude *in silico* (Docking moléculaire)) présente les résultats de la règle 5 de Lipinski des molécules testées. Le poids moléculaire de la molécule est un paramètre important de l'action pharmaceutique (Ashraf *et al.*, 2020). Lorsqu'il augmente au-delà d'une certaine limite, la molécule est moins absorbée et atteint la cible lentement, retardant ainsi la réaction (Lipinski, 2004). Le faible poids moléculaire de nos cinq molécules étudiées ainsi que le donépézil ajoute au potentiel de l'activité inhibitrice et remplit le critère recommandé (<500 g / mol) (Senthil *et al.*, 2019), ce qui suggère que ces composés devraient être facilement transportés, diffusés et absorbés (Ashraf *et al.*, 2020). Selon, (Leeson et Springthorpe, 2007), les taux d'absorption clinique sont significativement faibles si le poids moléculaire est inférieur à 500 g / mol ce qui justifie la présence de plusieurs effets indésirables tels que diarrhée, flatulences, distension abdominale et météorisme rencontrés chez les médicaments ayant comme principe actif l'acarbose (PM= 645,6g / mol).

De plus, le Xlog des composés ont été entre l'intervalle souhaité ( $-2 < \log X < 5$ ) à l'exception de l'acarbose (-8,5), indiquant que ces molécules ont une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire et sont donc une indication d'une bonne solubilité lipidique. Au fur et à mesure que XLog augmente, il y a un risque accru de liaison à des cibles protéiques hydrophobes autres que celle souhaitée, et par conséquent, il existe un plus grand potentiel de toxicité (Ashraf *et al.*, 2020).

De même, le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène de tous les molécules testées ont été trouvés sous 5,10 à l'exception de deux molécules l'acide galloylquinique et l'acide valoneique dilactone qui ont un DLH (9 et 7, respectivement) et ALH (14 et 13, respectivement) supérieurs aux critères demandés.

Les liaisons rotatives des composés ont été en accord avec la règle de 5, sauf pour une seule molécule qui est l'acide galloylquinique (LR=7). Néanmoins, les paramètres tels que DLH et ALH des deux molécules citées en haut ou encore le LR de l'acide galloylquinique sont inférieurs par rapport à l'acarbose qui présente des valeurs 14, 19 et 9, respectivement, transgressant ainsi totalement la RO5. D'après l'ensemble des résultats, sur les cinq composés, trois suivent la règle de 5 de Lipinski qui sont l'acide quinique, le gallate de méthyle et le digallate de méthyle, les deux autres (l'acide digalloylquinique et l'acide valoneique dilactone) suivent 2/5 et 3/5, respectivement la règle de Lipinski.

## ***Conclusion***

---

Les travaux effectués sur les extraits méthanoliques et hexaniques des galles de *Pistacia atlantica* ont montré des potentialités intéressantes en molécules bioactives et ont permis de valoriser cet organe de la plante. Nous avons mis en évidence la variation de la composition chimique des extraits hexaniques et méthanoliques (en acides gras, en tocophérols, en stérols et en composés phénoliques) ainsi que leurs activités antioxydantes et inhibitrices sur l' $\alpha$ -amylase et l'AChE en fonction des paramètres tels que le genre, la forme, les mois et les différents sites de récolte. En effet, l'étude effectuée a donné des résultats dont certains sont rapportés pour la première fois, nous en tirons les conclusions suivantes :

-Les rendements en extrait hexanique et méthanoliques semblent être influencés par la forme des galles. En effet, pour les extraits lipidiques qui ont enregistré des teneurs allant de 2,70 % à 7,64 % (m/m), les galles semi-circulaires produisent 2 fois plus de rendement que les galles sphériques. Tandis que pour les extraits méthanoliques qui ont donné des teneurs entre 28,90 % et 88,90 %, les galles sphériques ont un rendement 2 fois plus élevé par rapport aux galles semi-circulaires.

-La composition en acides gras des extraits lipidiques a révélé une diversité, contenant des acides gras saturés (AGS) en plus grande quantité tels que l'acide palmitique (C16:0) et des acides gras insaturés (AGMI et AGPI) tels que : les acides oléique (C18:1) et linoléique (C18:2), mais aussi la présence des tocophérols et des phytostérols dans les galles de *Pistacia atlantica* leurs confèrent des vertus thérapeutiques et cosmétiques.

- L'estimation quantitative des tocophérols et stérols totaux dans les extraits lipidiques ont montré des teneurs assez appréciables, qui semblent être influencées par la forme des galles. En effet, les valeurs les plus importantes pour les tocophérols et les stérols totaux ont été obtenues chez les galles semi-circulaires.

-L'estimation quantitative des extraits méthanoliques a permis de constater que ces galles contiennent une quantité considérable de composés phénoliques (variant de  $119,45 \pm 2,4$  mg AG/g à  $328,61 \pm 12,6$  mg AG/g), en particulier les tanins condensés (allant de  $55,71$  mg C/g  $\pm 20,7$  à  $726,20 \pm 58,6$  mg C/g) et que la forme des galles influe significativement sur la teneur en flavonoïdes et en tanins condensés.

-L'évaluation des propriétés antioxydantes ont démontré que les galles possèdent une activité antioxydante grâce à un pouvoir anti radicalaire et réducteur, avec une activité remarquable pour les extraits méthanoliques par rapport aux extraits hexaniques et aux fractions

insaponifiables. Les extraits méthanoliques des galles sphériques ont présenté une meilleure activité antioxydante par rapport aux galles semi-circulaires. Cependant, le contraire a été signalé pour les extraits lipidiques.

-L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits méthanoliques sur  $\alpha$ -amylase a révélé un potentiel inhibiteur (IC50 allant de  $0,56 \pm 0,10$  mg/ml à  $3,67 \pm 0,30$  mg/ml), tous plus actifs au médicament Gluconova contenant comme principe actif l'acarbose.

-L'évaluation pour la première fois de l'effet inhibiteur des extraits lipidiques et des fractions insaponifiables sur  $\alpha$ -amylase ont également démontré un potentiel inhibiteur, en particulier les fractions insaponifiables (IC50 oscillant de  $0,56 \pm 0,02$  mg/ml à  $1,60 \pm 0,10$  mg/ml) également plus puissants que le médicament Gluconova.

-L'intérêt s'est aussi porté sur l'activité inhibitrice des extraits méthanoliques et hexaniques sur l'acétylcholinestérase, confirmant leur potentiel à l'inhiber avec des concentrations que celles relatives à l' $\alpha$ -amylase (IC50 allant de  $0,21 \pm 0,002$  mg/ml à  $0,94 \pm 0,10$  mg/ml). Néanmoins, ces valeurs indiquent que ces extraits sont moins efficaces au médicament donépézil utilisé pour retarder les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

- L'activité inhibitrice des extraits méthanoliques sur l'acétylcholinestérase semble être influencé significativement par le mois de récolte.

- La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) a permis d'identifier cinq composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de *P. atlantica*.

- La réalisation de modélisation moléculaire *in silico* afin de tester les inhibiteurs sur les deux enzymes étudiées a permis d'expliquer les mécanismes d'interaction. Ces mécanismes ont été élucidés par la détermination du site de fixation et la visualisation des différents types d'interactions mis en jeu. Les résultats ont confirmé ceux trouvés par l'étude *in vitro* et a permis de montrer une différence dans les affinités des inhibiteurs vis-à-vis des deux enzymes. Ce qui prouve qu'il existe une relation entre structure-activité.

-L'application de la règle de Lipinski (RO5) a permis de démontrer la bonne perméabilité de ces cinq molécules phénoliques à travers la membrane cellulaire.

Malgré les résultats encourageants obtenus pour la première fois à travers cette thèse, d'autres études plus approfondies restent néanmoins nécessaires et doivent être effectuées telles que :

- La connaissance détaillée de la composition de la fraction insaponifiable de l'extrait lipidique des galles, l'identification des constituants bioactifs, la détermination du type d'inhibition *in vitro* et la confirmation de l'activité inhibitrice des deux enzymes par amarrage moléculaire.
- L'identification et la caractérisation des autres composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanoliques des galles et la détermination du type d'inhibition *in vitro* de tous les composés phénoliques.
- La réalisation des études *in vivo* pour démontrer l'efficacité des extraits des galles afin de les proposer comme remède contre le diabète et le ralentissement des symptômes de la maladie d'Alzheimer.
- Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* et *in vivo* des extraits phénoliques et lipidiques.

## ***Références bibliographiques***

---

- Abbas, Q., Hassan, M., Raza, H., Kim, S.J., Chung, K.-W., Kim, G.-H., Seo, S.-Y., 2017. In vitro, in vivo and in silico anti-hyperglycemic inhibition by sinigrin. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.019>
- Abdelkrim, L., Noria, S.-S., Gradziel, T., 2014. Root architecture of Atlas pistachio in relation to underlying soil properties under arid conditions. *AJAR* 9, 620–626. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7291>
- Abdenebi, A., Boumediene, T., Mohammed, B., Nourelhouda, T., Mebrouka, B., 2016. Antibacterial activity and physicochemical characteristics of *Pistacia atlantica* extracts 8, 162–168.
- Abeyssekera, W., Chandrasekera, A., Liyanage, P.K., 2007. Amylase and glucosidase enzyme inhibitory activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) an in vitro study. *Tropical Agricultural Research* 19, 128–125.
- Abirami, A., Nagarani, G., Siddhuraju, P., 2014. In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness* 3, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.02.001>
- Abrahamson, W.G., McCrea, K.D., Whitwell, A.J., Vernieri, L.A., 1991. The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. *Biochemical Systematics and Ecology* 19, 615–622.
- Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, Carbonic Anhydrase and Superoxide Dismutase* 1804, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>
- Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., 2015. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry* 166, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
- Acheheb, H., 2013. Valorisation de l’huile des graines de pistachier de l’atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) optimisation de l’extraction par presse et caractéristiques phytochimiques (Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques). Ecole Nationale Supérieure Agronomique- El Harrach.
- Achili, I., Amrani, A., Bensouici, C., Gül, F., Altun, M., Demirtas, I., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2020. Chemical Constituents, Antioxidant, Anticholinesterase and Antiproliferative Effects of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. Extracts. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 11, 249–256. <https://doi.org/10.2174/221279841166200207101502>
- Ahmad, Z., Zamhuri, K.F., Yaacob, A., Siong, C.H., Selvarajah, M., Ismail, A., Hakim, M.N., 2012. In Vitro Anti-diabetic Activities and Chemical Analysis of Polypeptide-k and Oil Isolated from Seeds of *Momordica charantia* (Bitter Gourd). *Molecules* 17, 9631–9640. <https://doi.org/10.3390/molecules17089631>
- Ahmed, I.A., Mikail, M.A., Bin Ibrahim, M., Bin Hazali, N., Rasad, M.S.B.A., Ghani, R.A., Wahab, R.A., Arief, S.J., Yahya, M.N.A., 2015. Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food chemistry* 172, 778–787.
- Al-Aboudi, A., Afifi, F.U., 2011. Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: A review of scientific evidence. *Pharmaceutical Biology* 49, 221–239. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501802>
- Alais, C., Linden, G., Miclo, L., 2003. *Biochimie alimentaire*, DUNOD, Paris. ed. 6 Ed.
- Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N., 2008. Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry* 20, 2701.

- AL-Saghir, M.G., 2006. Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia (Anacardiaceae) (Doctorat en Sciences Biologiques). L'Institut polytechnique de l'état de Virginie et (État-Unis).
- Altundag, E., Ozturk, M., 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, The 2nd International Geography Symposium-Mediterranean Environment 2010 19, 756–777. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2011.05.195>
- Amiri, M., Nasrollahi, F., Barghi, S., Ebrahimi, N., Rajizadeh, A., Nayyeri, N.D., Kazerouni, F., Rahimipour, A., Namaki, S., Ahmadi, H., 2018. The Effect of Ethanol Baneh Skin Extract on the Expressions of Bcl - 2, Bax, and Caspase - 3 Concentration in Human Prostate Cancer pc3 Cells. *International Journal of Cancer Management* 11, 5. <https://doi.org/10.5812/ijcm.9865>
- Amorim, E.L., Nascimento, J.E., Monteiro, J.M., Peixoto Sobrinho, T.J.S., Araújo, T.A., Albuquerque, U.P., 2008. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. *Functional Ecosystems and Communities* 2, 88–94.
- Angelantonio, S.D., Bernardi, G., Mercuri, N.B., 2004. Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones. *British Journal of Pharmacology* 141, 644–652. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705660>
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1028–1045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743>
- Apema, R., Mozouloua, D., Abeye, J., Salamate, F.M.L., 2012. Les plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète par les tradipraticiens a bangui. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine* 16.
- Apostolidis, E., Lee, C.M., 2010. In Vitro Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibition. *Journal of Food Science* 75, H97–H102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01544.x>
- Arunan, E., Desiraju, G.R., Klein, R.A., Sadlej, J., Scheiner, S., Alkorta, I., Clary, D.C., Crabtree, R.H., Dannenberg, J.J., Hobza, P., Kjaergaard, H.G., Legon, A.C., Mennucci, B., Nesbitt, D.J., 2011. Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry* 83, 1637–1641. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-01-02>
- Ashraf, J., Mughal, E.U., Sadiq, A., Naeem, N., Muhammad, S.A., Qousain, T., Zafar, M.N., Khan, B.A., Anees, M., 2020. Design and synthesis of new flavonols as dual  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Structure-activity relationship, drug-likeness, in vitro and in silico studies. *Journal of Molecular Structure* 1218, 128458. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128458>
- Atanasova, M., Stavrakov, G., Philipova, I., Zheleva, D., Yordanov, N., Doytchinova, I., 2015. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 5382–5389. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.058>
- Ayachi, H., 2017. Compréhension du mécanisme enzyme-substrat par modélisation moléculaire: Cas du diabète de type 2 (Doctorat en Sciences, Spécialité: Chimie-Physique). Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen.
- Azzi, A., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F.Z., Benmehdi, H., Belkacem, N., 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 2041–2050.

- Bai, D.L., Tang, X.C., He, X.C., 2000. Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Medicinal Chemistry* 7, 355–374. <https://doi.org/10.2174/0929867003375281>
- Baraka-Vidot, J., 2014. - Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée (Thèse de Doctorat, option: Biochimie). Université de la Réunion.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Med Sci (Paris)* 22, 266–272. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223266>
- Bastos, R.G., Salles, B.C.C., Bini, I.F., Castaldini, L.P., Silva, L.C.D., Vilela, A.A., Micheloni, A.L.C., da Silva, G.M., da Silva, P.H.C., Maure, A.K., Santos, L.L., Rosa, C.P., da Silva Amorim, A.F., da Rocha, C.Q., Vilegas, W., de Araújo Paula, F.B., da Silva, G.A., da Silva, M.A., 2019. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. *South African Journal of Botany* 123, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.006>
- Beaudeau, J.-L., Durand, G., 2011. Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives (2e ed.) ; MÉDECINE SCIENCES PUBLICATIONS / LAVOISIER ,Année 9/2011.
- Becker, M.M., Nunes, G.S., Ribeiro, D.B., Silva, F.E.P.S., Catanante, G., Marty, J.-L., 2019. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 1108–1114. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>
- Behmanesh, M.A., Poormoosavi, S.M., pareidar, Y., ghorbanzadeh, B., Mahmoodi-kouhi, A., Najafzadehvarzi, H., 2020. Pistacia atlantica's effect on ovary damage and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *JBRA Assist Reprod* 25, 28–33. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200044>
- Beier, R.C., Oertli, E.H., 1983. Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry* 22, 2595–2597. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80173-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80173-3)
- Beisken, S., Meinl, T., Wiswedel, B., de Figueiredo, L.F., Berthold, M., Steinbeck, C., 2013. KNIME-CDK: Workflow-driven cheminformatics. *BMC Bioinformatics* 14, 257. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-257>
- Belfadel, F.Z., 2009. Huile de fruits de Pistacia lentiscus Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat) (Magister chimie organique, option: phytochimie). Université Mentouri de Constantine.
- Belhadj, S., 1999. Pistachio situation in Algeria. *FAO-IHEAM Nucis. Newsletter* 8:30.
- Belhadj, S., Derridj, A., Aigouy, T., Gers, C., Gauquelin, T., Mevy, J.-P., 2007. Comparative Morphology of Leaf Epidermis in Eight Populations of Atlas Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf., Anacardiaceae). *Microscopy Research and Technique* 70, 837–846. <https://doi.org/10.1002/jemt.20483>
- Belyagoubi, N., 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Doctorat en Biologie, Option : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen (Algérie) 174p.
- Ben -Ahmed, Z., 2016. «Antioxidant activity of phenolic extracts of Pistacia atlantica leaves.». Doctoral thesis in sciences, Specialty: Chemistry. University Amar Telidji. Laghouat (Algeria), 218p.
- Ben Ahmed, Z., Mohamed, Y., Johan, V., Dejaegher, B., Demeyer, K., Heyden, Y.V., 2020. Defining a standardized methodology for the determination of the antioxidant capacity: case study of Pistacia atlantica leaves. *Analyst* 145, 557–571. <https://doi.org/10.1039/C9AN01643K>

- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Heyden, Y.V., 2021. Four *Pistacia atlantica* subspecies (*atlantica*, *cabulica*, *kurdica* and *mutica*): A review of their botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 265, 113329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113329>
- Ben -Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., 2018. Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 149, 547–556.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., 2017. Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves. *Pharmaceutical biology* 55, 1185–1194.
- Ben Hmed, M., Rigane, G., Ben Salem, R., Zouari, N., Cherif, S., 2019. Antiobesity and Inhibitory Pancreatic Lipase Effects of Bioactive Compounds of *Pistacia atlantica* Roots Extract. 3, 1013–1017.
- Benabdallah, F., Zohra, 2012. Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf. ) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléorésine (magistère en Biologie, Option: Biotechnologie, Université Mohamed Kheider Biskra).
- Benabderrahmane, M., Benali, M., Aouissat, H., Jordán Bueso, M.-J., 2009. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. *Phytothérapie* 7, 304–308. <https://doi.org/10.1007/s10298-009-0505-5>
- Benabed, K.H., 2018. Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits phénoliques de deux espèces de la famille des Lamiaceae (Thèse de Doctorat en Sciences, option: Biochimie). Kasdi Merbah, Ourgla (Algérie).
- Ben-Ahmed, Z., 2016. Antioxidant activity of phenolic extracts of *Pistacia atlantica* leaves (Doctoral thesis in sciences, Specialty: Chemistry.). University Amar Telidji, Laghouat (Algeria).
- Ben-Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., 2016. Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchemical journal* 128, 208–217.
- Benamar, H., 2016. Isolement et caractérisation d'inhibiteurs naturels de l'acétylcholinestérase (Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques). Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran (Algérie).
- Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur, M., 2018. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 24, 229–244. <https://doi.org/10.1080/10496475.2018.1446204>
- Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., Marouf, A., 2010. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Biological Sciences* 10, 1–9.
- Benaradj, A., 2017. Étude phyto-écologique des groupements à *Pistacia atlantica* Desf. dans le sud Oranais (Sud-Ouest algérien (Thèse de Doctorat en Foresterie). Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.
- Benaradj, A., 2010. Contribution à l'étude phyto-écologique du *Pistacia atlantica* Desf. *atlantica* dans la région de Béchar (Sud-Ouest algérien). Mémoire de Magistère, Faculté des Science de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen. 147p.

- Benaradj, A., Boucherit, H., Bouazza, M., Hasnaoui, O., 2015. Ethnobotanique du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*) auprès la population de Béchar (Algérie occidentale). *JARST* 2, 139–146.
- Benarous, K., 2014. Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Peganum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santolina* sur la lipase de *Candida rugosa* (Docteur en Sciences Biologiques, Spécialité : Biologie, option: Biochimie). École Normale Supérieure de Kouba-Alger, Département de Biologie.
- Benguechoua, M., 2016. Etude de l'activité antioxydante et inhibitrice d'enzyme de quelques plantes médicinales locales. (Thèse de doctorat, option: chimie organique appliquée). Université Amar Telidji, Laghouat (Algérie).
- Benhammou, N., 2012. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Thèse de Doctorat en Biologie), Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T.K., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *AJPP* 2, 022–028. <https://doi.org/10.5897/AJPP.9000056>
- Bennion, B.J., Essiz, S.G., Lau, E.Y., Fattebert, J.-L., Emigh, A., Lightstone, F.C., 2015. A Wrench in the Works of Human Acetylcholinesterase: Soman Induced Conformational Changes Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE* 10, e0121092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121092>
- Bentireche, F., Guenane, H., Yousfi, M., 2019. Fatty Acids, the Unsaponifiable Matter, and Polyphenols as Criteria to Distinguish *Pistacia atlantica* Unripe Fruit Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 96, 903–910.
- 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. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhutkar, M.A., Bhinge, S.D., Randive, D.S., Wadkar, G.H., Todkar, S.S., 2018. In vitro studies on alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Mod Appl Pharm Pharmacol* 1, 1–5.
- Bidouil, C., 2012. Modélisation moléculaire de l'acétylation de la quercétine par des lipases : étude des interactions enzyme-substrat (Doctorat en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires). Université de Lorraine.
- Bitou, N., Ninomiya, M., Tsujita, T., Okuda, H., 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34, 441–445. <https://doi.org/10.1007/s11745-999-0383-7>
- Blainski, A., Lopes, G.C., De Mello, J.C.P., 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Blalock, J.E., Smith, E.M., 1984. Hydropathic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 121, 203–207. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90707-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90707-1)
- Bloor, S.J., 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, in: *Methods in Enzymology, Flavonoids and Other Polyphenols*. Academic Press, pp. 3–14. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35227-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35227-8)
- Blow, D.M., 2002. Rearrangement of Cruickshank's formulae for the diffraction-component precision index. *Acta Cryst D* 58, 792–797. <https://doi.org/10.1107/S0907444902003931>
- Boldi, A.M., 2004. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.04.010>

- Bolea, G., 2019. Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de la digestion et altération de la fonction vasculaire. Stratégie de prévention antioxydante par supplémentation en polyphénols de pomme (Thèse de Doctorat, option: Nutrition et Santé). Université d'Avignon.
- Bortolami, M., Pandolfi, F., De Vita, D., Carafa, C., Messori, A., Di Santo, R., Feroci, M., Costi, R., Chiarotto, I., Bagetta, D., Alcaro, S., Colone, M., Stringaro, A., Scipione, L., 2020. New deferiprone derivatives as multi-functional cholinesterase inhibitors: design, synthesis and in vitro evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 198, 112350. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112350>
- Bouchagra, S., 2018. Modélisation des interactions protéine-petites molécules : Etudes de la relation structure-fonction dans le cas des lipases (Thèse de Doctorat en Sciences, Option : Chimie Organique et Bioorganique). Université Badji Mokhtar-Annaba.
- Bouchareb, F., 2016. Etude par modélisation moléculaire des mécanismes de complexation. (Doctorat en Chimie Théorique et Modélisation moléculaire). Université Abou Bekr belkaid Tlemcen.
- Bouchouka, E., 2016. Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes (Thèse de Doctorat en Sciences, option: phytochimie). Université Badji Mokhtar- Annaba.
- Bouhadjra, K., 2011. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. (Magister, option: chimie de l'environnement). Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou.
- Bouic, P.J.D., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotze, D., Jaarsveld, P.P. van, 1999. The Effects of B-Sitosterol (BSS) and B-Sitosterol Glucoside (BSSG) Mixture on Selected Immune Parameters of Marathon Runners: Inhibition of Post Marathon Immune Suppression and Inflammation. *Int J Sports Med* 20, 258–262. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971127>
- Boulos, L., 2000. Flora of Egypt. Geraniaceae- Boraginaceae. *AL hadara Pyblisching* 1: 275-277.
- Bourne, Y., Grassi, J., Bougis, P.E., Marchot, P., 1999. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography \*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30370–30376. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30370>
- Boussoussa, H., Hamia, C., Djeridane, A., Boudjeniba, M., Yousfi, M., 2014. Effect of different solvent polarity on extraction of phenolic compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* flowers and their antimicrobial and antioxidant activities. *Current Chemical Biology* 8, 43–50.
- Boussoussa, H., Khacheba, I., Berramdane, T., Maamri, A., Bendahgane, H., Yousfi, M., 2018. In vitro antidiabetic effect of saponins and phenolic extracts from fruits and seeds of Algerian cypress tree: *Cupressus sempervirens* L. *Current Enzyme Inhibition* 14, 92–96.
- Boyer, F., 2016. Stress oxydant et pathologie diabétique. Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. (Thèse de Doctorat,option: Biochimie). Université de la Réunion.
- Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal* 13, 1145–1155. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1145>
- Broadhurst, R.B., Jones, W.T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 788–794.
- Brooijmans, N., Kuntz, I.D., 2003. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 32, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>

- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Tec&Doc. Paris.
- Brünger, A.T., 1997. [19] Free R value: Cross-validation in crystallography, in: Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography Part B. Academic Press, pp. 366–396. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77021-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77021-6)
- Brut, M., 2009. Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques (Doctorat en Nanophysique). Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Brzozowski, A.M., Davies, G.J., 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylase Complexed with the Inhibitor Acarbose at 2.0 Å Resolution., *Biochemistry* 36, 10837–10845. <https://doi.org/10.1021/bi970539i>
- Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A., Menis, O., 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical chemistry* 20, 794–801.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1989. Vitamin E as an in Vitro and in Vivo Antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570, 7–22. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb14904.x>
- Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., Isac-Garcia, J., Martinez, M., 2015. Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Caramelli, P., Chaves, M.L.F., Engelhardt, E., Machado, J.C.B., Schultz, R.R., Vale, F.A.C., Charchat-Fichman, H., 2004. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimer's disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center Galantamine Study (GAL-BRA-01). *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 62, 379–384. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2004000300001>
- Carr, A., Frei, B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal* 13, 1007–1024. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>
- Carret-Rebillat, A.-S., 2014. Contrôle de la neuroinflammation par la kinase PKR dans les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer (Thèse de Doctorat en Physiologie, physiopathologie et thérapeutique, Spécialité : Neurosciences). Université Pierre et Marie Curie.
- Chaudiere, J., Tappel, A.L., 1983. Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226, 448–457. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90314-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90314-4)
- Chelghoum, M., Guenane, H., Harrat, M., Yousfi, M., 2020. Total Tocopherols, Carotenoids, and Fatty Acids Content Variation of *Pistacia atlantica* from Different Organs' Crude Oils and Their Antioxidant Activity during Development Stages. *Chemistry & Biodiversity* 17, e2000117. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000117>
- Chelghoum, M., Guenane, H., Tahri, D., Laggoun, I., Marfoua, F.Z., Rahmani, F.Z., Khenifer, F., Yousfi, M., 2021. Influence of altitude, precipitation, and temperature factors on the phytoconstituents, antioxidant, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of *Pistacia atlantica*. *Food Measure* 15, 4411–4425. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01006-5>
- Chen, I.-C., Chang, H.-C., Yang, H.-W., Chen, G.-L., 2004. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis* 12.
- Cherbi, R., Hamia, C., Gourine, N., Bombarda, I., Saïdi, M., Yousfi, M., 2017. Lipid Classes, Fatty Acids, Tocopherols Compositions and Antioxidant Activity of *Lawsonia alba* Seed Oils Growing in Algeria. *Current Nutrition & Food Science* 13, 121–130.

- Cherbi, R., Saidi, M., Yousfi, M., Rahmani, Z., 2016. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds extracts of *Lawsonia alba* (henna) from Algeria. *Der Pharma Chemica* 8, 216–221.
- Cheung, J., Gary, E.N., Shiomi, K., Rosenberry, T.L., 2013. Structures of Human Acetylcholinesterase Bound to Dihydrotanshinone I and Territrem B Show Peripheral Site Flexibility. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 1091–1096. [https://doi.org/ 10. 1021 /ml400304w](https://doi.org/10.1021/ml400304w)
- Chi, T.-C., Chen, W.-P., Chi, T.-L., Kuo, T.-F., Lee, S.-S., Cheng, J.-T., Su, M.-J., 2007. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences* 80, 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.002>
- Chief, R., 1914. *Les plantes médicinales*. Solar: Paris.
- Chu, W.-T., Wang, J., 2016. Energy Landscape Topography Reveals the Underlying Link Between Binding Specificity and Activity of Enzymes. *Scientific Reports* 6, 27808. <https://doi.org/10.1038/srep27808>
- Chupin, L., Motillon, C., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Charrier, B., 2013. Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. *Industrial Crops and Products* 49, 897–903.
- Cillard, J., Cillard, P., 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 13, 24–29. <https://doi.org/10.1051/ocl.2006.6666>
- Cirak, C., Radusiene, J., 2019. Factors affecting the variation of bioactive compounds in *Hypericum* species. *Biologia Futura* 70, 198–209. [https://doi.org/ 10.1556 /019. 70. 2019.25](https://doi.org/10.1556/019.70.2019.25)
- Clardy, J., Walsh, C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829–837. <https://doi.org/10.1038/nature03194>
- Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C., 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283, L246–L255. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00491.2001>
- Conforti, F., Statti, G., Loizzo, M.R., Sacchetti, G., Poli, F., Menichini, F., 2005. In vitro antioxidant effect and inhibition of  $\alpha$ -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1098–1102.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Crete, P., 1965. *Précis de botanique. Tome II. Systématique des Angiospermes*. Éd. Masson.
- Cruzat, V.F., Krause, M., Newsholme, P., 2014. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 11, 61. <https://doi.org/10.1186/s12970-014-0061-8>
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., Rong, L., 2020. Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules* 25, 183. <https://doi.org/10.3390/molecules25010183>
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Hornick, J.-L., Istasse, L., 2004. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire* 148, 133–140.
- Cuzzocrea, S., Thiemermann, C., Salvemini, D., 2004. Potential Therapeutic Effect of Antioxidant Therapy in Shock and Inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1147–1162. <https://doi.org/10.2174/0929867043365396>
- Daas Amieur, S., 2009. Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Magister en Biologie, spécialité: Biochimie appliquée, Université El-Hadj Lakhdar - Batna (Algérie).

- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Das, D.K., Maulik, N., 2006. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Molecular Interventions* 6, 36. <https://doi.org/10.1124/mi.6.1.7>
- Dauphin, P., 2012. Guide des galls de France et d'Europe. Belin.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Davis, A.M., Teague, S.J., Kleywegt, G.J., 2003. Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angewandte Chemie International Edition* 42, 2718–2736. <https://doi.org/10.1002/anie.200200539>
- Degandt, A.-L., 2019. La Maladie d'Alzheimer et ses thérapeutiques (Thèse de Doctorat en Pharmacie). Université de Lille.
- Delacourte, A., 2006. The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 9, 187–194. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9S322>
- Desaphy, J., 2013. L'analyse structurale de complexes protéine/ligand et ses applications en chémogénomique (Docteur en chimie/Chémoinformatique). Université de Strasbourg.
- Devillard, R., 2011. Souris fragilitas ossium et mutation de la sphingomyélinase neutre de type 2 Implication dans l'apoptose et l'ostéochondrogenèse (Thèse de Doctorat, option: Biologie cellulaire). Université de Toulouse III - Paul Sabatier (UT3) (France).
- Dey, L., Attele, A.S., Yuan, C.-S., 2002. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine review* 7, 45–58.
- Dias, G.G., Ferreira, B.G., Moreira, G.R.P., Isaias, R.M.S., 2013. Developmental pathway from leaves to galls induced by a sap-feeding insect on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* 85, 187–200. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000100010>
- Ding, L., Liu, Z., Zhu, Z., Luo, G., Zhao, D., Ni, J., 1998. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochemical Journal* 332, 251–255. <https://doi.org/10.1042/bj3320251>
- Djenidi, H., 2012. Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. (Magistère en biologie, option: Biotechnologies). Université Mohamed Kheider, Biskra (Algérie).
- Drouin, A., 2009. Impact du stress oxydant et de l'athérosclérose sur la fonction vasculaire cérébrale au cours du vieillissement. (Thèse de Doctorat en Physiologie). Université de Montréal.
- Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z., 2014. Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts. *Food Chem* 153, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.072>
- Dugrand-Judek, A., 2015. Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus. (Thèse Docteur en sciences agronomiques). Université de Lorraine.
- Duhovny, D., Nussinov, R., Wolfson, H.J., 2002. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules, in: Guigó, R., Gusfield, D. (Eds.), *Algorithms in Bioinformatics, Lecture Notes in Computer Science*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 185–200. [https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4\\_14](https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4_14)
- Dupic, L., Huet, O., Harrois, A., Duranteau, J., 2010. Hypoxie et fonction mitochondriale. *Réanimation* 19, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.reurg.2010.06.006>
- Durand, K., 2018. Diabète et Stress Oxydant. (These de Doctorat en Pharmacie). Université Aix Marseille.

- El Hamaoui El Nachar, A., 2014. Évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales de la forêt boréale et identification des principes actifs de deux espèces prometteuses. (Thèse de Doctorat en pharmacologie, option: moléculaire). Université de Montréal.
- El Hamaoui-El Nachar, A., 2014. Évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales de la forêt boréale et identification des principes actifs de deux espèces prometteuses. (Thèse de doctorat En pharmacologie, option moléculaire). Université de Montréal.
- Elkaim, J., 2011. Drug Design in silico criblage virtuelle de protéines à visée thérapeutique (Doctorat en chimie-physique). Université Debordeaux1.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Emmerie, A., Engel, C., 1938. Colorimetric determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 57, 1351–1355.
- Fagbohoun, L., 2014. Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal (Doctorat en Chimie organique et substances naturelles). Université d'Abomey-Calavi (Benin).
- Falahati, M., Sepahvand, A., Mahmoudvand, H., Baharvand, P., Jabbaria, S., Ghoghji, A., Yarahmadi, M., 2015. Evaluation of the antifungal activities of various extracts from *Pistacia atlantica* Desf. *Curr Med Mycol* 1, 25–32. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.3.25>
- Farlow, M.R., Cummings, J.L., 2007. Effective Pharmacologic Management of Alzheimer's Disease. *The American Journal of Medicine* 120, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.08.036>
- Fasano, C., Hiol, A., Miolan, J.-P., Niel, J.-P., 2006. [Sphingolipids, vehicle for pathogenic agents and cause of genetic diseases]. *Med Sci (Paris)* 22, 411–415. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006224411>
- Felt, E.P., 1940. *Plant Galls and Gall Makers*. Comstock, Ithaca London and New York.
- Fernandes, P., Cabral, J.M.S., 2007. Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresource technology* 98, 2335–2350.
- Ferreira, B.G., Isaias, R.M.S., 2013. Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Botany* 91, 752–760. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0125>
- Firdaus, M., Nurdiani, R., Prihanto, A.A., 2015. Antihyperglycemic of *Sargassum* sp. extract. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications* 381–394.
- Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., Leverve, X., 2002. Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation* 11, 411–420. [https://doi.org/10.1016/S1624-0693\(02\)00269-4](https://doi.org/10.1016/S1624-0693(02)00269-4)
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64, 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Furqan, T., Batool, Sidra, Habib, R., Shah, M., Kalasz, H., Darvas, F., Kuca, K., Nepovimova, E., Batool, Sajida, Nurulain, S.M., 2020. Cannabis Constituents and Acetylcholinesterase Interaction: Molecular Docking, In Vitro Studies and Association with CNR1 rs806368 and ACHE rs17228602. *Biomolecules* 10, 758. <https://doi.org/10.3390/biom10050758>
- Gally, J.-M., Bourg, S., Do, Q.-T., Aci-Sèche, S., Bonnet, P., 2017. VSPrep: A General KNIME Workflow for the Preparation of Molecules for Virtual Screening. *Molecular Informatics* 36, 1700023. <https://doi.org/10.1002/minf.201700023>
- Gee, J.M., Johnson, I.T., 2001. Polyphenolic Compounds: Interactions with the Gut and Implications for Human Health. *Current Medicinal Chemistry* 8, 1245–1255. <https://doi.org/10.2174/0929867013372256>

- Generalić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S.S., Ljubenkov, I., Katalinić, A., Šimat, V., Katalinić, V., 2012. Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & biodiversity* 9, 441–457.
- Gerlits, O., Ho, K.-Y., Cheng, X., Blumenthal, D., Taylor, P., Kovalevsky, A., Radić, Z., 2019. A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies. *Chemico-Biological Interactions* 309, 108698. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.011>
- Ghalem, B.R., Mohamed, B., 2009. Bactericidal activity of *Pistacia atlantica* Desf mastic gum against certain pathogens. *AJPS* 3, 013–015. <https://doi.org/10.5897/AJPS.9000034>
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy* 3, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- Ghizlane, H., Rabab, C., Aziz, B., Mouna, T., Yahia, C., Zellou, A., 2018. Evaluation of CNS activity and anti-inflammatory effect of *Pistacia atlantica* Desf. Essential oil from Morocco. *Pharm. Chem. J.* 5, 86–94.
- Gholami, M., Ghasemi-Niri, S.F., Maqbool, F., Baeri, M., Memariani, Z., Pousti, I., Abdollahi, M., 2016. Experimental and Pathological study of *Pistacia atlantica*, butyrate, *Lactobacillus casei* and their combination on rat ulcerative colitis model. *Pathology - Research and Practice* 212, 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.02.024>
- Givianrad, M.H., Saber-Tehrani, M., Jafari Mohammadi, S.A., 2013. Chemical composition of oils from wild almond (*Prunus scoparia*) and wild pistachio (*Pistacia atlantica*). M. Saber-Tehrani and S.A. Jafari Mohammadi. *grasas y aceites*, 64, 77–84.
- Gomathi, R., Manian, S., 2015. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): An endemic medicinal plant of India. *Industrial Crops and Products* 73, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.090>
- Gonçalves, R., Mateus, N., De Freitas, V., 2011. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry* 125, 665–672.
- Gottlieb, O.R., Borin, M.R. de M., 2000. Medicinal products: regulation of biosynthesis in space and time. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 115–120. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000100019>
- Gourine, Nadhir, Bombarda, I., Yousfi, M., Gaydou, E.M., 2010a. Chemotypes of *Pistacia atlantica* Leaf Essential Oils from Algeria. *Natural Product Communications* 5, 1934578X1000500128. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500128>
- Gourine, Nadhir, Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Gaydou, E., 2010b. Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 157–166.
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydou, E.M., 2010. Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products* 31, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.10.003>
- Grosdidier, A., 2007. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. 91.
- Grossberg, G.T., Edwards, K.R., Zhao, Q., 2006. Rationale for Combination Therapy With Galantamine and Memantine in Alzheimer's Disease. *The Journal of Clinical Pharmacology* 46, 17S-26S. <https://doi.org/10.1177/0091270006288735>
- Guedes, L.M., Aguilera, N., Becerra, J., Hernández, V., dos Santos Isaias, R.M., 2016. Leaf and stem galls of *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr (Anacardiaceae): Anatomical and chemical implications. *Biochemical systematics and ecology* 69, 266–273.

- Guenane, H., 2017. Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) (Doctorat es Sciences, option: Biochimie). Kasdi Merbah, Ourgla (Algérie).
- Guillouty, A., 2016. Plantes médicinales et antioxydants (Thèse de Doctorat en pharmacie). Université de Toulouse (France).
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27, 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol* 15, 1795–1810. <https://doi.org/10.1007/BF01012267>
- Hajjaj, G., Bahlouli, A., Sayah, K., Tajani, M., Cherrah, Y., Zellou, A., 2017. Phytochemical screening and in vivo antipyretic activity of the aqueous extracts of three Moroccan medicinal plants. *PBE* 4, 188. <https://doi.org/10.26510/2394-0859.pbe.2017.30>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., Chapelle, J.-P., 2007. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* 62, 628–638.
- Hall, T., 2004. BioEdit version 7.0. 0. Distributed by the author, website: [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R., 2002. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47, 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
- Hamdan, I.I., Afifi, F.U., 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.033>
- Hamia, C., 2007. Contribution à la composition et à l'étude chimique de l'huile du fruit de l'*Argania spinosa*. (Magister en chimie, option: chimie organique physio-chimie et moléculaire). Université Kasdi Merbah (Ourgla).
- Harrat, M., Benalia, M., Gourine, N., Yousfi, M., 2018. Variability of the chemical compositions of fatty acids, tocopherols and lipids antioxidant activities, obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 11, 199–215.
- Hartley, S.E., 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113, 492–501. <https://doi.org/10.1007/s004420050401>
- Hashemi, L., Asadi-Samani, M., Moradi, M.-T., Alidadi, S., 2017. Anticancer Activity and Phenolic Compounds of *Pistacia atlantica* Extract. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 7, 26–31.
- Hashemnia, M., Nikousefat, Z., Yazdani-Rostam, M., 2015. Antidiabetic effect of *Pistacia atlantica* and *Amygdalus scoparia* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology* 24, 1301–1306.
- Haslam, E., 1989. *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge University Press: Cambridge, NY, USA. CUP Archive.
- Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., 2014. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food chemistry* 145, 306–311.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *De La Recherche A La Pratique* 2, 3–6. <https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8>
- Herbert, R.B., 1989. *The Biosynthesis of secondary metabolites*. 2<sup>ème</sup> édition Chapman and Halle. p 2, 11-115.

- Hercend, C., 2012. Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de pathologies humaines : Application au transporteur ATP7B et au récepteur 5-HT2B (Biologie Cellulaire-Biochimie). Docteur de l'Université Paris V.
- Holtzman, D.M., Morris, J.C., Goate, A.M., 2011. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine* 3, 77sr1-77sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
- Hosseini, F., Adlgostar, A., Sharifnia, F., 2013. Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2, 1–7.
- Hosseini, S., Nili-Ahmadabadi, A., Nachvak, S.M., Dastan, D., Moradi, S., Abdollahzad, H., Mostafai, R., 2020. Antihyperlipidemic and Antioxidative Properties of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13, 1231–1236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S250417>
- Huang, T.H.W., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- $\gamma$  and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.009>
- Hussain, N., Irshad, F., Jabeen, Z., Shamsi, I.H., Jiang, L., 2013. Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in *Planta*; Past, Present, and Future Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6137–6149. <https://doi.org/10.1021/jf4010302>
- Ibrahim, S., Al-Ahdal, A., Khedr, A., Mohamed, G., 2017. Antioxidant  $\alpha$ -amylase inhibitors flavonoids from *Iris germanica* rhizomes. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.10.001>
- Imberty, A., Hardman, K.D., Carver, J.P., Perez, S., 1991. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. *Glycobiology* 1, 631–642. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.6.631>
- Imbs, T.I., Zvyagintseva, T.N., 2018. Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae. *Russ J Mar Biol* 44, 263–273. <https://doi.org/10.1134/S106307401804003X>
- Inbar, M., Izhaki, I., Koplovich, A., Lupo, I., Silanikove, N., Glasser, T., Gerchman, Y., Perevolotsky, A., Lev-Yadun, S., 2010. Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod-Plant Interactions* 4, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11829-009-9082-7>
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., 2003. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2495–2505. <https://doi.org/10.2174/0929867033456477>
- Iqbal, K., Zaidi, T., Wen, GuangY., Grundke-Iqbal, I., Merz, PatriciaA., Shaikh, SadiaS., Wisniewski, HenrykM., Alafuzoff, I., Winblad, B., 1986. Defective Brain Microtubule Assembly in Alzheimer's Disease. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8504 328, 421–426. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92134-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92134-3)
- Ismaili, L., Refouvelet, B., Benchekroun, M., Brogi, S., Brindisi, M., Gemma, S., Campiani, G., Filipic, S., Agbaba, D., Esteban, G., Unzeta, M., Nikolic, K., Butini, S., Marco-Contelles, J., 2016. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology, Neurobiology and Neuropharmacology of Monoaminergic systems* 151, 4–34. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.003>
- Itzhaki, H., Borochoy, A., Mayak, S., 1990. Age-Related Changes in Petal Membranes from Attached and Detached Rose Flowers. *Plant Physiology* 94, 1233–1236. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1233>
- Jacob, R.A., 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research* 15, 755–766. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00041-G](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00041-G)

- Jain, A.N., 2006. Scoring Functions for Protein-Ligand Docking. *Current Protein and Peptide Science* 7, 407–420. <https://doi.org/10.2174/138920306778559395>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* 275, 218–220. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>
- Jarald, E., Joshi, S.B., Jain, D. ch., 2008. Diabetes and herbal medicines 7, 97–106.
- Kabouche, S., 2010. Etude de la relation du thé vert. Maladies cardiovasculaires et Stress oxydant (Magister en physiopathologie cellulaire). Université Mentouri – Constantine.
- Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 277, 101–108. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90556-E](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90556-E)
- Kaku, K., 2010. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy 53, 6.
- Kasabri, V., Afifi, F.U., Hamdan, I., 2011. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 133, 888–896.
- Kašparová, S., Brezová, V., Valko, M., Horecký, J., Mlynárik, V., Liptaj, T., Vančová, O., Uličná, O., Dobrota, D., 2005. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochemistry International* 46, 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.02.006>
- Kebbab, R., 2014. Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variétés chamlal: Evaluation de l'activité avant et après deglycosylation. Mémoire de Magister en science biologique, spécialité: Biochimie appliquée, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Kebieche, M., 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse doctorat en biochimie, Université Mentouri de Constantine (Algérie), 143p.
- Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., Yousfi, M., 2017.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plant traditionally used in algeria for diabetes. *Current Enzyme Inhibition* 13, 67–78.
- Khacheba, I., Djeridane, A., Kameli, A., Yousfi, M., 2014. The inhibitory effect of some algerian plants phenolics extracts on the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities and their antioxidant activities. *Current Enzyme Inhibition* 10, 59–67.
- Khanbabaee, K., Ree, T. van, 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>
- Khatoon, S., Raja Rajan, R.G., Gopala Krishna, A.G., 2010. Physicochemical Characteristics and Composition of Indian Soybean Oil Deodorizer Distillate and the Recovery of Phytosterols. *J Am Oil Chem Soc* 87, 321–326. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1499-8>
- Khodavaisy, S., Rezaie, S., Noorbakhsh, F., Baghdadi, E., Sharifynia, S., Aala, F., 2016. Effects of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Jundishapur J Microbiol* 9, e35452. <https://doi.org/10.5812/jjm.35452>
- Kim, M.S., Lee, K.U., 2005. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. *J Mol Med* 83, 514–520. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0659-z>
- Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., Bryant, S.H., 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research* 44, D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>

- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J., 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 3, 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 206–220. <https://doi.org/10.1038/nrd1657>
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol* 30, 620–650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Kojo, S., 2004. Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1041–1064. <https://doi.org/10.2174/0929867043455567>
- Kozlowski, H., Luczkowski, M., Remelli, M., Valensin, D., 2012. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coordination Chemistry Reviews, Metal Ions in Neurodegenerative Diseases* 256, 2129–2141. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.013>
- Krentz, A.J., Bailey, C.J., 2005. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs* 65, 385–411. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005>
- Kuntz, I.D., 1992. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science* 257, 1078–1082. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1078>
- Labeled-Zouad, I., Ferhat, M., Öztürk, M., Abaza, I., Nadeem, S., Kabouche, A., Kabouche, Z., 2017. Essential Oils Composition, Anticholinesterase and Antioxidant Activities of *Pistacia atlantica* Desf. *Rec. Nat. Prod.* 5.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499–509. <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lagarda, M.J., García-Llatas, G., Farré, R., 2006. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41, 1486–1496.
- Lalout, W., 2016. Contribution a la modélisation des interactions dans les biomolécules: Cas de la Maladie de Parkinson (Doctorat en chimie-physique, Option : Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire). Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.
- Lavoie, M.-E., 2012. Inflammation, stress oxydant, profil métabolique : influence des apports alimentaires et de la dépense énergétique (Thèse de doctorat. en nutrition). Université de Montréal.
- Lawrence, G.D., 2013. Dietary Fats and Health: Dietary Recommendations in the Context of Scientific Evidence. *Adv Nutr* 4, 294–302. <https://doi.org/10.3945/an.113.003657>
- Leeson, P.D., Springthorpe, B., 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 6, 881–890. <https://doi.org/10.1038/nrd2445>
- Lev, E., Amar, Z., 2002. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology* 82, 131–145. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00182-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00182-4)
- Li, X., Chen, B., Xie, H., He, Y., Zhong, D., Chen, D., 2018. Antioxidant Structure–Activity Relationship Analysis of Five Dihydrochalcones. *Molecules* 23, 1162. <https://doi.org/10.3390/molecules23051162>
- Ling, W.H., Jones, P.J.H., 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life sciences* 57, 195–206.
- Lipinski, C.A., 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

- development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews, In Vitro Models for Selection of Development Candidates* 23, 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lugasi, A., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* 47, 119–125.
- Maamri, S., 2008. Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud Algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens (Magister en Biologie), Université de M'hamed Bougara, Boumerdes.
- Madjdoub, H., 2012. Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. Thèse doctorale en biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen (Algerie): 127 p.
- Mahmoudvand, H., Kheirandish, F., Kia, M.G., Kareshk, A.T., Yarahmadi, M., 2016. Chemical composition, protoscolicidal effects and acute toxicity of *Pistacia atlantica* Desf. fruit extract. *Natural Product Research* 30, 1208–1211. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046868>
- Maktouf, S., 2013. Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation (Doctorat en Microbienne et Enzymatique). Université de Toulouse.
- Mala, J.G.S., Takeuchi, S., 2008. Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview. *Anal Chem Insights* 3, ACI.S551. <https://doi.org/10.4137/ACI.S551>
- Mamun-or-Rashid, A.N.M., Hossain, M.S., Hassan, N., Dash, B.K., Sapon, M.A., Sen, M.K., 2014. A review on medicinal plants with antidiabetic activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3, 149–159.
- Mandade, R., Sreenivas, S.A., Choudhury, A., 2011. Radical Scavenging and Antioxidant Activity of *Carthamus tinctorius* Extracts. *Free Radicals and Antioxidants* 1, 87–93. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.3.12>
- Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Doctorat en biophysique, Université de Limoges, 220 p.
- Marinho, H.S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., Antunes, F., 2014. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* 2, 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>
- Martinez, J.-J.I., 2008. Impact of a gall-inducing aphid on *Pistacia atlantica* Desf. trees. *Arthropod-Plant Interactions* 2, 147–151. <https://doi.org/10.1007/s11829-008-9042-7>
- Martins, C., Carreiras, M.C., León, R., de los Ríos, C., Bartolini, M., Andrisano, V., Iriepa, I., Moraleda, I., Gálvez, E., García, M., Egea, J., Samadi, A., Chioua, M., Marco-Contelles, J., 2011. Synthesis and biological assessment of diversely substituted furo[2,3-b]quinolin-4-amine and pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-amine derivatives, as novel tacrine analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 6119–6130. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.038>
- Martz, F., 2014. Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques. (Doctorat en chimie). Université Paris Sud.
- Masunda, T.A., Mbala, M.B., Kayembe, S.J., Longoma, B.F., Ngbolua, K.N., Tshibangu, D.S.T., Mpiana, P.T., 2014. Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild.(Arecaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8, 2441–2451.
- Matés, J., Sánchez-Jiménez, F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci J Virtual Libr.* Mar 15;4:D339–45.

- Matou, M., Bercion, S., Merciris, P., Meyssonier, N.L., Fernand, D., Marianne-Pepin, T., 2016. Etude de la composition chimique et du potentiel pharmacologique associé de *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn. (1827) “ Grenn anba fèy ,” in: Colloque International Des Plantes Aromatiques et Médicinales (CIPAM) - 9ème Édition. Cayenne, French Guiana.
- Mbodj, N.A., 2003. Etude de l'activité antidiabétique des extraits acetoniques, méthanoliques et hexaniques de *Vernonia colorata* (WISLLD/ DRAKE) composées chez les rats wistar. Thèse doctorale en pharmacie, Université Cheikh anta diop de Dakar, 61p.
- McCoy, A.J., Chandana Epa, V., Colman, P.M., 1997. Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces<sup>11</sup> Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology* 268, 570–584. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0987>
- Mehrnejad, M.R., 2010. Potential Biological Control Agents of the Common Pistachio *Psylla*, *Agonoscena pistaciae*, a review. *Entomofauna* 31, 317–340.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D., Katan, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 77, 1146–1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>
- Merzoug, A., Chikhi, A., Bensegueni, A., Boucherit, H., Hioual, K.S., Mokrani, E.H., Teniou, S., 2012. Conception in silico de nouveaux antipneumocoques par l'inhibition de la peptide déformylase. *Les technologies de laboratoire* 7.
- Meyer, J., 1987. Plant galls and gall inducers. *Plant galls and gall inducers*.
- Miara, M.D., Teixidor-Toneu, I., Sahnoun, T., Bendif, H., Ait Hammou, M., 2019. Herbal remedies and traditional knowledge of the Tuareg community in the region of Illizi (Algerian Sahara). *Journal of Arid Environments* 167, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.04.020>
- Milane, H., 2004. Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capte urs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat. Strasbourg. (Thèse de Doctorat en Pharmacochimie). Université Louis Pasteur de Strasbourg.
- Milella, L., Milazzo, S., De Leo, M., Vera Saltos, M.B., Faraone, I., Tuccinardi, T., Lapillo, M., De Tommasi, N., Braca, A., 2016.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from *Arcytophyllum thymifolium*. *J. Nat. Prod.* 79, 2104–2112. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00484>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31, 426–428.
- Mitchell, J.D., Mori, S.A., 1987. The cashew and its relatives (*Anacardium*: *Anacardiaceae*). *Memoir. N. Y. Bot. Gard.* 42, 1–76.
- Mohammed, A., Kumar, D., Rizvi, S.I., 2015. Antidiabetic potential of some less commonly used plants in traditional medicinal systems of India and Nigeria. *J Intercult Ethnopharmacol* 4, 78–85. <https://doi.org/10.5455/jice.20141030015241>
- Mohammed, M.A., 2008. A study on the effect of levels of tannins on in vitro digestibility of different Sudanese varieties of sorghum grains.
- Mokhtar, S.H., Bakhuraysah, M.M., Cram, D.S., Petratos, S., 2013. The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2013, e910502. <https://doi.org/10.1155/2013/910502>
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol* 26, 211–219.

- Mona, A.M., 2008. A study on the effect of levels of tannins on in vitro digestibility of different Sudanese varieties of sorghum grains (A thesis). the Sudan Academy of Sciences in the Fulfillment of the Requirements for Master of Science in Animal Production.
- Mongens, M., 2013. Origine et conséquences du stress oxydant. École National Vétérinaire D'Alfort.
- Monjauze, A., 1980. Connaissance du Betoum *Pistacia atlantica* Desf. biologie et forêt. Revue Forestière Française 4, 357–363.
- Monjauze, A., 1968. Repartition et ecologie de *Pistacia atlantica* Desf. en Algerie. Bulletin de la Societe d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord. 56: 1-127.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. Progress in lipid research 41, 457–500.
- Moroy, G., 2005. Etude structurale du domaine d'interaction du récepteur de l'élastine : Approches biochimiques, biophysiques et bioinformatiques (Thèse de doctorat en Biomolécules et dynamique cellulaire ). Université de Reims.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G., 2001. The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. Archives of Biochemistry and Biophysics 385, 13–19. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2172>
- Muanda, F.N., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques (Doctorat en Chimie organique). Université Paul Verlaine-Metz.
- Nachar, A., 2014. Évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales de la forêt boréale et identification des principes actifs de deux espèces prometteuses. Thèse doctoral en pharmacologie, option: moleculaire, Université Montréal, 170p.
- Nagappan, H., Pee, P.P., Kee, S.H.Y., Ow, J.T., Yan, S.W., Chew, L.Y., Kong, K.W., 2017. Malaysian brown seaweeds *Sargassum siliquosum* and *Sargassum polycystum*: Low density lipoprotein (LDL) oxidation, angiotensin converting enzyme (ACE),  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activities. Food Research International 99, 950–958.
- Nair, Sindhu.S., Kavrekar, V., Mishra, A., 2013. Evaluation of In Vitro Anti diabetic Activity of Selected Plant Extracts. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 2, 12–19.
- Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A., 2013. Evaluation of in vitro antidiabetic activity of selected plant extracts. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 2, 12–19.
- Ndomou, M., Djidjou, P.K., Ayong, M.N., Gouado, I., Tchiegang, C., 2014. Evaluation de l'activite antidiabetique des extraits de feuilles de *Gnetum africanum* et *Gnetum bulchozzianum* (Gnétacées). Sciences Technologies et Développement 15.
- Nia, S., Benarous, Kh., Lakaas, M., Sadeki, I., Yousfi, M., 2020. New Inhibition Detection Method to Evaluate the Human Salivary Alphaamylase Activity of Some Drugs, Molecular Docking, and SAR Studies. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistryrrent Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents) 19, 1–13. <https://doi.org/10.2174/1871523019666200102111048>
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V., Vriend, G., 2001. The determinants of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. Protein Engineering, Design and Selection 14, 505–512. <https://doi.org/10.1093/protein/14.7.505>
- Nogara, P.A., Saraiva, R. de A., Caeran Bueno, D., Lissner, L.J., Lenz Dalla Corte, C., Braga, M.M., Rosemberg, D.B., Rocha, J.B.T., 2015. Virtual Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors Using the Lipinski's Rule of Five and ZINC Databank. BioMed Research International 2015, e870389. <https://doi.org/10.1155/2015/870389>

- Noudri, T., 2011. L' $\alpha$ -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation (Doctorat en Biochimie /Biotechnologies). Université Mentouri -Constantine.
- Ogunwa, T.H., Ayenitaju, F.C., 2017. An insight into the precise molecular interaction and inhibitory potential of amentoflavone and its substituted derivatives on human  $\alpha$ -amylase. *Archives of Current Research International* 1–14.
- Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry, Tannins and Related Polyphenols (Part 1)* 66, 2012–2031. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.023>
- Okuda, T., Ito, H., 2011. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules* 16, 2191–2217. <https://doi.org/10.3390/molecules16032191>
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J.V., Vicha, R., Mlcek, J., 2015. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 12871–12890. <https://doi.org/10.3390/ijms160612871>
- Othman, S.O.K., El-Hashash, M.A., Hussein, S., El-Mesallamy, A.M.D., Rizk, S.A., Elabbar, F.A., 2019. Phenolic Content as Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) Extract from Libya. *Egyptian Journal of Chemistry* 62, 21–28. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2018.4577.1403>
- Oukoloff, K., Coquelle, N., Bartolini, M., Naldi, M., Le Guevel, R., Bach, S., Josselin, B., Ruchaud, S., Catto, M., Pisani, L., Denora, N., Iacobazzi, R.M., Silman, I., Sussman, J.L., Buron, F., Colletier, J.-P., Jean, L., Routier, S., Renard, P.-Y., 2019. Design, biological evaluation and X-ray crystallography of nanomolar multifunctional ligands targeting simultaneously acetylcholinesterase and glycogen synthase kinase-3. *European Journal of Medicinal Chemistry* 168, 58–77. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.063>
- Ozenda, P., 1977. Flore du Sahara. 2 ème Ed. CNRS. Paris, 622 p.
- Öztaşkın, N., Çetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., Gülçin, İ., 2015. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. *Bioorganic Chemistry* 60, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.04.006>
- Pachoulide, C., 2021. Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique. Exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des  $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome. (docteur en Pharmacie). Université de Limoges.
- Padulosi, S., Hadj-Hassan, A., 1998. Towards a Comprehensive Documentation of Distribution and Use of *Pistacia* Genetic Diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 25–30.
- Park, K.-Y., Jung, G.-O., Lee, K.-T., Choi, J., Choi, M.-Y., Kim, G.-T., Jung, H.-J., Park, H.-J., 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.043>
- Parsons, C.G., Danysz, W., Dekundy, A., Pulte, I., 2013. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotox Res* 24, 358–369. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9398-z>
- Patel, Avani, Patel, Amit, Patel, Amit, Patel, N.M., 2010. Determination of polyphenols and free radical scavenging activity of *Tephrosia purpurea* linn leaves (Leguminosae). *Pharmacognosy Res* 2, 152–158. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.65509>

- Peksel, A., Arisan, I., Yanardag, R., 2013. Radical scavenging and anti-acetylcholinesterase activities of aqueous extract of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) leaves. *Food Sci Biotechnol* 22, 515–522. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0109-6>
- Peksel, A., Arisan-Atac, I., Yanardag, R., 2010. Evaluation of Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of the Extracts of *Pistacia Atlantica* Desf. Leaves. *Journal of Food Biochemistry* 34, 451–476. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00290.x>
- Pesson, P., Louveaux, J., 1984. Pollinisation et production végétale. INRA. Paris, 179p.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.-M., 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 939–966.
- Pohanka, M., 2014. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers* 69, 4–16. <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0542-x>
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1985. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- Pryor, W.A., 2000. Vitamin E and heart disease:: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 141–164. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00224-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00224-5)
- Quideau, S., 2009. Chemistry and Biology of an underestimated class of bioactive plant polyphenols Ellagitannins. World Scientific Publishing, pp.1-367.
- Rafique, R., Khan, K.M., Arshia, Kanwal, Chigurupati, S., Wadood, A., Rehman, A.U., Karunanidhi, A., Hameed, S., Taha, M., al-Rashida, M., 2020. Synthesis of new indazole based dual inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes, their in vitro, in silico and kinetics studies. *Bioorganic Chemistry* 94, 103195. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103195>
- Rahman, H.S., 2018. Phytochemical analysis and antioxidant and anticancer activities of mastic gum resin from *Pistacia atlantica* subspecies *kurdica*. *Onco Targets Ther* 11, 4559–4572. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170827>
- ramakrishna, H., Murthy, S., Murthy, G.P., 2012. Hydroxy radical and DPPH scavenging activity of crude protein extract of *Leucas linifolia*: A folk medicinal plant. *Asian J Plant Sci Res* 2.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G., 1996. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology* 261, 470–489. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0477>
- Rathinavelusamy, P., Mazumder, P.M., Sasmal, D., Jayaprakash, V., 2014. Evaluation of *in silico*, *in vitro*  $\alpha$ -amylase inhibition potential and antidiabetic activity of *Pterospermum acerifolium* bark. *Pharmaceutical Biology* 52, 199–207. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.823551>
- Rayar, A.-M., 2017. In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2 (Docteur du Conservatoire National des Arts et Métiers, Spécialité : Chimie organique, minérale, industrielle). École Doctorale Sciences des Métiers de L'ingénieur à Paris (France).
- Retsky, K.L., Chen, K., Zeind, J., Frei, B., 1999. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 90–98. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00151-8)

- Rezaire, A., 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) (Thèse de doctorat en Phytochimie). Antilles-Guyane.
- Rhazi, N., 2015. Mise au point de mélanges collants écologiques d'*Acacia mollissima* du Maroc (thesis). Pau, (Casablanca, Maroc).
- Richardin, P., Capderou, C., Flieder, F., Bonnassies, S., Raison, D., 1988. Analyse de quelques tannins végétaux utilisés pour la fabrication des cuirs. pp. 151–182.
- Rira, M., 2019. Les tanins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical (Thèse de Doctorat, Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation). Université Clermont Auvergne.
- Rojas-Garbanzo, C., Zimmermann, B.F., Schulze-Kaysers, N., Schieber, A., 2017. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Food Research International*, SI: Phytochemical Profiles 100, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.004>
- Roldán-Peña, J.M., Romero-Real, V., Hicke, J., Maya, I., Franconetti, A., Lagunes, I., Padrón, J.M., Petralla, S., Poeta, E., Naldi, M., Bartolini, M., Monti, B., Bolognesi, M.L., López, Ó., Fernández-Bolaños, J.G., 2019. Tacrine-O-protected phenolics heterodimers as multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease: Selective subnanomolar BuChE inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 181, 111550. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.053>
- Rowshan, V., Bahmanzadegan, A., Tarakemeh, A., 2013. Volatile compounds of *Pistacia atlantica* Desf. galls and leaves by Combi-PAL system technique. *Journal of Applied Science & Engineering Technology*, 3, 796–798.
- Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C., 2013. Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? *Phytochemistry* 88, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.12.003>
- Saad, A.F., Virella, G., Chassereau, C., Boackle, R.J., Lopes-Virella, M.F., 2006. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *Journal of Lipid Research* 47, 1975–1983. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600064-JLR200>
- Sahnoun, M., Trabelsi, S., Bejar, S., 2017. Citrus flavonoids collectively dominate the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitions. *Biologia* 72. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0091>
- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., Fujisawa, S., 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry, Tannins and Related Polyphenols (Part 1)* 66, 2108–2120. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.013>
- Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D., 2012.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 15, 141–183.
- Samavati, V., Adeli, M., 2014. Isolation and characterization of hydrophobic compounds from carbohydrate matrix of *Pistacia atlantica*. *Carbohydrate Polymers* 101, 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.069>
- Santiso, E.E., Gubbins, K.E., 2004. Multi-scale Molecular Modeling of Chemical Reactivity. *Molecular Simulation* 30, 699–748. <https://doi.org/10.1080/08927020412331294878>
- Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., Quideau, S., 2006. Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine

- Aged in Oak Barrels. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7349–7354. <https://doi.org/10.1021/jf061724i>
- Scheen, A., Mathieu, C., 2012. Recommandations 2012 en diabetologie Prise en charge de l'hyperglycémie dans le diabète de type 2 : une approche centrée sur le patient. *Rev Med Liège* 9.
- Schmauch, G., 2010. Interactions tanins proteines en oenologie. (Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Médicales , option : Œnologie et Ampéologie). Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology, Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds* 91, 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Schroeder, F.C., del Campo, M.L., Grant, J.B., Weibel, D.B., Smedley, S.R., Bolton, K.L., Meinwald, J., Eisner, T., 2006. Pinoresinol: A lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *PNAS* 103, 15497–15501.
- Sengupta, A., Gupta, J.K., Dutta, J., Ghosh, A., 1973. The component fatty acids of chaulmoogra oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24, 669–674. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740240606>
- Senthil, S.L., Raghu, C., H.a., A., P., A., 2019. In vitro and in silico inhibition properties of fucoidan against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -D-glucosidase with relevance to type 2 diabetes mellitus. *Carbohydrate Polymers* 209, 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.039>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T., 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Shad, M.A., Pervez, H., Zafar, Z.I., Nawaz, H., Khan, H., 2012. Physicochemical properties, fatty acid profile and antioxidant activity of peanut oil. *Pak. J. Bot* 44, 435–440.
- Shepherd, P.R., Kahn, B.B., 1999. Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine* 341, 248–257. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410406>
- Shialy, Z., Zarrin, M., Sadeghi Nejad, B., Yusef Naanaie, S., 2015. In vitro antifungal properties of Pistacia atlantica and olive extracts on different fungal species. *Curr Med Mycol* 1, 40–45. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.4.40>
- Sifi, I., 2016. Activité Biologique et Analyse Chimique des Huiles Essentielles des Galles du Pistachier de l'Atlas (Thesis).
- Sifi, I., Dzoyem, J.P., Ouinten, M., Yousfi, M., McGaw, L.J., Eloff, J.N., 2015. Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of Pistacia atlantica Desf. From Algeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 12, 150–155.
- Smail-Saadoun, N., 2005. Types stomatiques du genre Pistacia: Pistacia atlantica Desf. ssp. atlantica et Pistacia lentiscus L. Options méditerranéennes, série A, N°63, 369–371.
- Smith, L.I., 2002. A tutorial on principal components analysis.
- Sofowora, A., 1982. Medicinal plants and traditional medicine in Africa. *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*.
- Somon, E., 1987. Arbres et arbrisseaux en Algérie. Edit. O.P.U. Alger, 586p.
- Søndergaard, C.R., Garrett, A.E., Carstensen, T., Pollastri, G., Nielsen, J.E., 2009. Structural Artifacts in Protein–Ligand X-ray Structures: Implications for the Development of Docking Scoring Functions. *J. Med. Chem.* 52, 5673–5684. <https://doi.org/10.1021/jm8016464>

- Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J., 2006. Protein–ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, 15–26. <https://doi.org/10.1002/prot.21082>
- Spickett, C.M., 2013. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biology* 1, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>
- Spyrakakis, F., Cozzini, P., Kellogg, G.E., 2010. Docking and Scoring in Drug Discovery, in: *Burger’s Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. American Cancer Society, pp. 601–684. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc140>
- Stevanovic, T., Perrin, D., 2009. *Chimie du bois*. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes, vol. (p: 179-180.). ISBN 978-2-88074-799-2.
- Su, H.-C., Hung, L.-M., Chen, J.-K., 2006. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290, E1339–E1346. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00487.2005>
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872–879. <https://doi.org/10.1126/science.1678899>
- Sy, G.Y., Barbosa, F.S., Wele, A., Gueye, P.M., Gueye, C.D., Cisse, A., Dieye, A.M., Bassene, E., Faye, B., 2011. Activité anti-hyperglycémiant de la fraction f2 de l’extrait total acetonique de feuilles de *Vernonia colorata* (Compositae). *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine* 15.
- Szegletes, T., Mallender, W.D., Thomas, P.J., Rosenberry, T.L., 1999. Substrate Binding to the Peripheral Site of Acetylcholinesterase Initiates Enzymatic Catalysis. Substrate Inhibition Arises as a Secondary Effect. *Biochemistry* 38, 122–133. <https://doi.org/10.1021/bi9813577>
- Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G.P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C., 1996. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85, 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81094-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81094-6)
- Tabti, L., Dib, M.E.A., Tabti, B., Costa, J., Muselli, A., 2020. Insecticidal Activity of Essential Oils of *Pistacia atlantica* Desf. and *Pistacia lentiscus* L. Against *Tribolium confusum* Dul. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 7, 111–115. <https://doi.org/10.30491/jabr.2020.107583>
- Taha, M., Ismail, N.H., Javaid, K., Imran, S., Anouar, E.H., Wadood, A., Atia-tul-Wahab, Ali, M., Khan, K.M., Saad, S.M., Rahim, F., Choudhary, M.I., 2015. Evaluation of 2-indolcarbohydrazones as potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, in silico studies and DFT based stereochemical predictions. *Bioorganic Chemistry* 63, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.09.001>
- Tahar, S.B., Hadj-Mahammed, M., Yousfi, M., 2015. Etude de l’Activité Antioxydante des Extraits Phénoliques de l’*Atriplex Halimus* L et de l’*Haloxylon Scoparium* Pomel du Sahara Septentrional. *Hawliyyāt al-‘Ulūm wa-al-Tiknūlūjiyā* 281, 1–10.
- Takada-Takatori, Y., Kume, T., Sugimoto, M., Katsuki, H., Sugimoto, H., Akaike, A., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer’s disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology* 51, 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.007>
- Tara, S., Elcock, A.H., Kirchoff, P.D., Briggs, J.M., Radic, Z., Taylor, P., McCammon, J.A., 1998. Rapid binding of a cationic active site inhibitor to wild type and mutant mouse

- acetylcholinesterase: Brownian dynamics simulation including diffusion in the active site gorge. *Biopolymers* 46, 465–474. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199812\)46:7<465::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199812)46:7<465::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y)
- Taran, M., Mohebal, M., Esmaeli, J., 2010. In Vivo Efficacy of Gum Obtained Pistacia Atlantica in Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Public Health* 39, 36–41.
- Taylor, R.D., Jewsbury, P.J., Essex, J.W., 2003. FDS: Flexible ligand and receptor docking with a continuum solvent model and soft-core energy function. *Journal of Computational Chemistry* 24, 1637–1656. <https://doi.org/10.1002/jcc.10295>
- Telli, A., 2017. Activités anti-oxydante, antimicrobienne et antidiabétique de deux espèces spontanées utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Ouargla: *Amodaucus leucotrichus* et *Anvillea radiata* (Magister en Sciences de la Nature et de la Vie). Université Kasdi Merbah-Ouargla.
- Tetu, D., 2005. Facteurs génétiques et stress oxydatif impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Thèse de Doctorat en Pharmacie). Université Grenoble Alpes.
- Tissier, M., 2011. Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin (Thèse Méd. Vét.). Université de Lyon.
- Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V., Meftahizade, H., 2011. Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*. *JMPR* 5, 4310–4314. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000613>
- Toul, F., Belyagoubi-Benhammou, N., Zitouni, A., Atik-Bekkara, F., 2017. Antioxidant activity and phenolic profile of different organs of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Natural product research* 31, 718–723.
- Trott, O., Olson, A.J., 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tzakou, O., Bazos, I., Yannitsaros, A., 2007. Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 358–362. <https://doi.org/10.1002/ffj.1805>
- Uddin, G., Ismail, Rauf, A., Raza, M., Khan, H., Nasruddin, Khan, M., Farooq, U., Khan, A., Arifullah, 2016. Urease inhibitory profile of extracts and chemical constituents of *Pistacia atlantica* ssp. *cabulica* Stocks. *Natural Product Research* 30, 1411–1416. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1062378>
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, in: Vermerris, W., Nicholson, R. (Eds.), *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 151–196. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_4)
- Viaules, M., 2016. Les Médicaments Anti-Alzheimer: Efficacité et évolution de leur prescription au CHU de Toulouse (Thèse de Doctorat en Pharmacie). Université Toulouse III Paul Sabatier.
- Vieira, L.M.M., Kijjoa, A., 2005. Naturally-Occurring Xanthenes: Recent Developments. *Current Medicinal Chemistry* 12, 2413–2446. <https://doi.org/10.2174/092986705774370682>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W., 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial crops and products* 44, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>

- Warren, G.L., Do, T.D., Kelley, B.P., Nicholls, A., Warren, S.D., 2012. Essential considerations for using protein–ligand structures in drug discovery. *Drug Discovery Today* 17, 1270–1281. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.06.011>
- Watkins, P.J., 2003. Cardiovascular disease, hypertension, and lipids. *BMJ* 326, 874–876. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7394.874>
- Weinman, S., Mehul, P., 2004. *Toute la Biochimie*. Ed. Dunod. Paris, pp. 324–326.
- Weis, A.E., Walton, R., Crego, C.L., 1988. Reactive Plant Tissue Sites and the Population Biology of Gall Makers. *Annual Review of Entomology* 33, 467–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.002343>
- Wyrepkowski, C.C., Gomes da Costa, D.L.M., Sinhorin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., Dos Santos, L.C., 2014. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules* 19, 16039–16057. <https://doi.org/10.3390/molecules191016039>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers* 1, 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Yaaqobi, A., El Hafid, L., Haloui, B., 2009. Etude Biologique de *Pistacia atlantica* Desf. de la région orientale du Maroc. *Biomatec Echo* 3, 39–49.
- Yoram, G., Inbar, M., 2011. Distinct antimicrobial activities in aphid galls on *Pistacia atlantica*. *Plant Signaling & Behavior* 6, 2008–2012. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18031>
- Yoshida, H., Kajimoto, G., Emura, S., 1993. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *J Am Oil Chem Soc* 70, 989–995. <https://doi.org/10.1007/BF02543025>
- Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Duhem, B., Gaydou, E.M., 2009. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 23, 1237–1242.
- Yousfi, M., Nedjmi, B., Bellal, R., Bertal, D.B., Palla, G., 2002. Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 1049–1050. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0601-8>
- Yousuf, H., Shamim, S., Khan, K.M., Chigurupati, S., Kanwal, Hameed, S., Khan, M.N., Taha, M., Arfeen, M., 2020. Dihydropyridines as potential  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Synthesis, in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry* 96, 103581. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103581>
- Zavodszky, M.I., Kuhn, L.A., 2005. Side-chain flexibility in protein–ligand binding: The minimal rotation hypothesis. *Protein Science* 14, 1104–1114. <https://doi.org/10.1110/ps.041153605>
- Zerargui, F., 2015. *Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives (Thèse de Doctorat en Biologie, option: Biochimie)*. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Zhen, J., Dai, Y., Villani, T., Giurleo, D., Simon, J.E., Wu, Q., 2017. Synthesis of novel flavonoid alkaloids as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25, 5355–5364. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.055>
- Zhu, J., Chen, C., Zhang, B., Huang, Q., 2019. The inhibitory effects of flavonoids on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 695–708. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1548428>
- Ziane, N., 2014. *Contribution à l'étude de l'activité hypoglycémiant des extraits de *Pistacia atlantica* Desf de la réserve nationale d'El-Mergueb (M'sila) -Algérie (Magister en Biologie et Physiologie Végétale, Option: Valorisation des Ressources Végétales, Université Ferhat Abbas, Sétif)*.

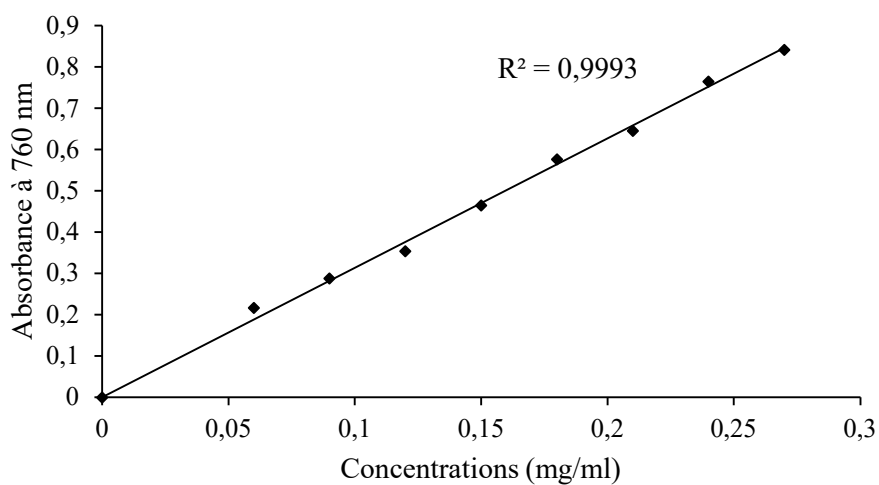
Zohary, M., 1952. A monographical study of the genus Pistacia. Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series) 5, 187–228.

# ***Annexes***

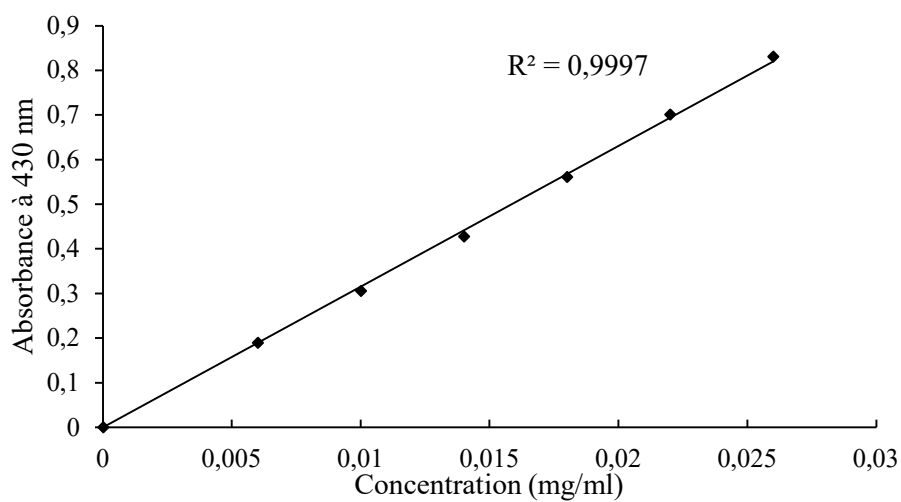
---

**Annexe 01** : Les courbes d'étalonnage des dosages colimétriques (CPT, FT, TCT, TT et ST).

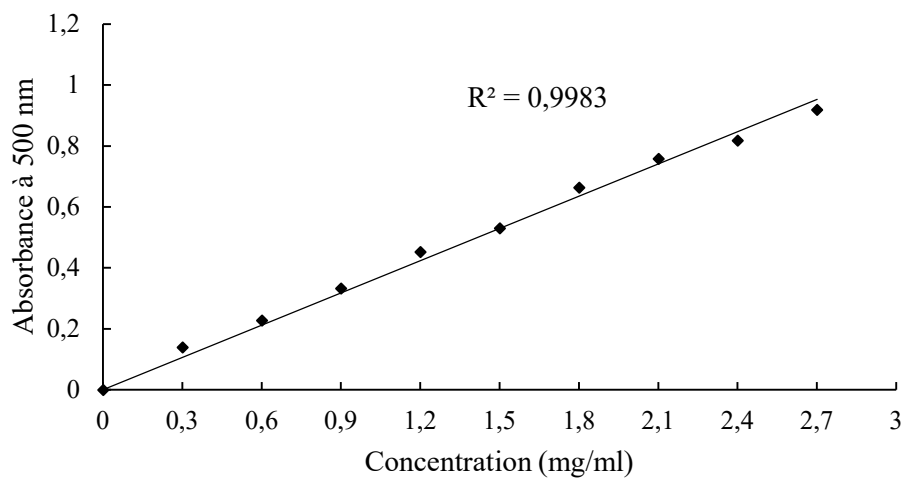
**Acide gallique**

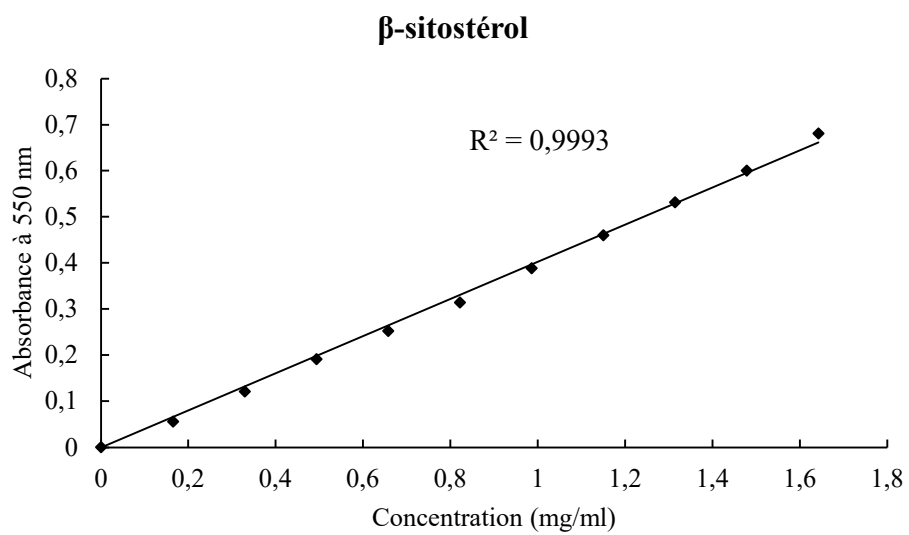
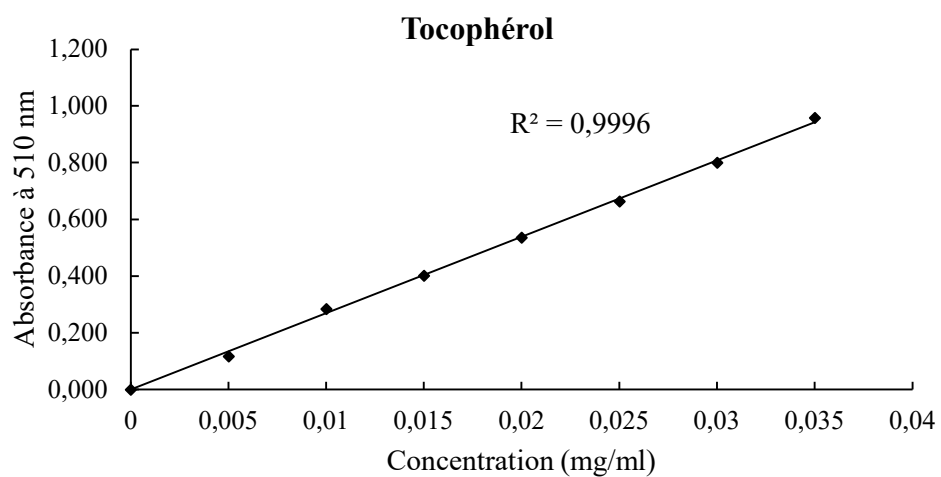


**Quercetine**



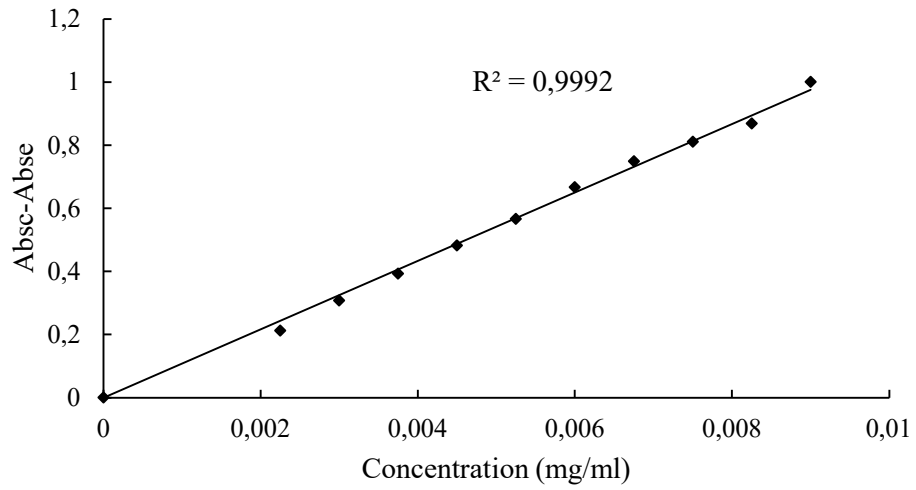
**Catéchine**



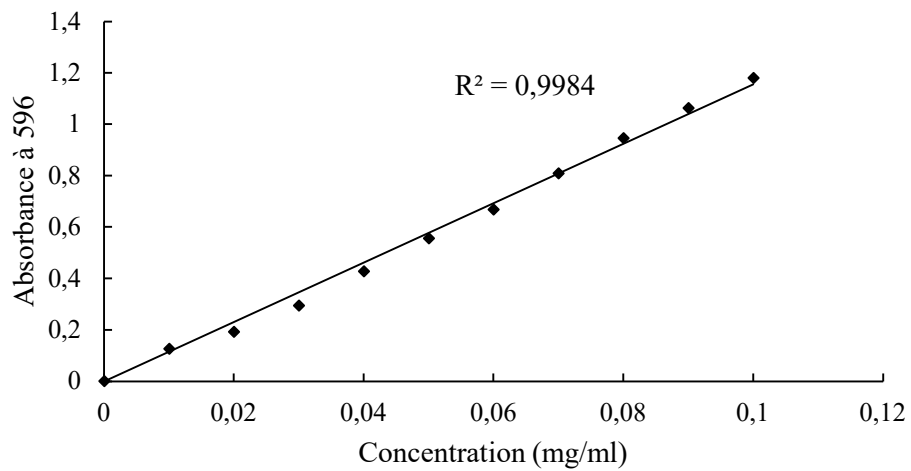


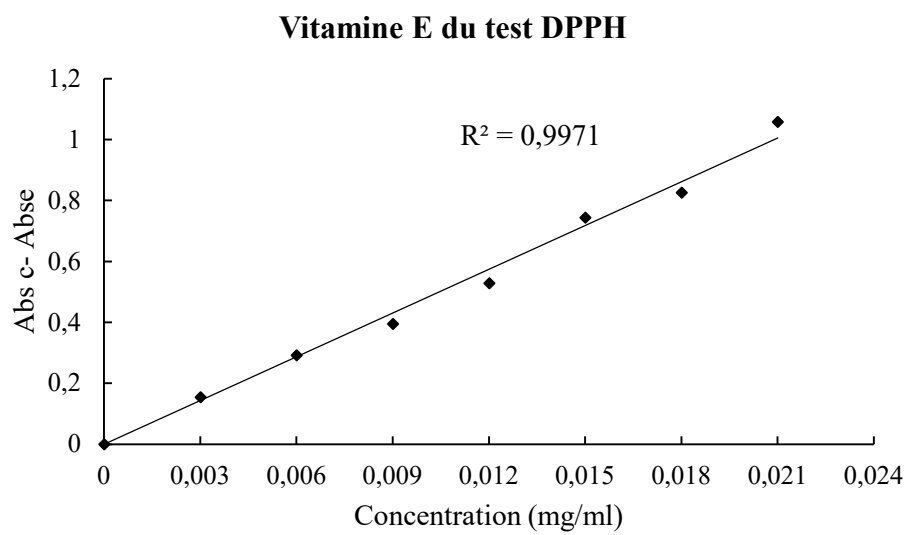
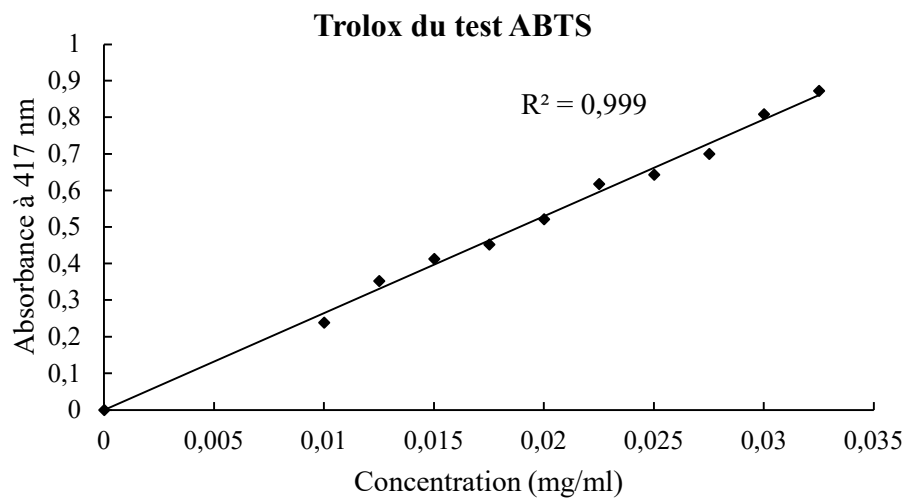
**Annexe 02** : Les courbes d'étalonnage des tests de l'activité antioxydative (DPPH<sup>•</sup>, FRAP et ABTS<sup>•+</sup>).

**Vitamine C du test DPPH**

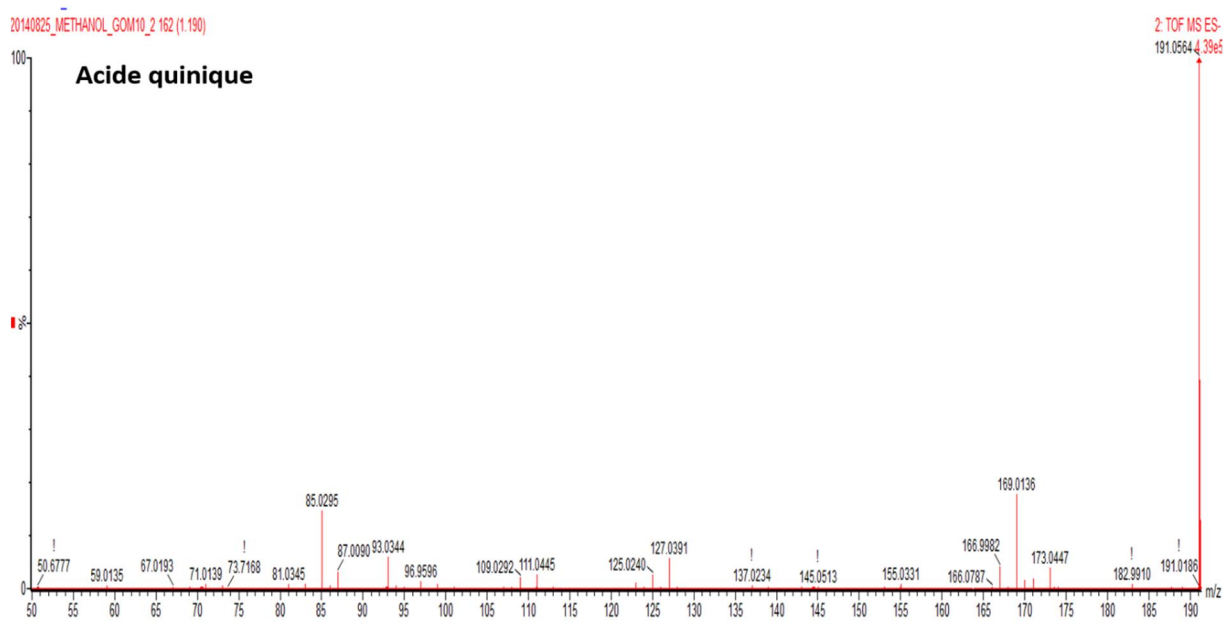


**Vitamine C du test FRAP**

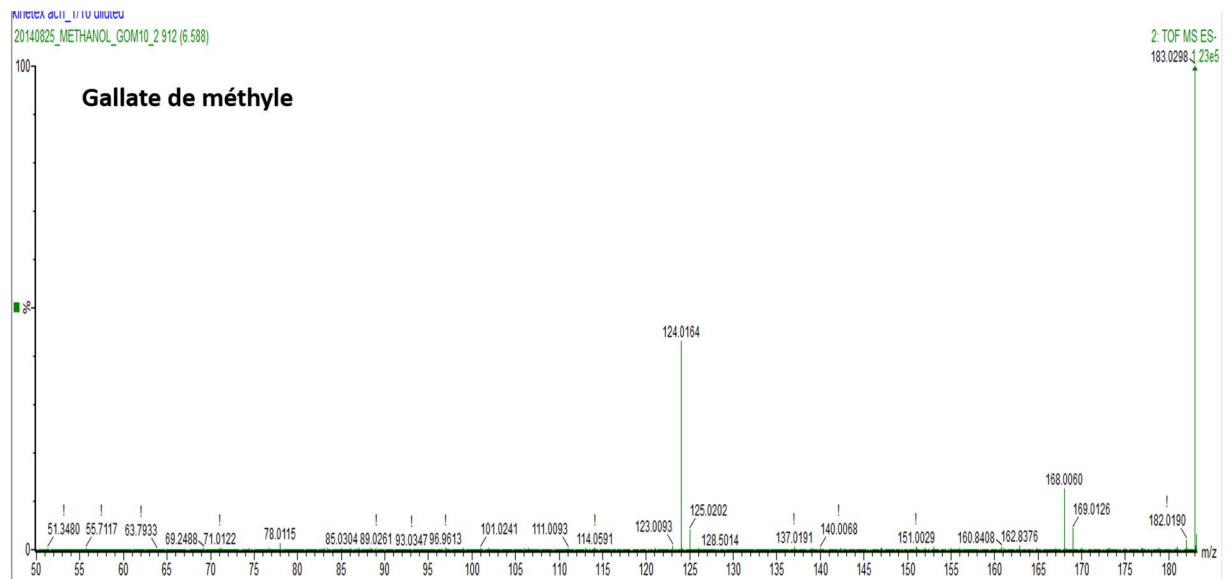




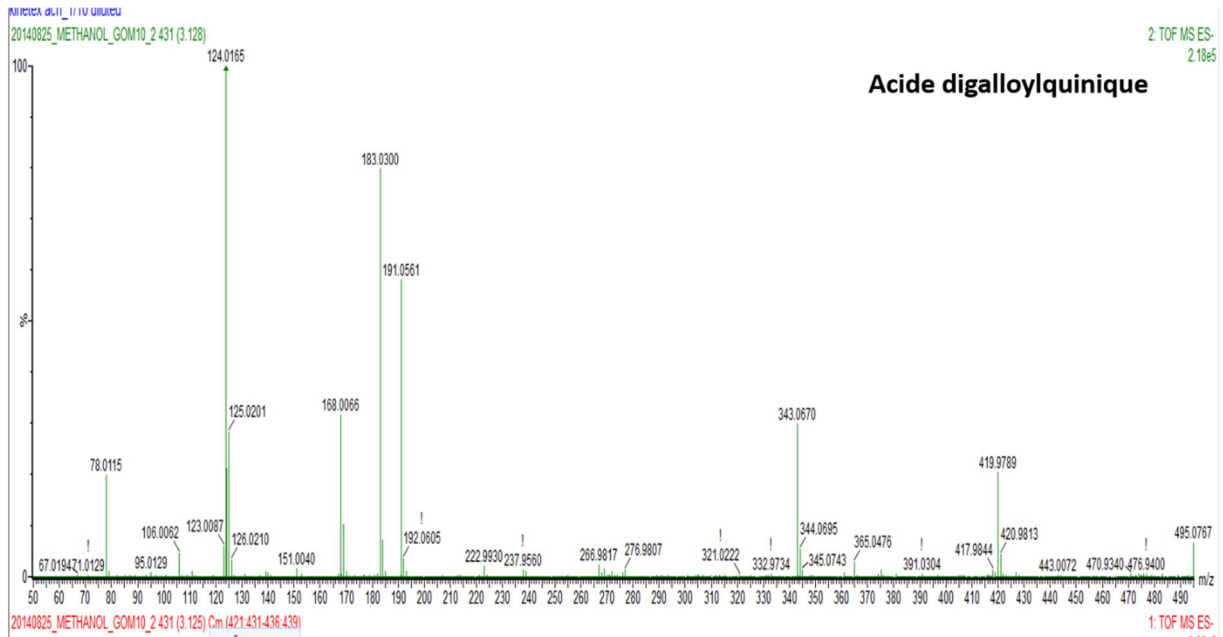
### Annexe 03 : Le spectre de masse des composés.



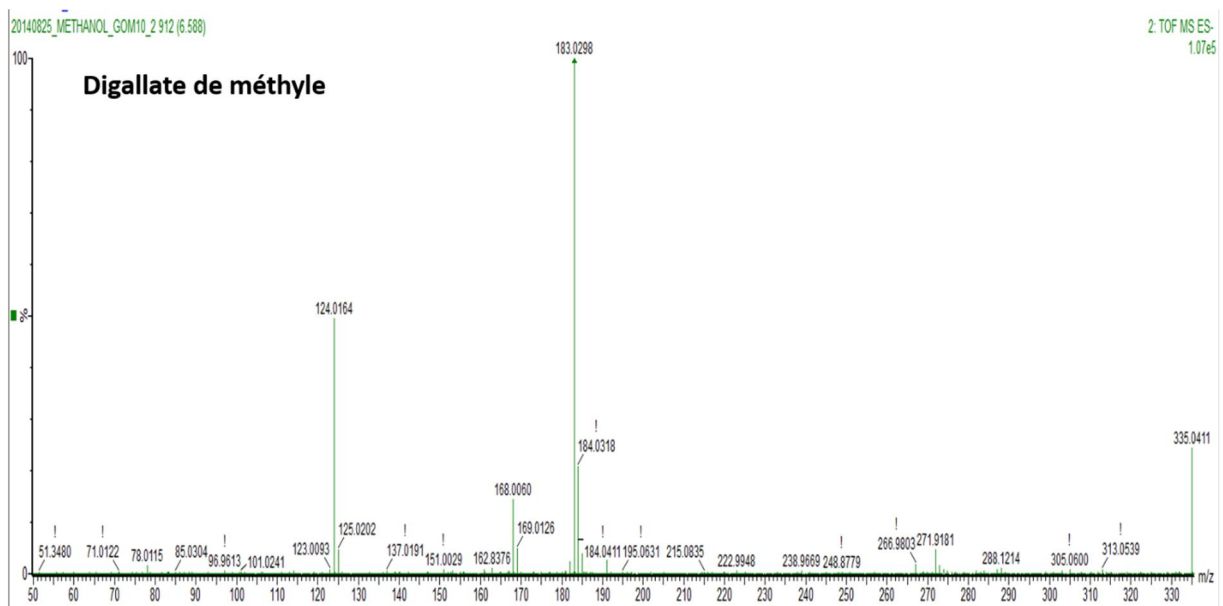
Le spectre de masse de l'acide quinique.



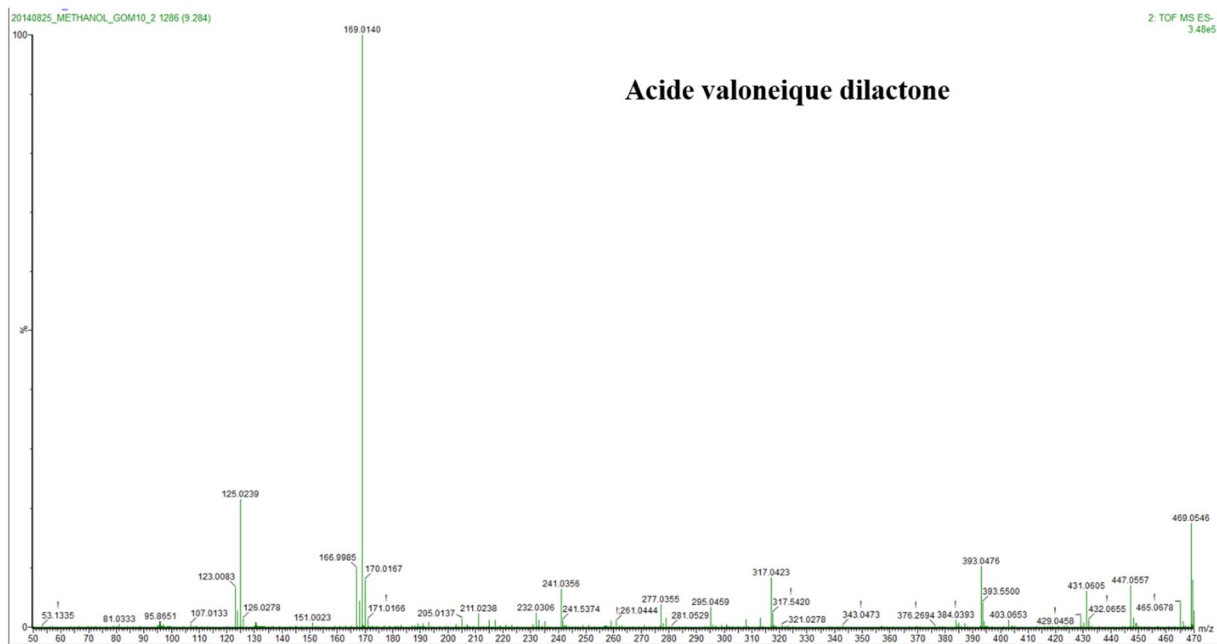
Le spectre de masse de gallate de méthyle.



Le spectre de masse de l'acide digalloylquinique.

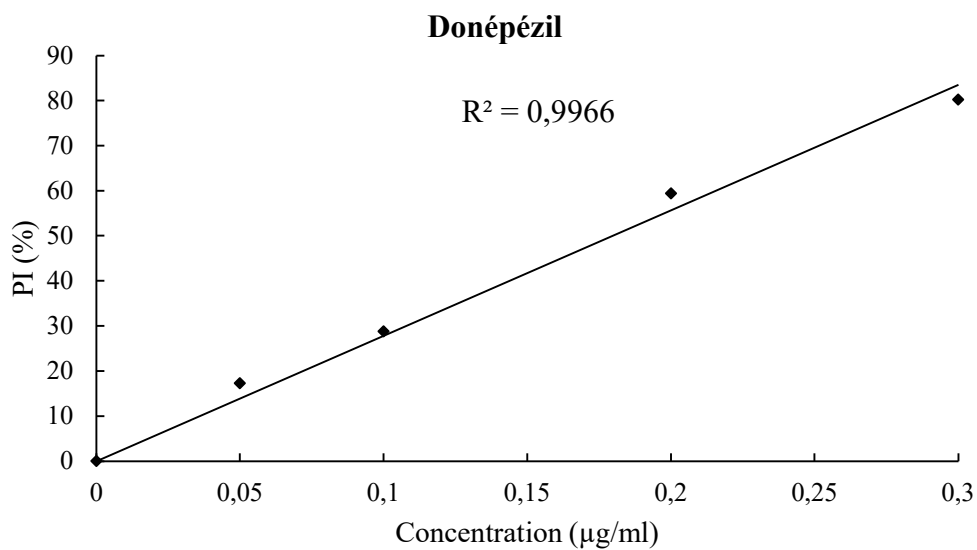
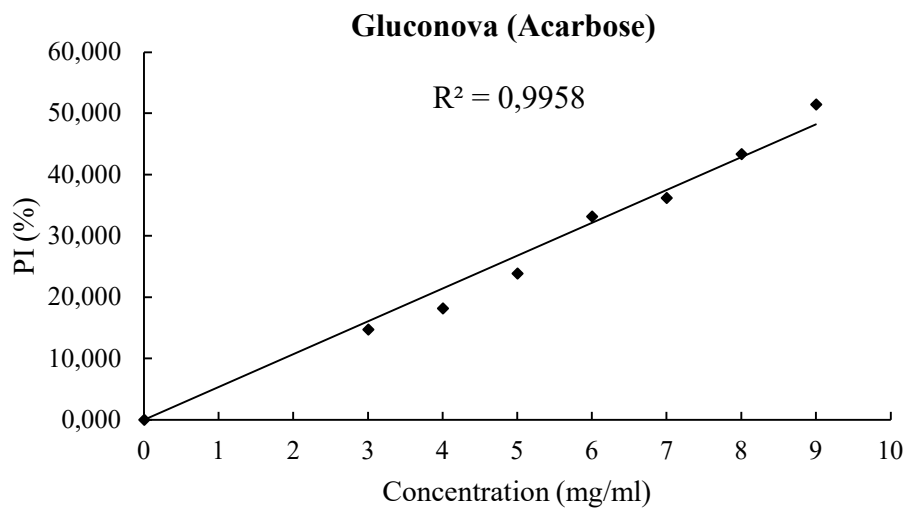


Le spectre de masse de digallate de méthyle.

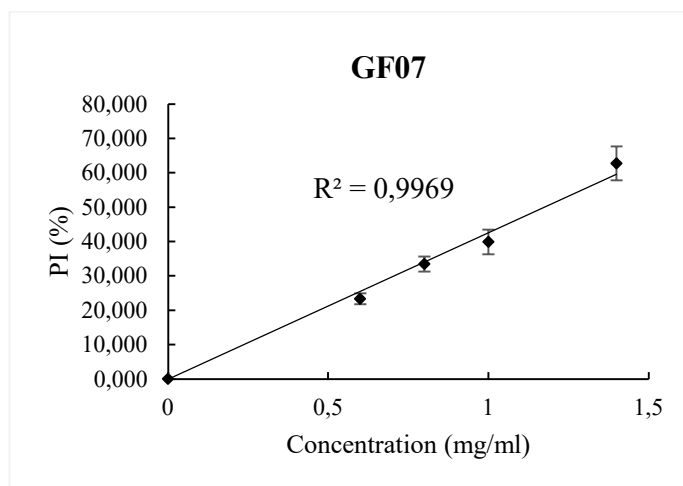
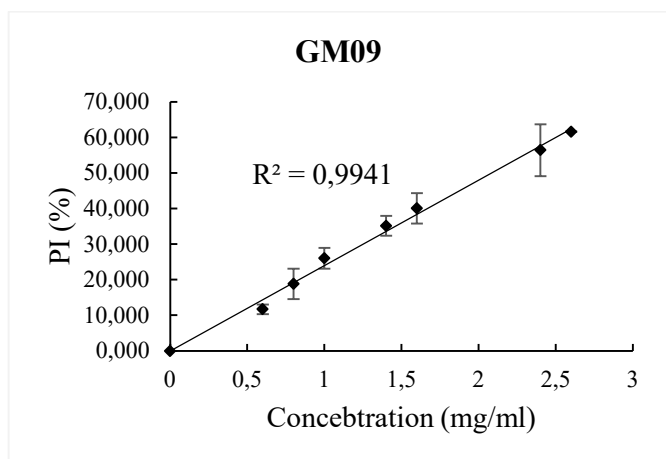
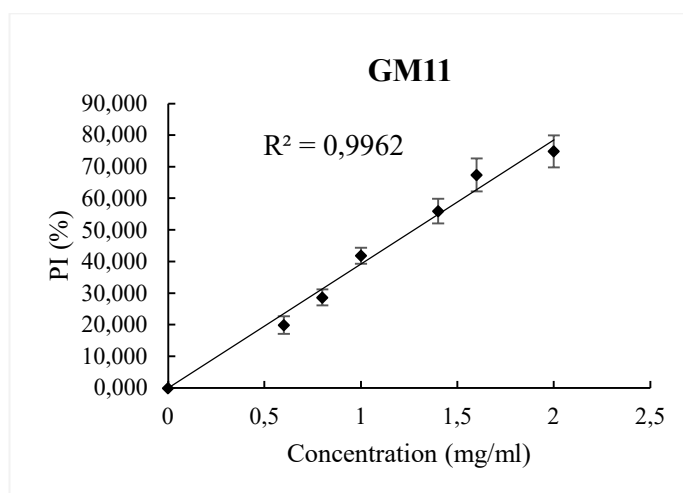
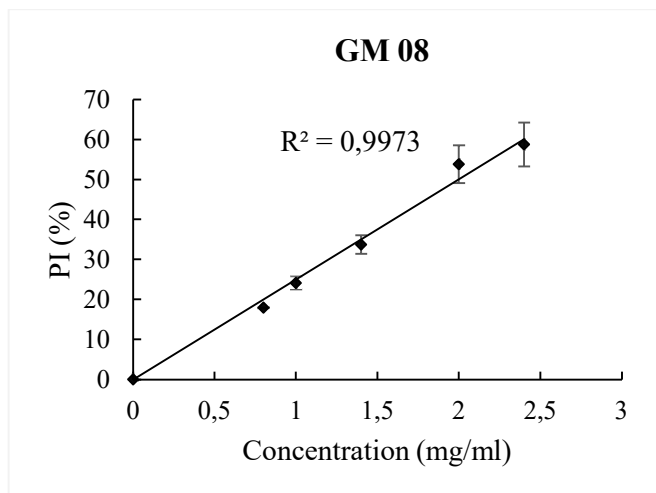
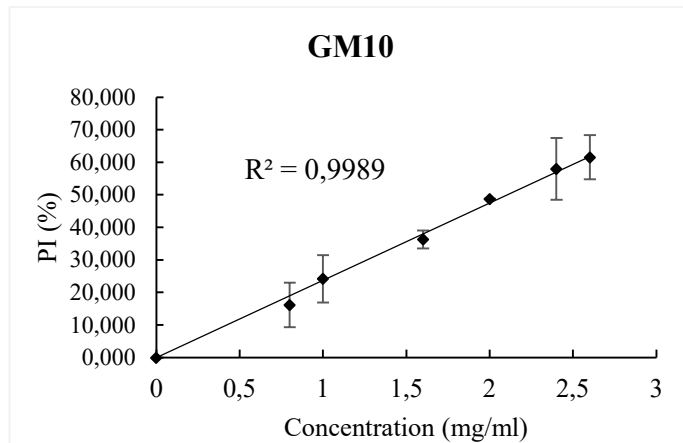
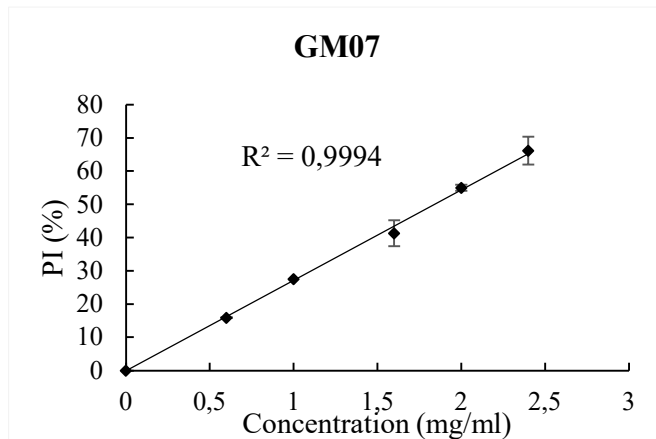


Le spectre de masse de l'acide valoneique dilactone.

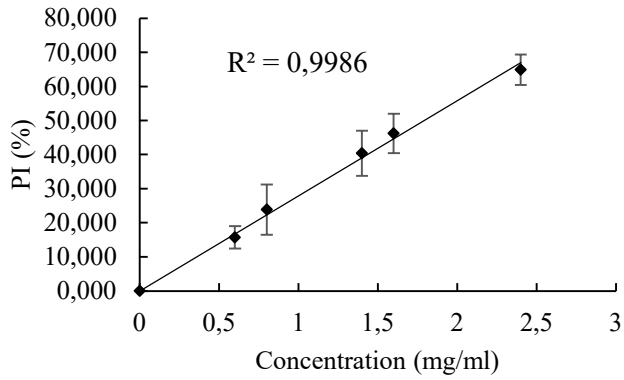
**Annexe 04** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de  $\alpha$ -amylase  $PI\% = f(C)$  des deux médicaments Gluconova (Acarbose) et Donepezil.



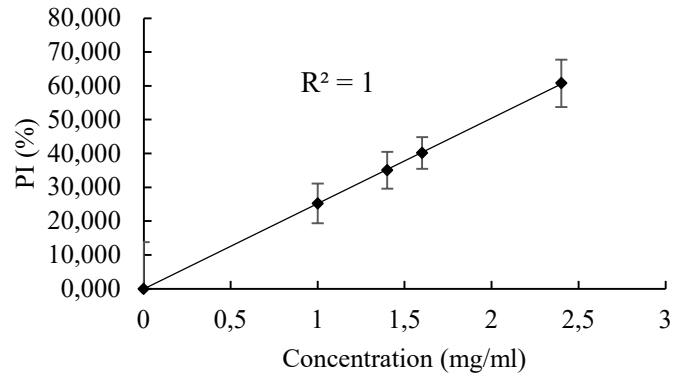
**Annexe 05** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de  $\alpha$ -amylase PI%=f(C) des extraits méthanoliques des galls 2010 .



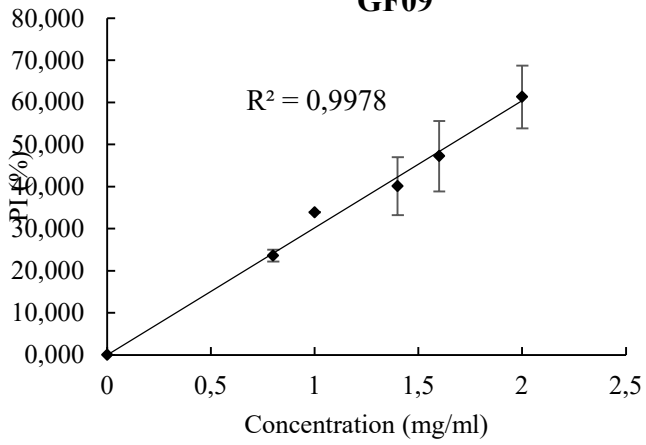
**GF08**



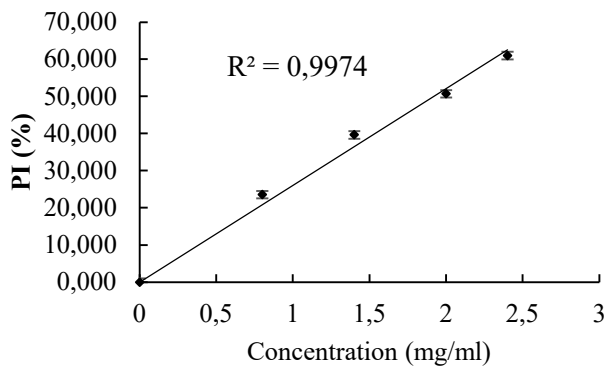
**GF11**



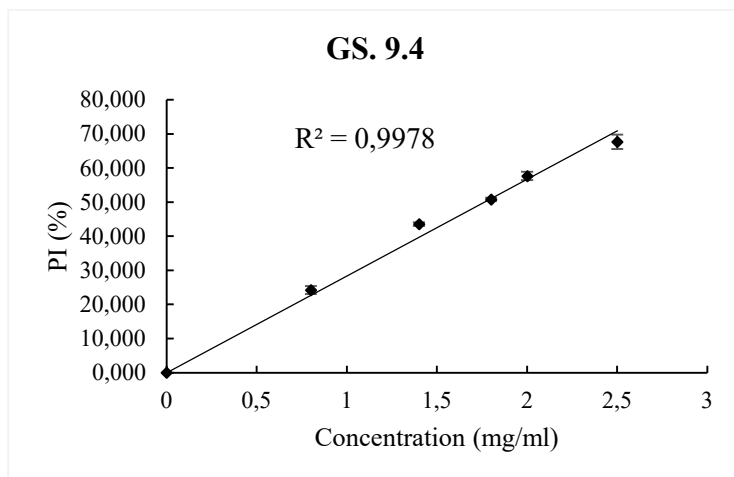
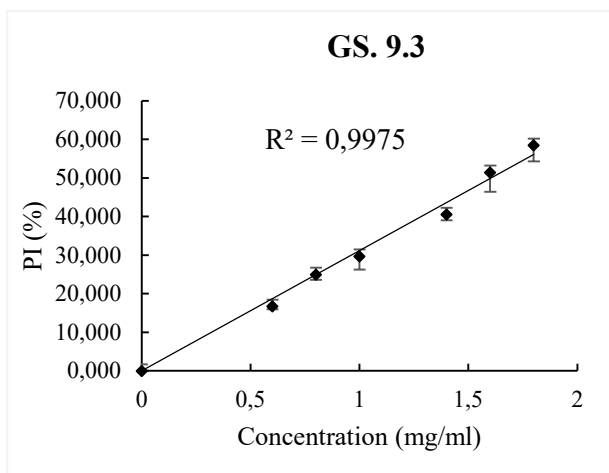
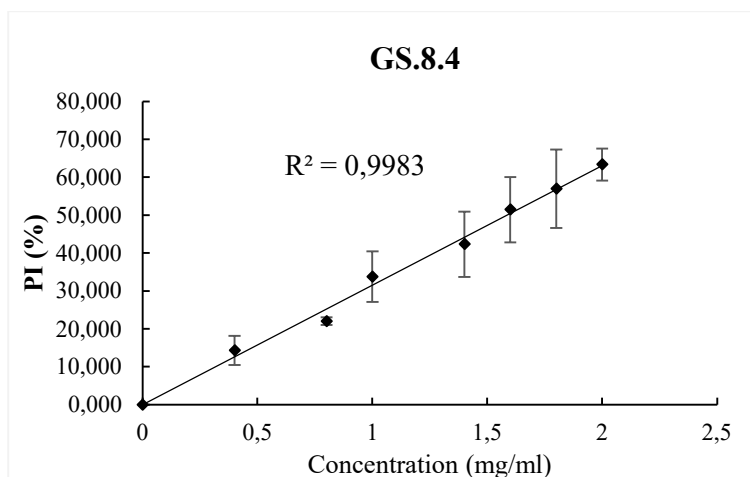
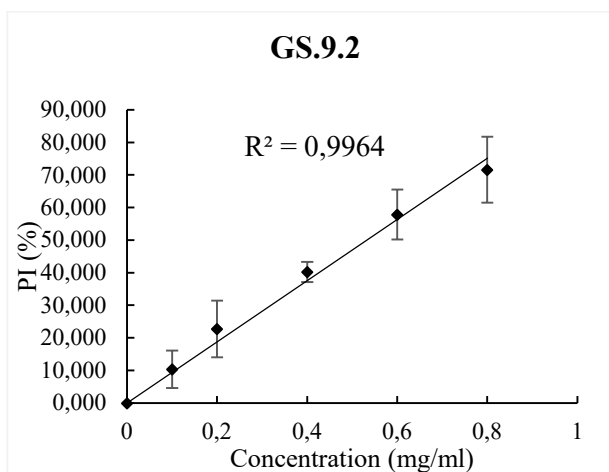
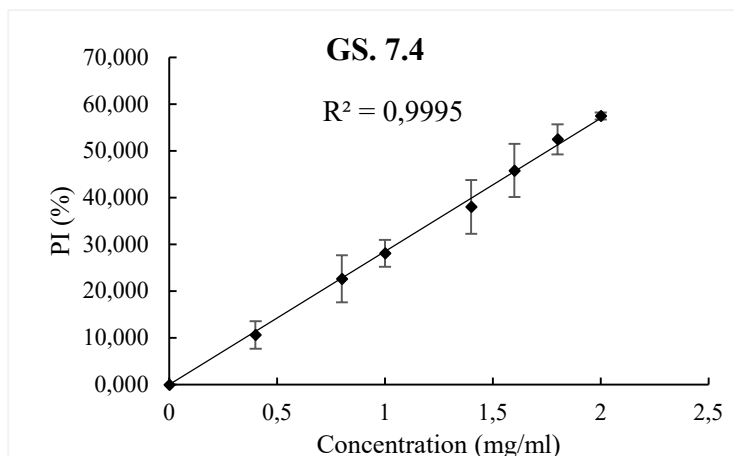
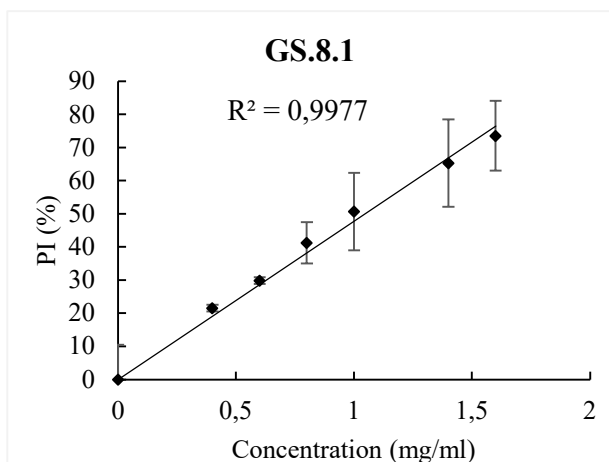
**GF09**

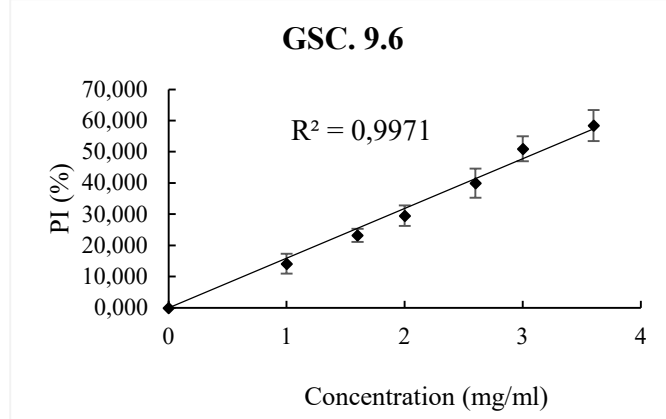
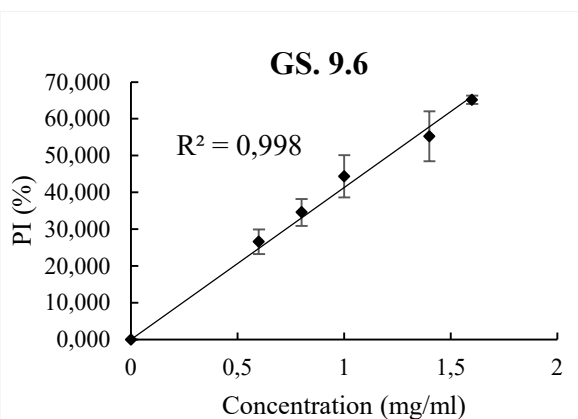
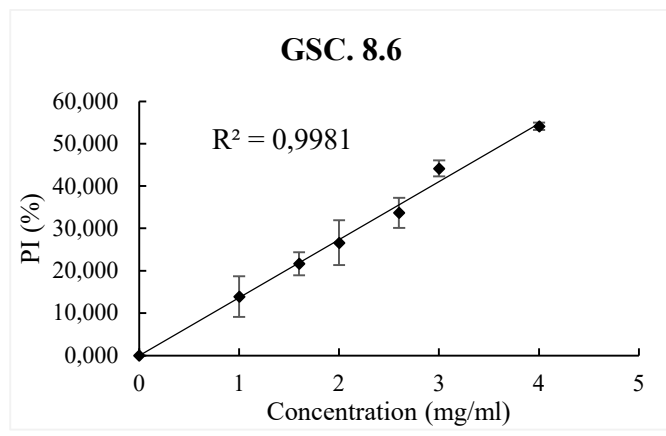
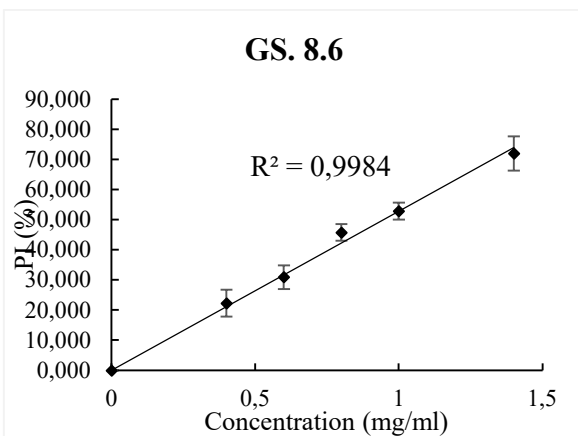
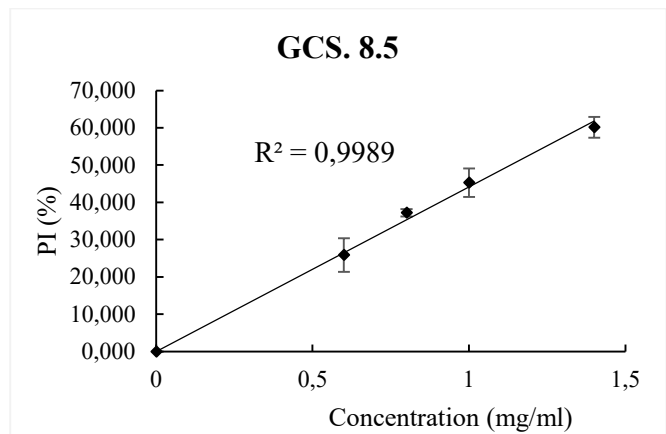
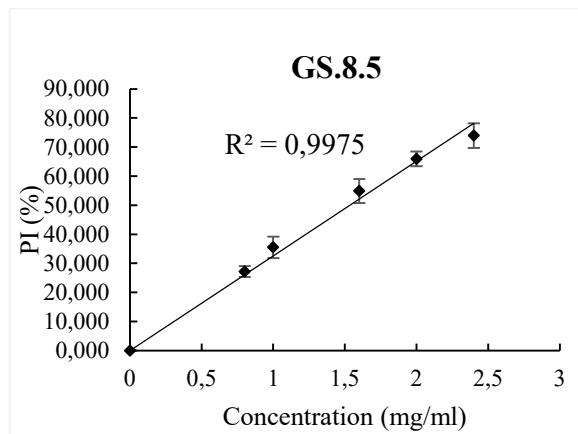
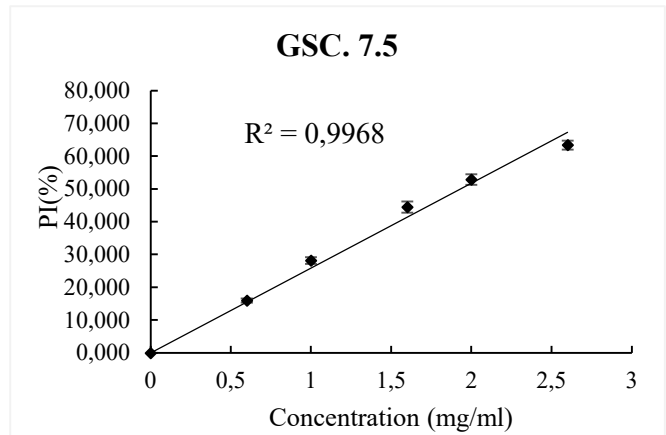
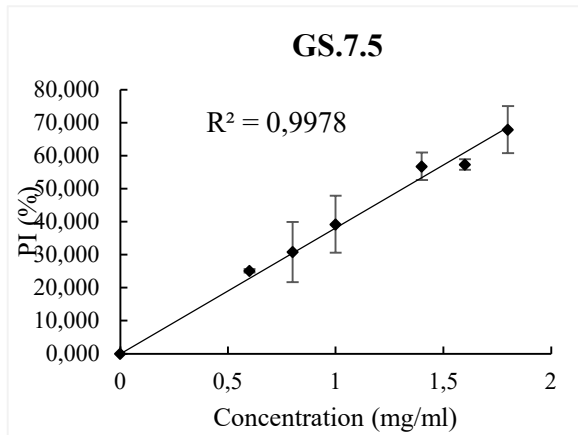


**GF10**

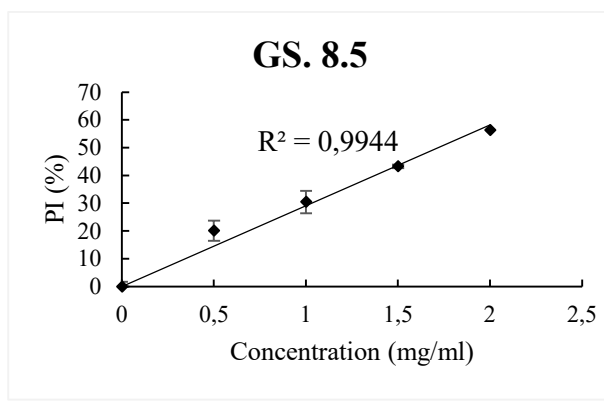
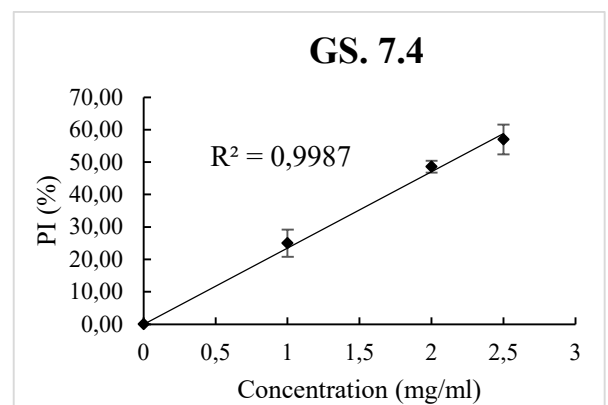
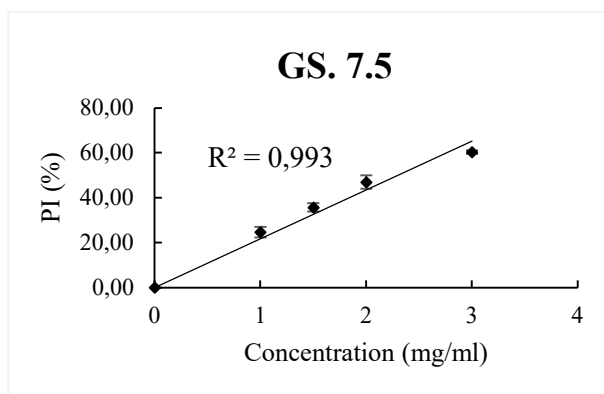
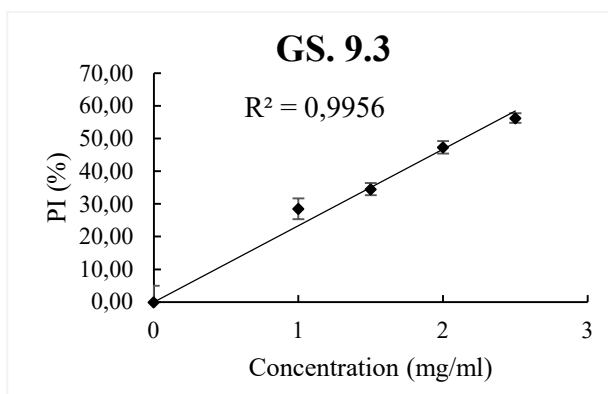
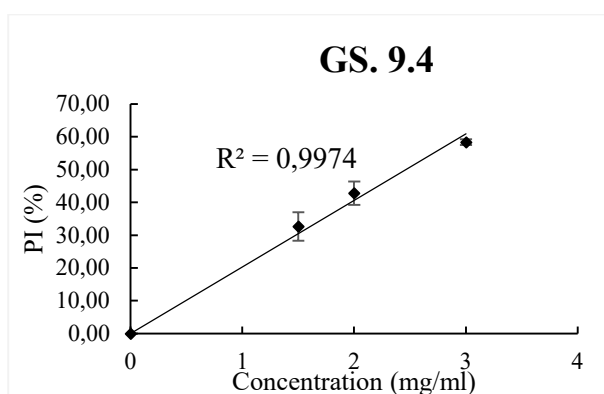
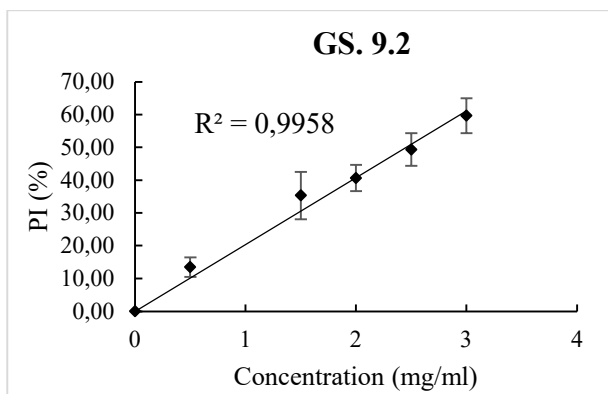
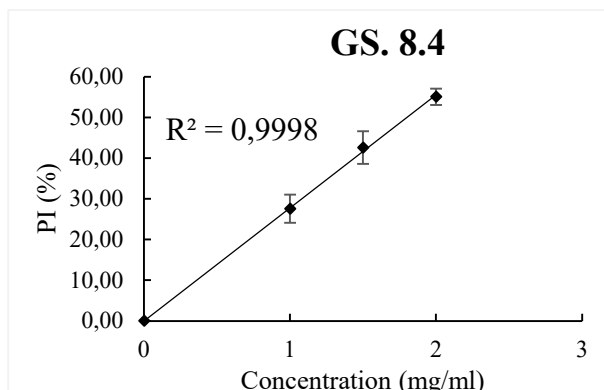
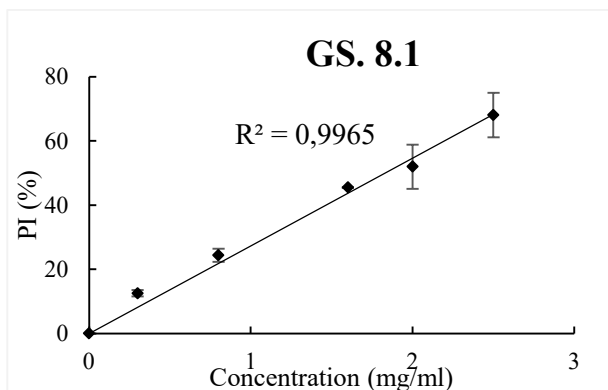


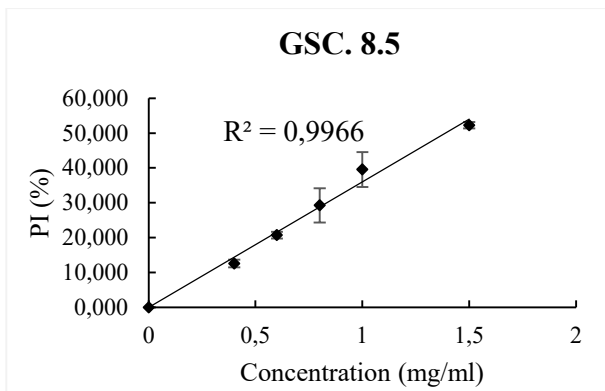
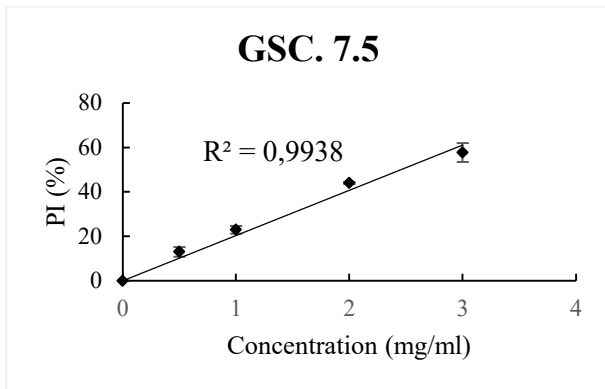
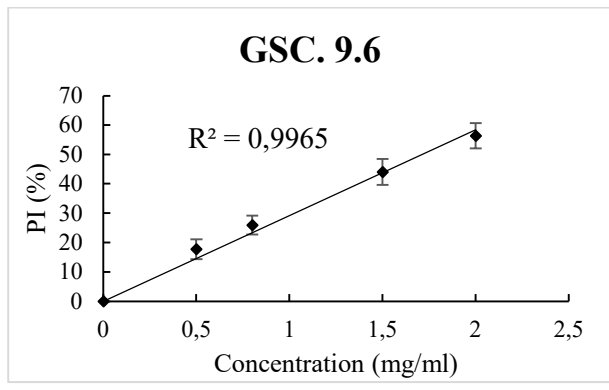
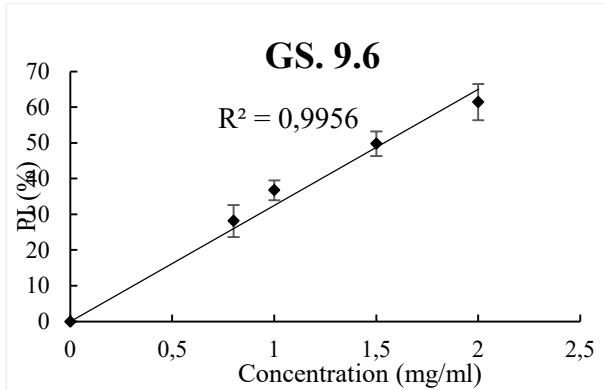
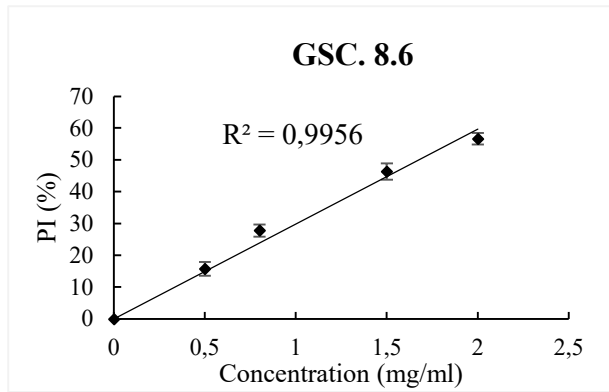
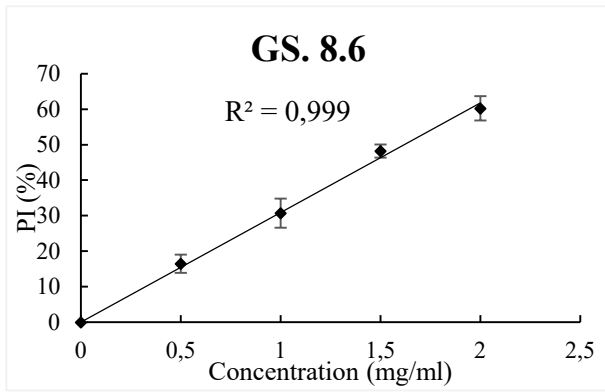
**Annexe 06** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de  $\alpha$ -amylase  $PI\% = f(C)$  des extraits méthanoliques des galles 2016.



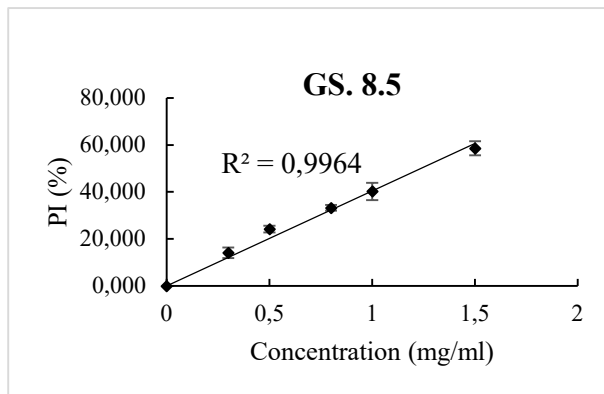
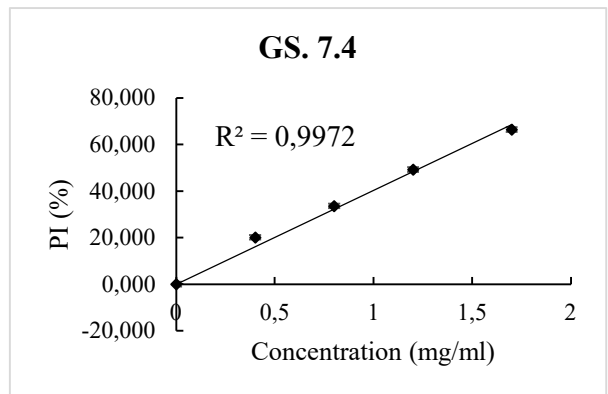
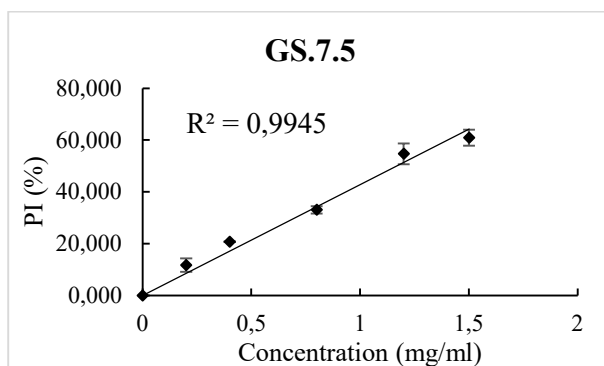
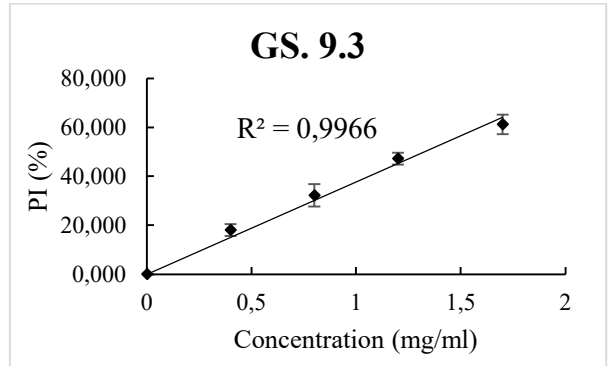
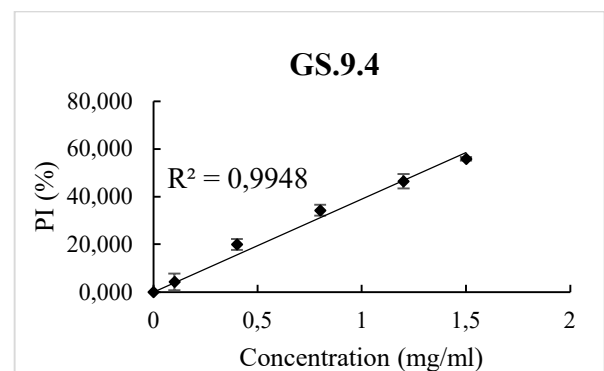
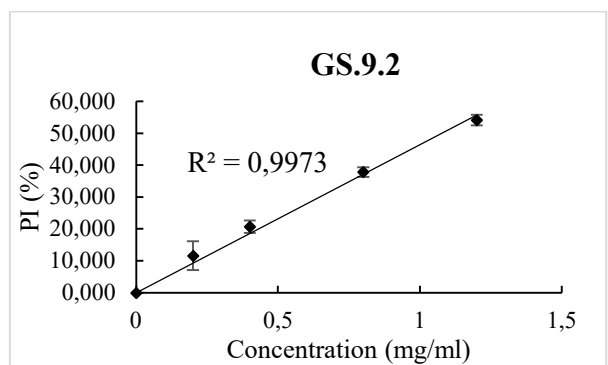
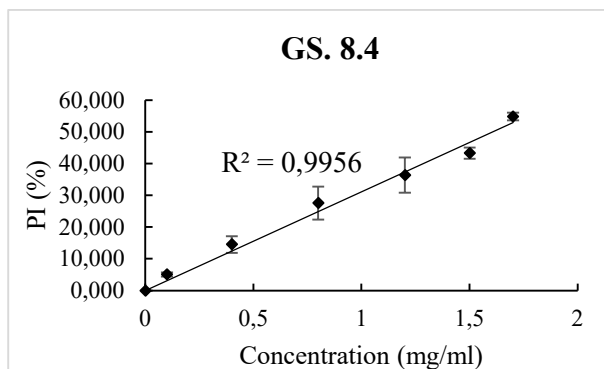
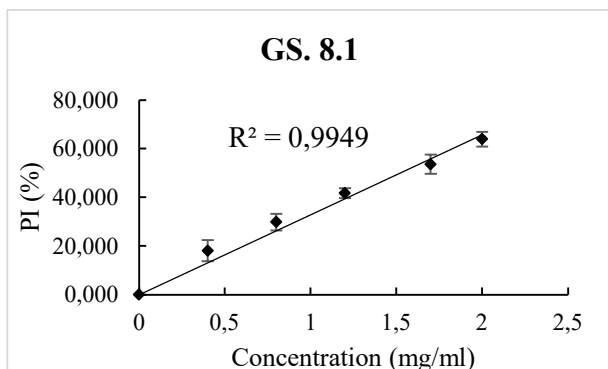


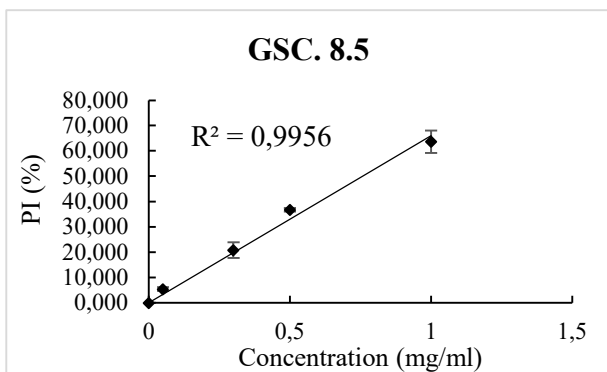
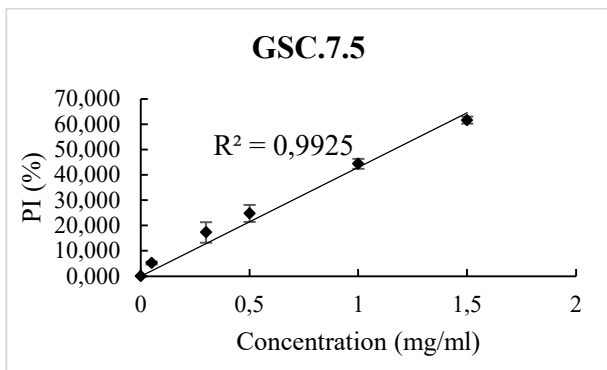
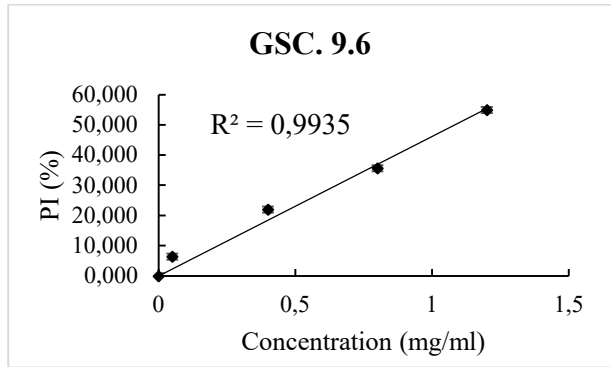
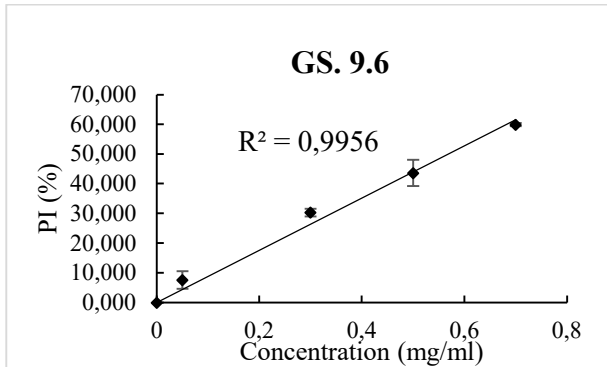
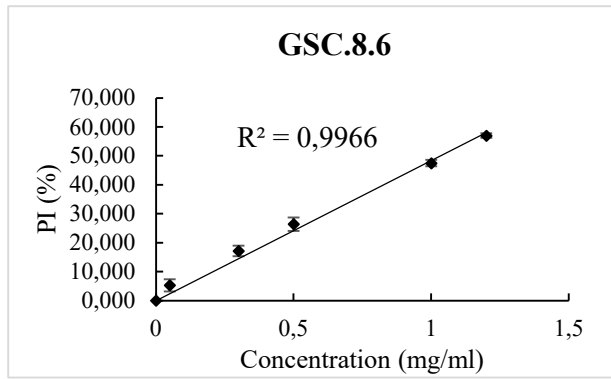
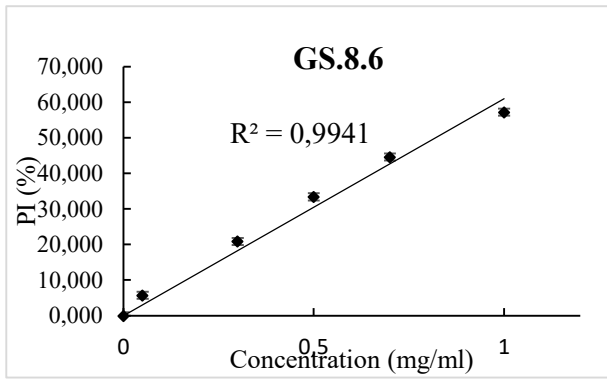
**Annexe 07** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de  $\alpha$ -amylase PI%= f (C) des huiles brutes des galls 2016.



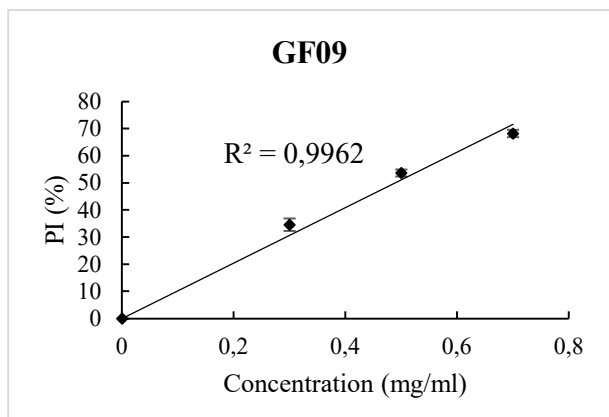
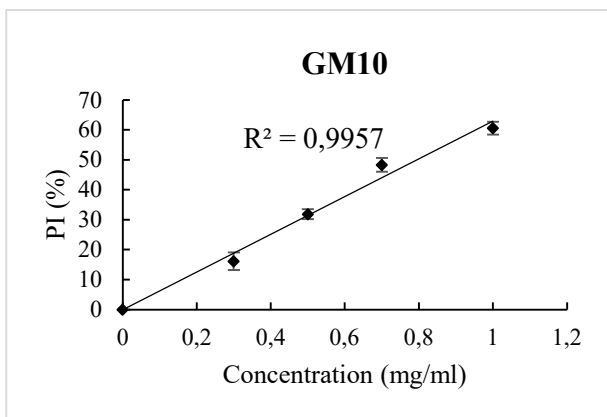
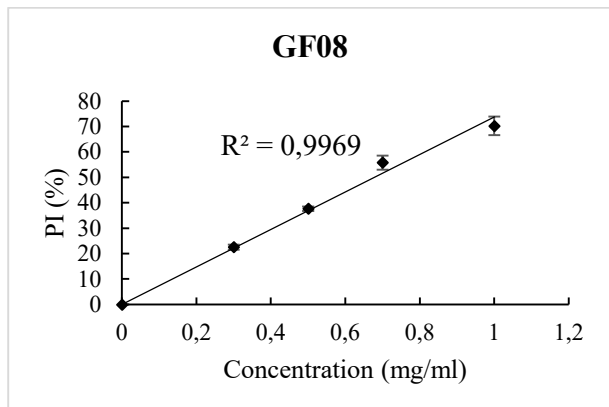
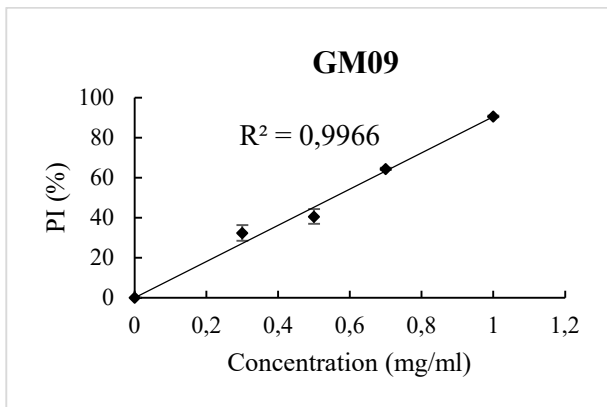
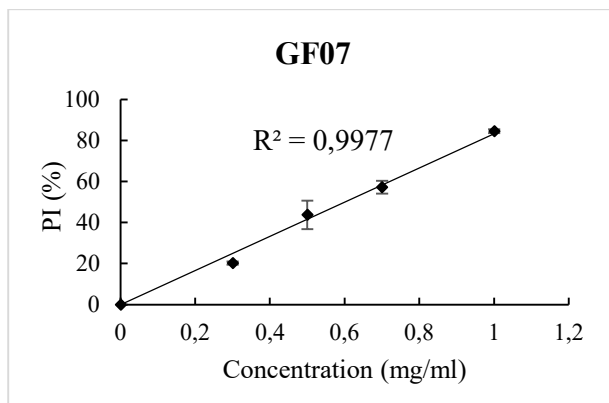
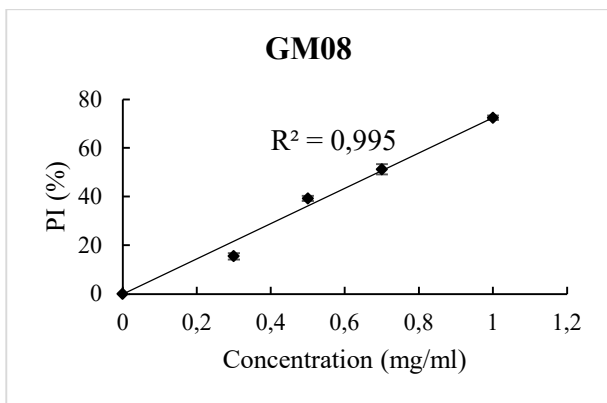
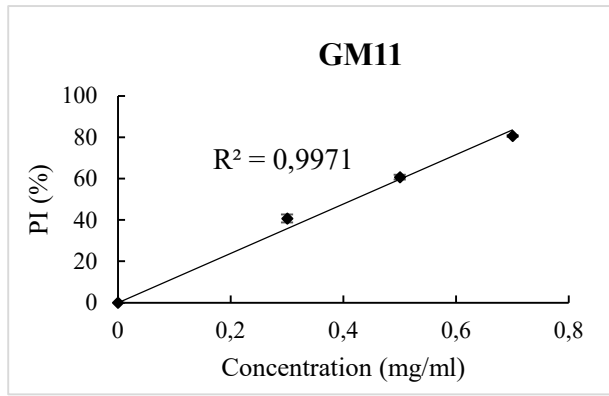
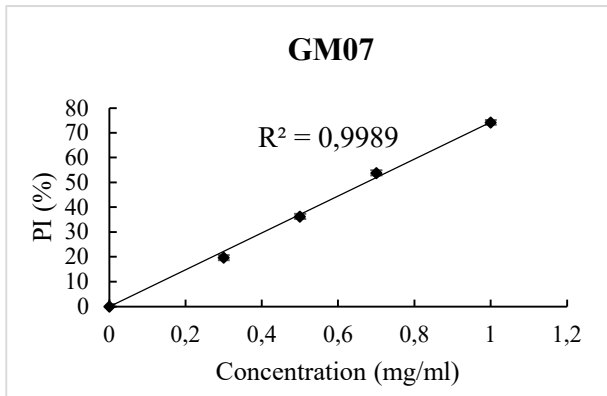


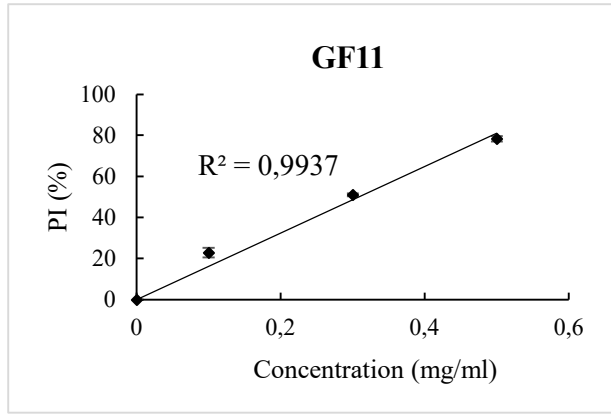
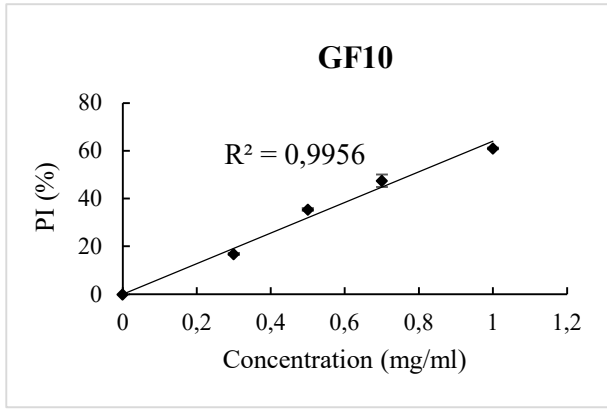
**Annexe 08** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de  $\alpha$ -amylase PI%= f (C) des fractions insaponifiables des galls 2016.



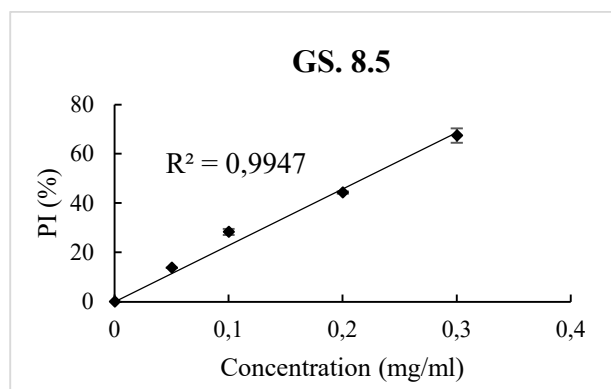
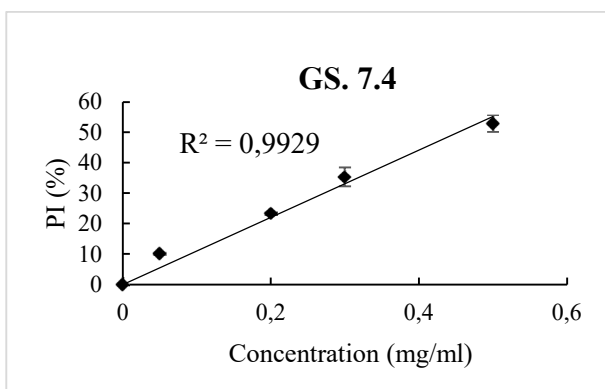
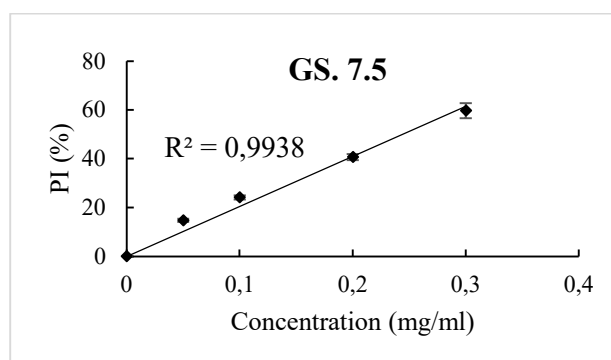
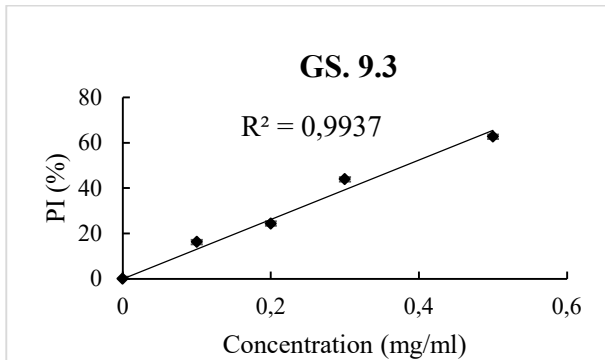
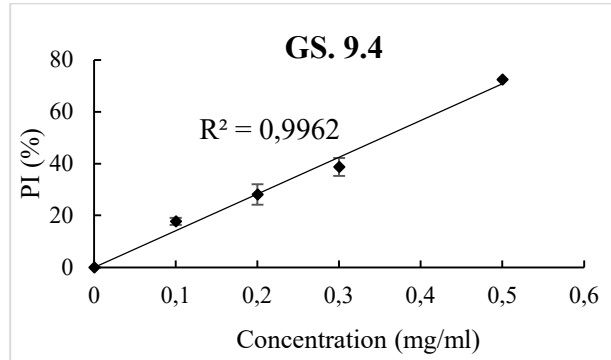
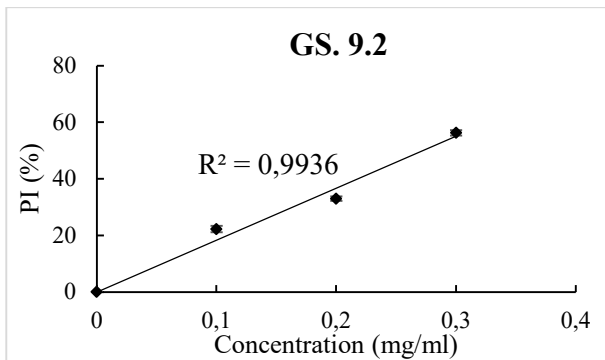
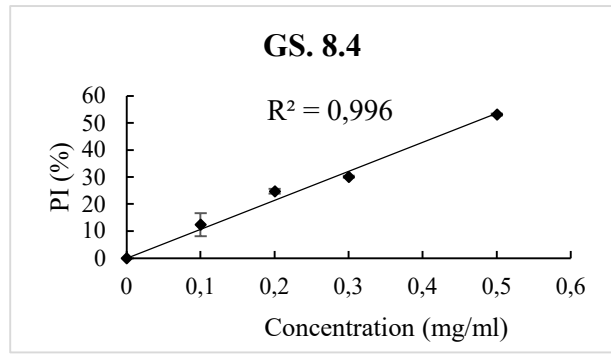
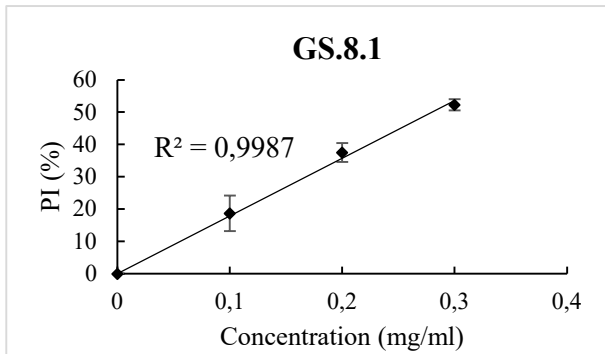


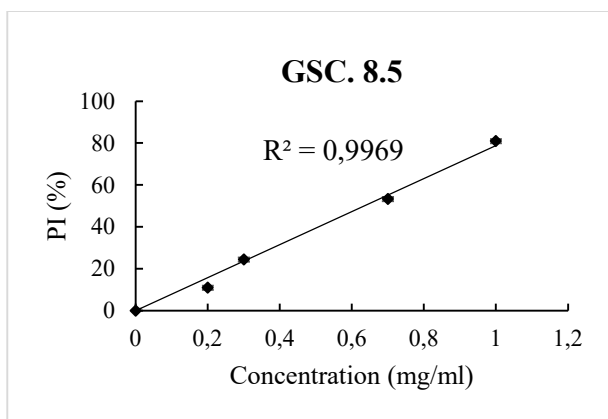
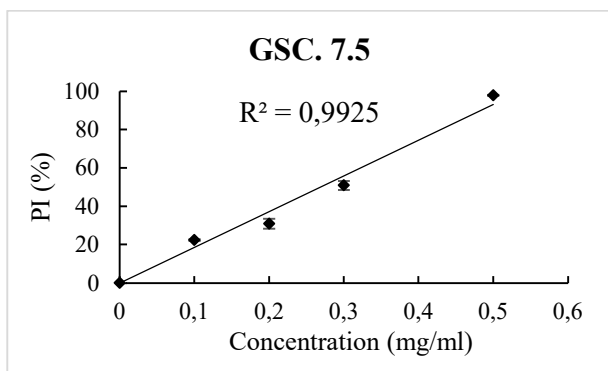
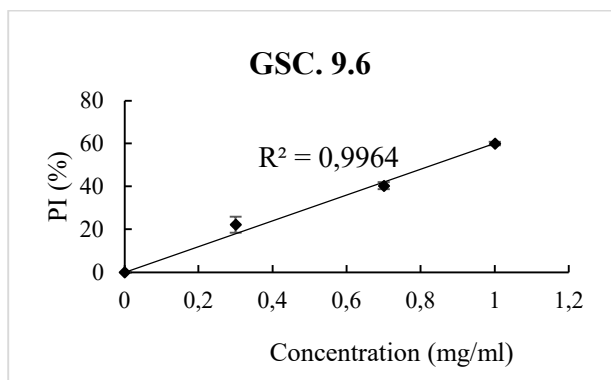
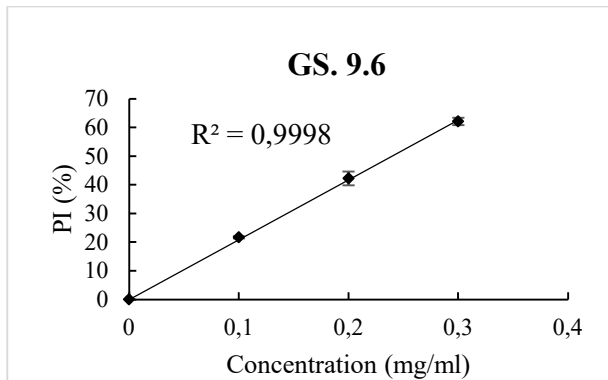
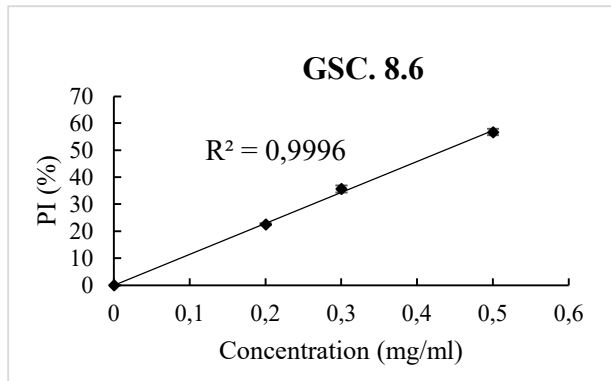
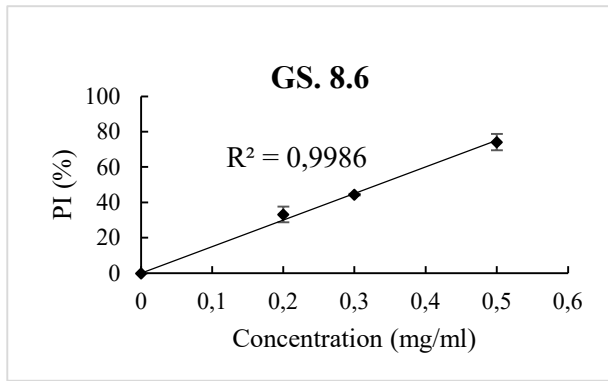
**Annexe 09** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de l'acétylcholin - esterase  $PI\% = f(C)$  des extraits méthanoliques des galls 2010.



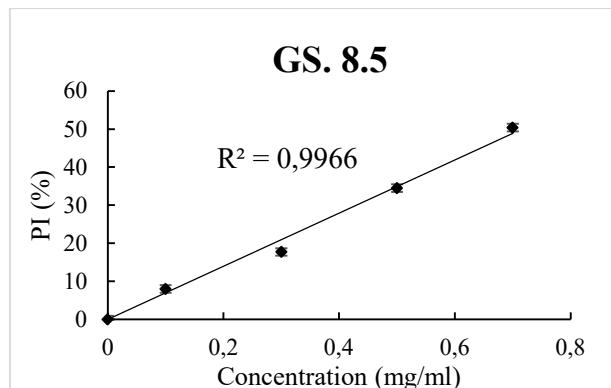
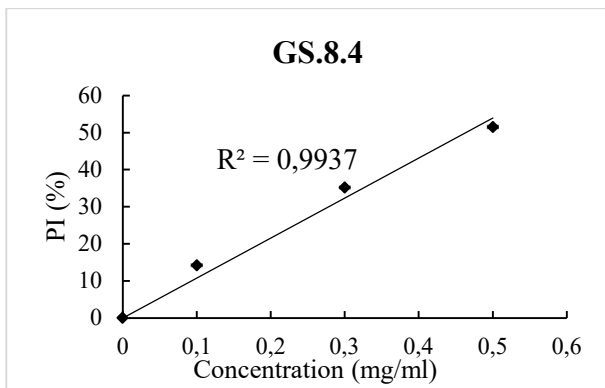
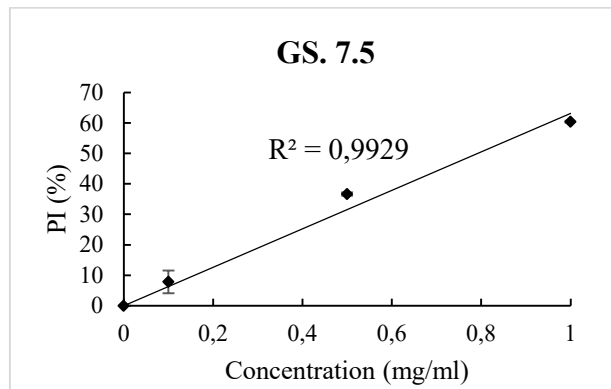
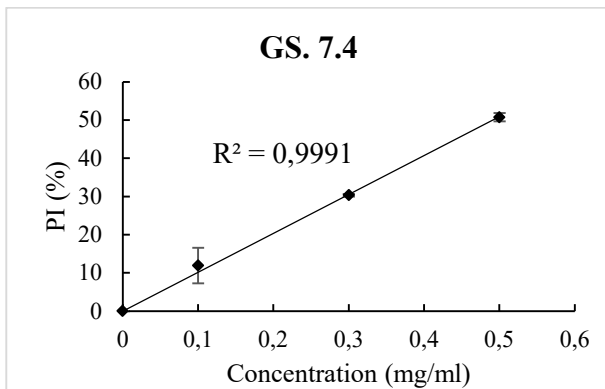
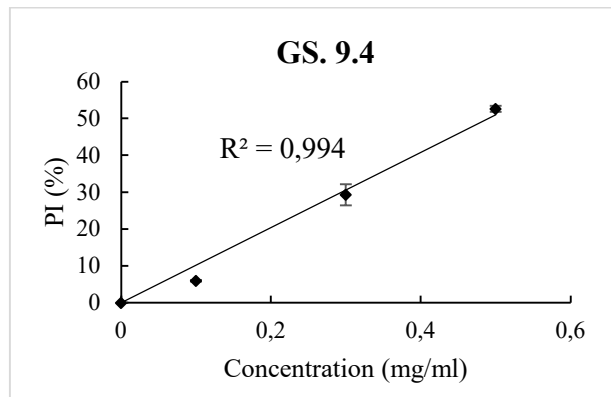
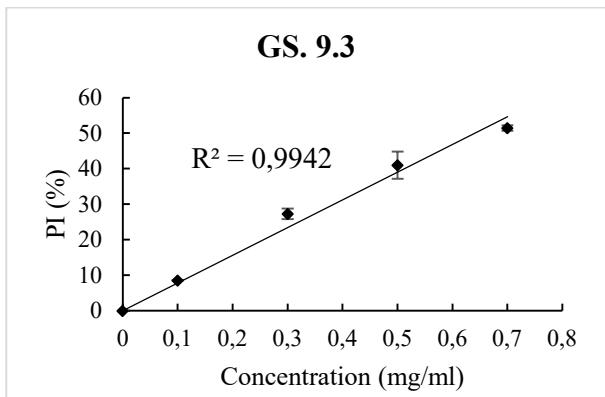
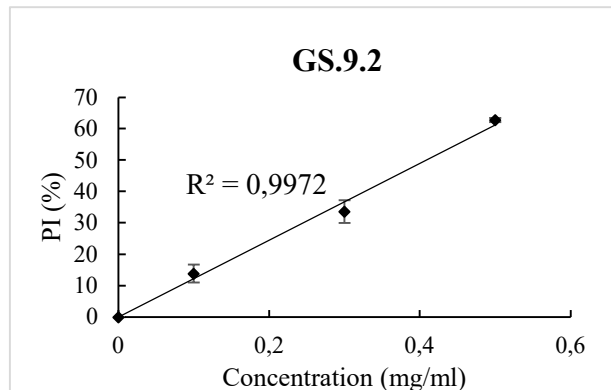
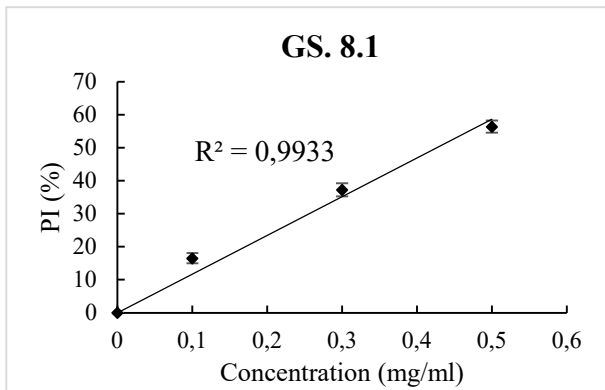


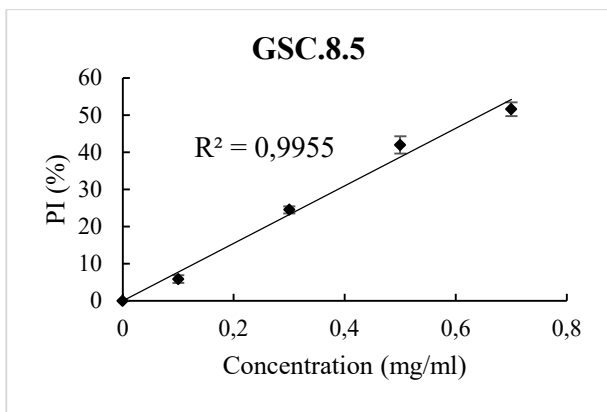
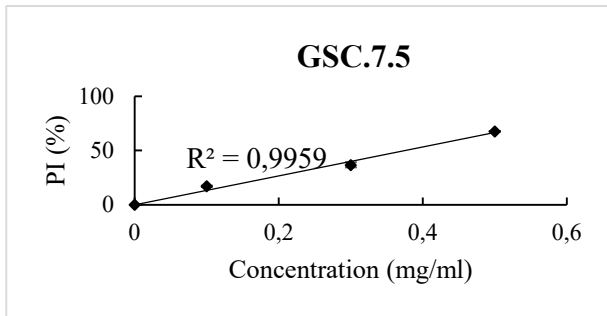
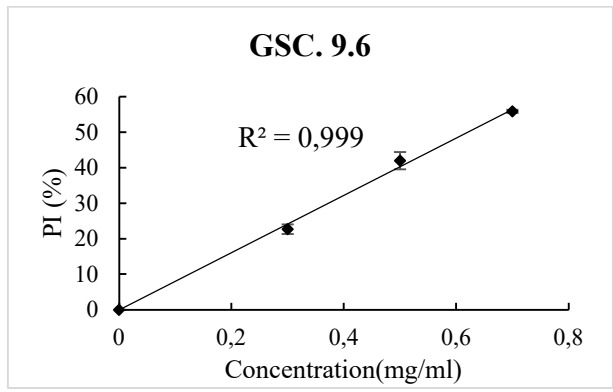
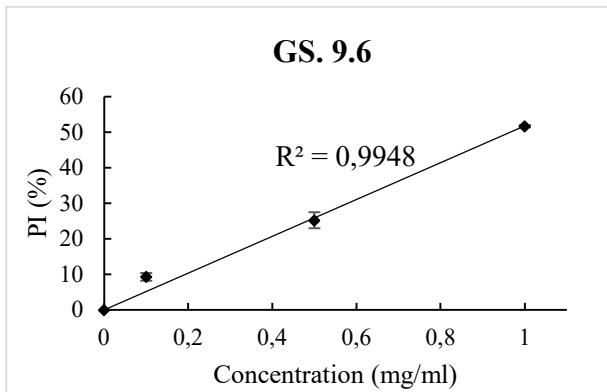
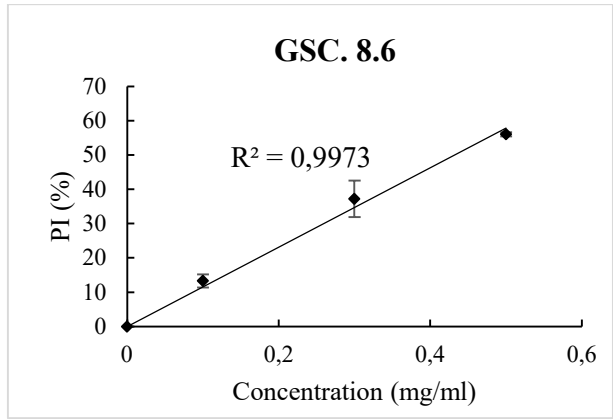
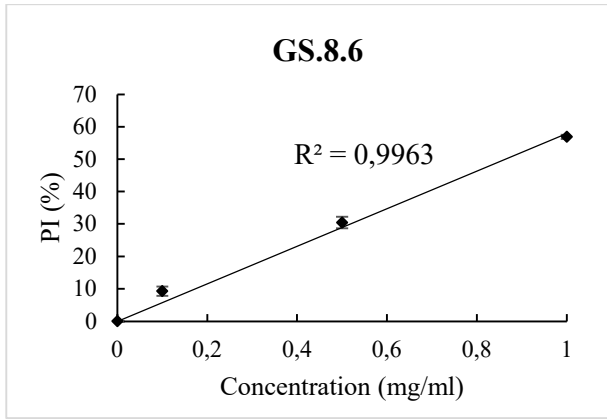
**Annexe 10** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de l'acétylcholin - esterase  $PI\% = f(C)$  des extraits méthanoliques des galls 2016.



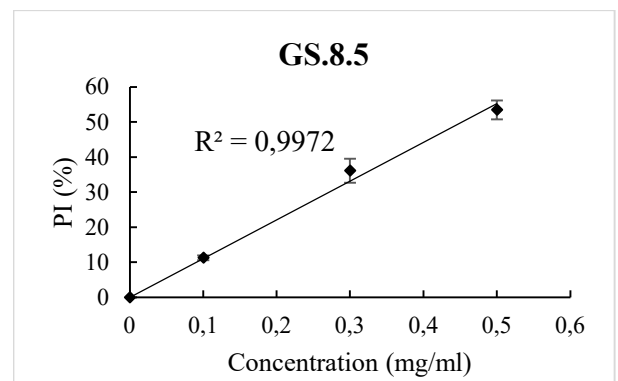
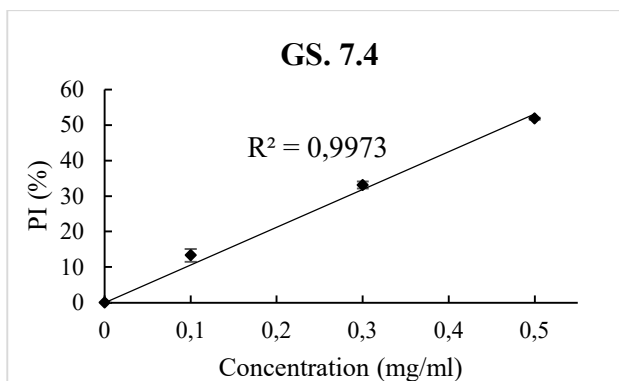
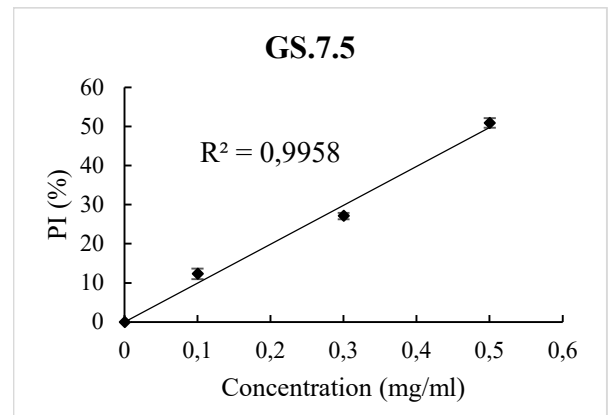
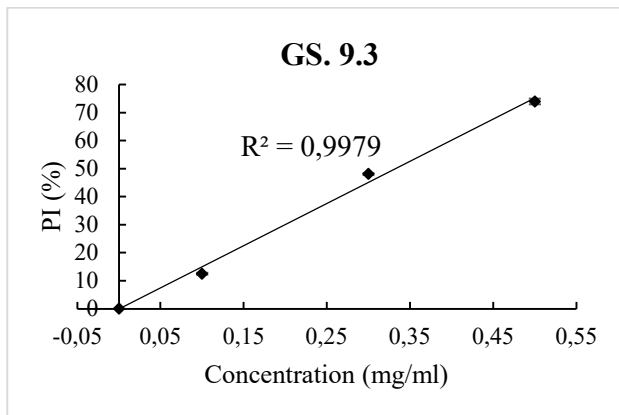
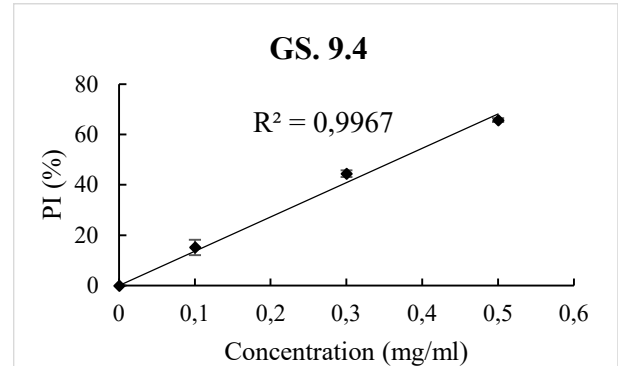
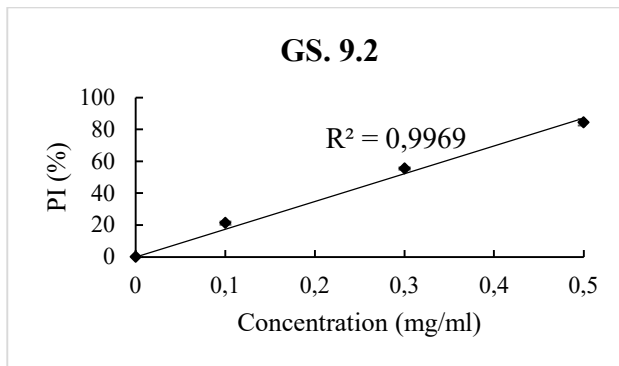
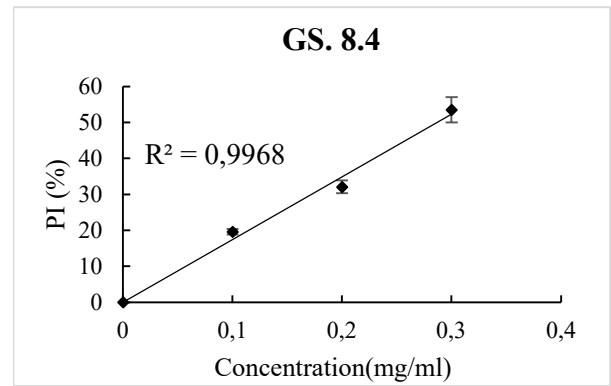
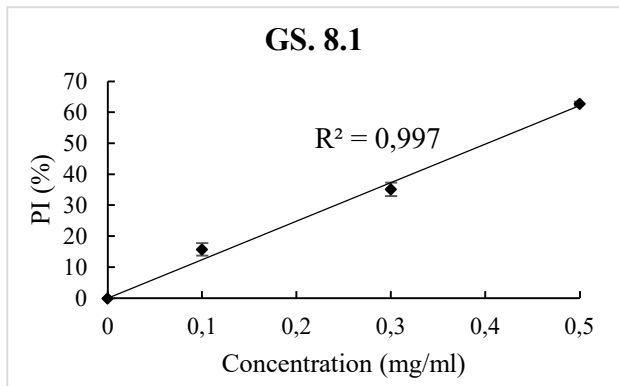


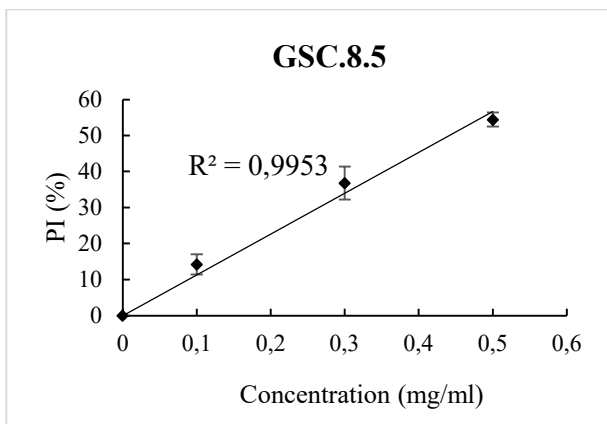
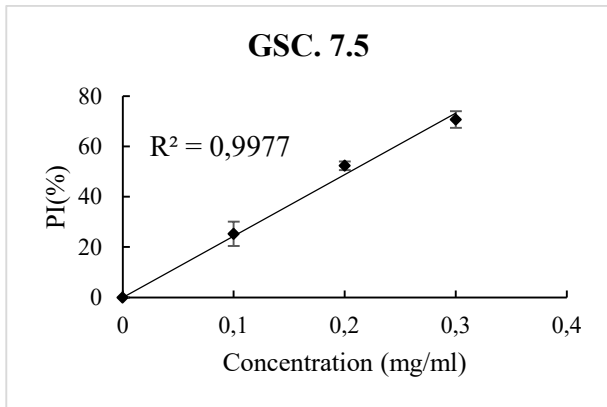
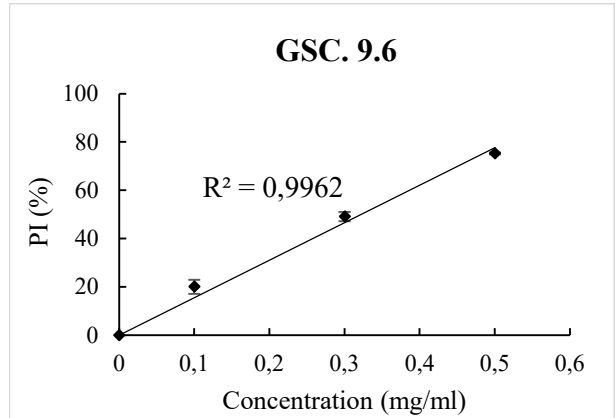
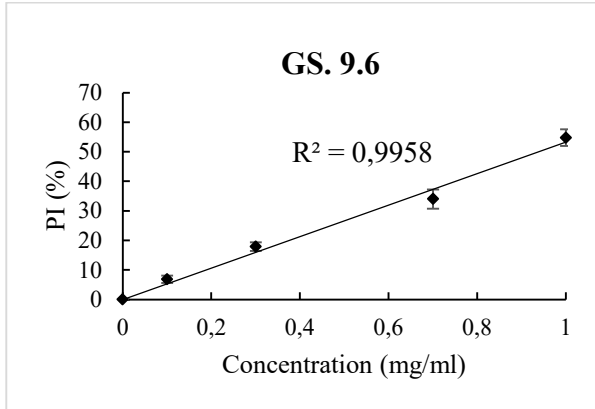
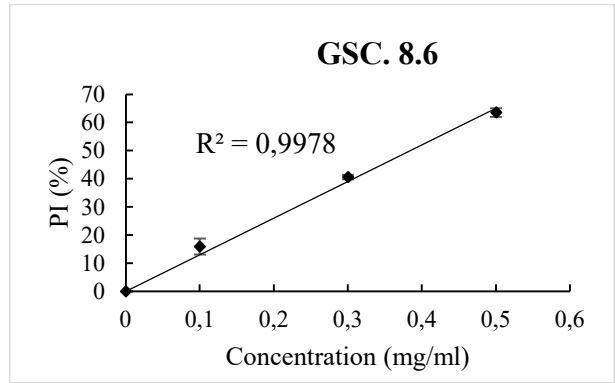
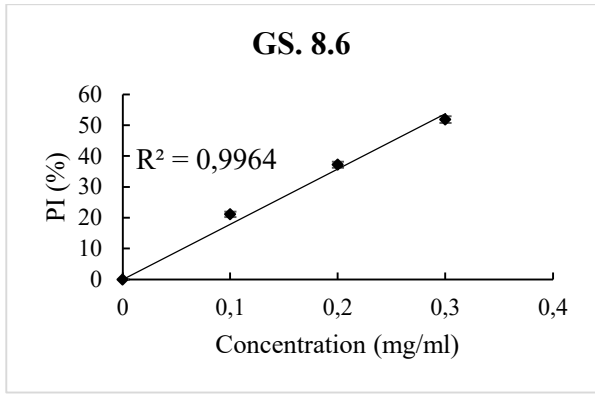
**Annexe 11** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de l'acétylcholin - esterase  $PI\% = f(C)$  des huiles brutes des galles 2016.





**Annexe 12** : Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de l'acétylcholin - esterase  $PI\% = f(C)$  des fractions insaponifiables des galles 2016.





# ***Publication***

---

# In vitro antioxidant and $\alpha$ -amylase inhibitory potential of methanolic and lipid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. galls

Fatiha Hefied  | Ziyad Ben Ahmed | Mohamed Yousfi 

Laboratory of Fundamental Sciences,  
University Amar Telidji, Laghouat, Algeria

## Correspondence

Fatiha Hefied, Laboratory of Fundamental  
Sciences, University Amar Telidji, PB 37 G,  
03000 Laghouat, Algeria.  
Email: f.hefied@lagh-univ.dz

## Funding information

Direction Générale de la Recherche  
Scientifique et du Développement  
Technologique

## Abstract

The aim of this study is to evaluate the effects of harvest period, growing region, and shapes of *P. atlantica* galls on the chemical composition, as well as on the antioxidant activities and ability to inhibit the carbohydrate hydrolyzing enzymes. Thus, the fatty acid composition; the determination of total sterols and tocopherols; the quantitative analysis of phenolic compounds; the antioxidant activities (DPPH<sup>•</sup>, FRAP, and ABTS<sup>•+</sup>) and the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity were carried out. Two shapes (spherical and semi-circular) of galls collected at different harvest periods were used in this work. The result revealed that all the methanolic, lipid extracts, and unsaponifiable fractions showed antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities. Notably, the methanolic extracts from spherical galls has a higher antioxidant activity than those from semi-circular galls. Whereas, in lipid extracts, the observation is reversed. A higher  $\alpha$ -amylase inhibitory activity for semi-circular galls was recorded in August and in September for spherical galls.

## Practical applications

Galls are used in traditional medicine. Results from the present study suggest that galls are a good source of natural antioxidants and potential alternatives to control postprandial hyperglycemia. They can be useful for developing nutraceuticals, functional foods, and additives in food processing for health. This is the first report of  $\alpha$ -amylase inhibitory activity for methanolic and lipid extracts from *P. atlantica* galls.

## 1 | INTRODUCTION

The genus *Pistacia* of the family *Anacardiaceae* comprises at least 11 species (Peksel et al., 2010). It is widespread in the Mediterranean region. *Pistacia atlantica* Desf. is an evergreen tree, reaching 15 m in height and growing in arid and semi-arid areas (Benabid, 2000; Gourine et al., 2010). This species is very present in Algeria, particularly in the south (Guenane, 2017). *P. atlantica* has long been used in traditional medicine by populations in North Africa. Moreover, these virtues can be attributed to the content of these phytochemical antioxidants (Peksel et al., 2010). In addition, different parts of the species *Pistacia atlantica* have been shown to have large pharmacological activities such as antioxidant and antihyperglycemic activities (Ben Ahmed et al., 2017). A gall is a structured deformation of a plant caused by a parasite.

This deformation is almost always accompanied by a hypertrophy of plant tissues. However, there are cases where there is only a characteristic deformity (Dauphin, 2012). Gall makers are usually specialist parasites that manipulate the plants for their own benefit. Their protection mechanisms against external attack can be attributed to the physical and chemical properties of galls (Rand et al., 2014). These may contain higher concentrations of defense-specific metabolites than the non-galled tissues of their host plants. Over the years and in different populations, galls have been used in several fields mainly in traditional medicine. In India, galls are used as a remedy in the treatment of coughs, phthisis, asthma, diarrhea, dysentery, fever, vomiting, loss of appetite, nose bleeding, snake bites, scorpion stings or as a tonic, and expectorant (Rajopadhye et al., 2016). They are also used in combination with other herbs as a drinking remedy by women after childbirth

to restore the elasticity of the uterine wall in Malaysia. Some galls have pharmacological properties such as astringent, antidiabetic, local anesthetic, antiviral, antibacterial, antifungal, larvicidal, and anti-inflammatory effects (Basri & Fan, 2005). In China, they are used against dysentery, paralysis, and for the teeth lacquering. However, they are also used in dyeing because of their richness in tannin, for the tanning of skins (Chevalier, 1923). In Algeria, there are different uses depending on the regions among them, the preparation of powdered galls, alone or in combination as anti-diarrheal.

*Pistacia atlantica* has been the subject of several studies not only on the analysis of the chemical composition of various parts of the plant but also on antioxidant, antimicrobial, antifungal, and antihyperglycemic activities. Among these studies: the work carried out by (Guenane, 2017) on biological activities of fruit oil from *Pistacia atlantica*; (Gourine et al., 2009) studied the chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves; also, the study on seasonal, gender, and regional variations in total phenolic, flavonoid, condensed tannins contents, and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves achieved by (Ben Ahmed et al., 2017); In-depth research on the phytochemical composition of *Pistacia atlantica* galls and the study of possible biological activities have recently begun. The study focused more on the analysis of essential oils and certain biological activities, among the research: The study conducted by (Sifi et al., 2015) on the evaluation of the antimycobacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of essential oil of galls.

Phenolic compounds are natural substances widely distributed in the plant kingdom, present in the vacuoles of tissues. Their structure varies from simple molecules, such as phenolic acids, to highly polymerized compounds, such as condensed tannins (Guenane, 2017). They are topical because of multiple biological and pharmacological properties (antioxidants, anti-inflammatories, antimicrobials, anti-allergens, anti-carcinogens, etc.) (Generalić et al., 2012). Indeed, they are known to be powerful antioxidants (Ben Ahmed et al., 2017). Other studies on polyphenols have shown interesting results on their ability to inhibit enzymes responsible for the breakdown of sugars such as ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) (Hashemnia et al., 2015; Masunda et al., 2014).

Some other lipids, such as phytosterols, have attracted the interest of food researchers because of their peculiar functional properties (Piironen et al., 2000). Phytosterols account for the major proportion of the oil unsaponifiable fraction and are one of the main components of membrane lipids. Phytosterols play major role in several areas, namely in pharmaceuticals (production of therapeutic steroids), nutrition (anti-cholesterol, additives in functional foods, and anticancer properties), and cosmetics (creams and lipstick) (Fernandes & Cabral, 2007). Another group of the oil minor fraction is represented by tocopherols, which are very interesting molecules due to their antioxidant properties (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Diabetes mellitus is a multifactorial disease. It is a group of metabolic alterations characterized by hyperglycemia resulting from

abnormalities in insulin secretion, action, or both. There are two types of diabetes, type I is insulin-dependent and affects only 5% of the diabetic population while type II is non-insulin-dependent and usually develops in adults over 40 years old (Mamun-or-Rashid et al., 2014).

There is ample evidence to indicate that diabetes mellitus is accompanied by oxidative stress (Delattre et al., 2001). This latter is the consequence of abnormally high glucose concentrations in the extracellular and intracellular media because it is suspected to be the origin of a reduction of the insulin secretion and a decrease of the hypoglycemic hormone action, aggravating the insulin-resistance state of type II diabetes (Delattre et al., 2001). Modern drugs available for the treatment of diabetes such as insulin, various oral hypoglycemic agents (e.g.: sulfonylureas and metformin), glucosidase inhibitors, and troglitazone (Mamun-or-Rashid et al., 2014), as well as synthetic antioxidants lead to serious adverse effects, which constitute a health problem. Although galls have been discovered for some time and used as a remedy in several regions. The research into its phytochemical composition and the study of possible biological activities have recently started. Also, there is little knowledge for choosing the optimal harvest time associated with high potency in antioxidant capacity and high ability to inhibit carbohydrate hydrolyzing enzymes. Therefore, the study aimed to evaluate the fluctuations in phenolic and lipid compounds present in different samples of galls of *Pistacia atlantica*, to explore their antioxidant activities and antidiabetic potential using various in vitro assay. Thus, the composition of fatty acids from 14 samples was analyzed by GC. The relationship between chemical composition and the activities studied was examined by Pearson correlation analysis and principal components analysis (PCA). These results give an idea of its potential, its future use, and provide a scientific basis for an optimal usage. To our knowledge, there are no studies related to inhibit  $\alpha$ -amylase by phenolic extracts, crude oils, and unsaponifiable fractions of *Pistacia atlantica* galls.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals

Methanol, absolute ethanol, n-hexane, dichloromethane, diethyl ether, sulfuric acid, acetic acid, ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), Folin-Ciocalteu reagent, aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), vanillin, gallic acid, quercetin, catechin, DPPH $^{\bullet}$  (1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl),  $\alpha$ -amylase (Aspergillus), starch, and DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Orthophenanthroline and acetic anhydride were purchased from Merck (Merck S.A.R.L. Algiers, Algeria) and cholesterol was purchased from UCB Pharma (SARL E-SAHTI, Algiers, Algeria). Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), vitamin C (ascorbic acid), Trolox, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), ABTS $^{+\bullet}$  (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). The drug GLUCONOVA was purchased from NOVAPHARM (Algeria).

## 2.2 | Plant material

*Pistacia atlantica* galls were harvested in July, August, and September 2016 in six different sites from the region of Laghouat (Algeria). The 14 samples were spread on paper, shade dried at room temperature for 1 week. The dried galls were dry cleaned to remove insects and eggs, crushed, sieved, and stored in paper bags until use. The samples were divided into two groups according to the shape (spherical and semi-circular) (Figure 1). A code was assigned for each sample indicating, respectively, the shape of the gall, the month of harvest, and the site. Thus, for example, the SG.8.1 code indicates spherical gall, collected in August from site 1. The characteristics of the samples are presented in Table 1.

## 2.3 | Lipid extraction

In order to extract and determine the lipid content of our samples, we chose a method that is based on solid-liquid extraction by the Soxhlet apparatus (Bentireche et al., 2019). Using hexane as a solvent for 12 hr, the samples were dehydrated with anhydrous sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). After filtration, the hexane was evaporated under reduced pressure at 40°C. The dried crude oil was weighed to determine the lipid content and stored in brown bottles at 6°C until use. The yield of the crude oil was calculated as follows:

$$\text{Lipid extracts yield (\%)} = (M_o/M_s) \times 100.$$

$M_o$  and  $M_s$  are the mass of extracted oil from the sample (g) and mass of raw material (g), respectively.

## 2.4 | Separation of the unsaponifiable and saponifiable fraction

Two grams of crude oil was dissolved in an aqueous alcoholic solution of potassium hydroxide KOH (0.5 N) and refluxed for 1 hr 30 min. After cooling, 100 ml of distilled water was added, then 100 ml of HCl (10%), leading to the appearance of two phases; aqueous phase (unsaponifiable fractions) and organic phase (free fatty acids). Using a separating funnel, the unsaponifiable fraction was extracted three times with 100 ml of diethyl ether, whereas the saponifiable fraction was extracted three times with 100 ml of dichloromethane. The fractions were dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, taken to dryness, and the residue was weighed.

## 2.5 | Fatty acid methyl esters preparation and gas chromatography (GC) analysis

The fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared according to the following procedure (Bentireche et al., 2019): A total of 0.5 g of the free fatty acids (saponifiable fraction) were refluxed with 20 ml of 0.5% sodium methylate (NaOMe) for 30 min. After cooling, 20 ml of distilled water was added. The FAMES were extracted by dichloromethane, washed with distilled water and dried using anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After filtration and evaporation of dichloromethane, FAMES were purified by flash chromatography over silica gel as the stationary phase and dichloromethane as the mobile phase. The analyses of the FAMES were performed in a gas chromatographic GC apparatus (Chrompack CP 9002, Agilent technologies U.S.A). This model is equipped with a FID detector, a Split mode (1/100) injection, and

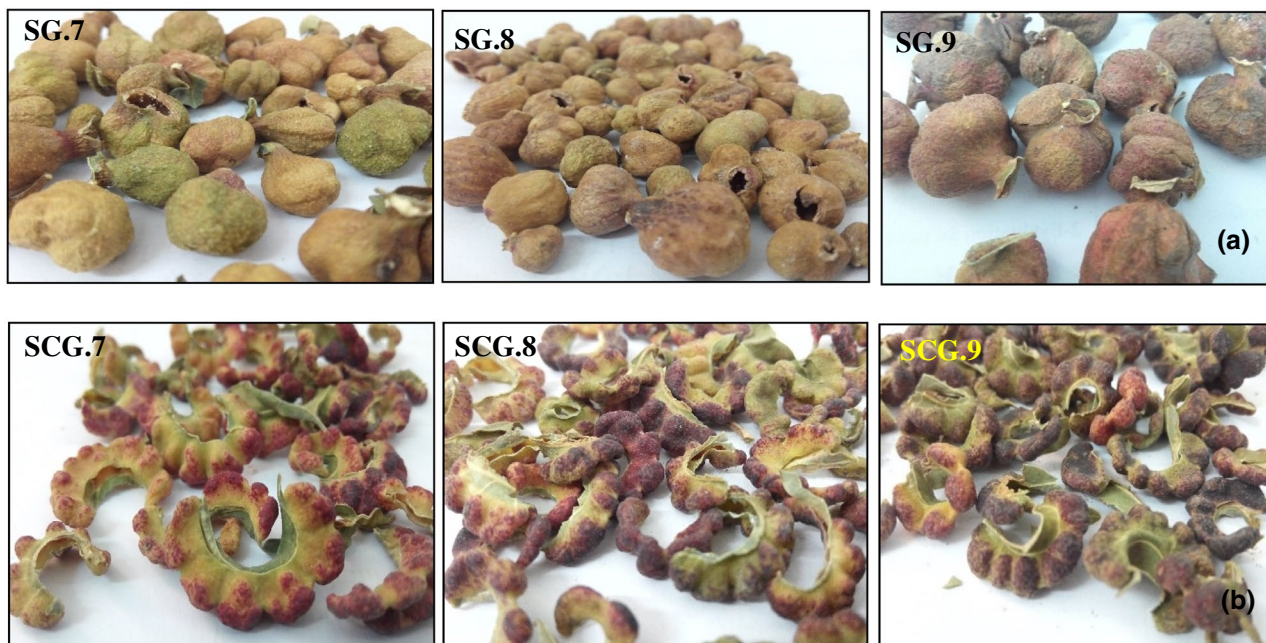


FIGURE 1 Spherical (a) and Semi-circular (b) galls of *Pistacia atlantica*

**TABLE 1** Characteristics of *P. atlantica* galls samples

Samples	Shape of galls	Month of harvest	Site of Harvest	Latitude	Longitude	Altitude
SG.8.1	Spherical	August	Site 1	33°32'1.23"N	2°34'44.71"E	802 m
SG.9.2	Spherical	September	Site 2	33°44'43.42"N	2°47'43.48"E	784 m
SG.9.3	Spherical	September	Site 3	33°38'47.37"N	2°47'10.79"E	906 m
SG.7.4	Spherical	July	Site 4	33°24'29.08"N	3°1'36.70"E	835 m
SG.8.4	Spherical	August	Site 4	-	-	-
SG.9.4	Spherical	September	Site 4	-	-	-
SG.7.5	Spherical	July	Site 5	33°55'47.26"N	2°8'37.61"E	1,163 m
SG.8.5	Spherical	August	Site 5	-	-	-
SG.8.6	Spherical	August	Site 6	34°4'3.66"N	2°3'0.18"E	1,430 m
SG.9.6	Spherical	September	Site 6	-	-	-
SCG.7.5	Semi-circular	July	Site 5	33°55'47.26"N	2°8'37.61"E	1,163 m
SCG.8.5	Semi-circular	August	Site 5	-	-	-
SCG.8.6	Semi-circular	August	Site 6	34°4'3.66"N	2°3'0.18"E	1,430 m
SCG.9.6	Semi-circular	September	Site 6	-	-	-

a Cp Sil 8 CB capillary column (30 m × 0.32 mm, internal diameter, 0.25 µm film thickness). The injector and detector temperatures were set at 250°C and 280°C, respectively. Nitrogen was used as a carrier gas. The injection volume was 0.8 µl. The identification of FAMES was carried out by comparing the retention times of peaks with those of pure standards (Supelco 37 component FAME MIX, Merck). The results were expressed as a percentage.

## 2.6 | Determination of the total tocopherols content (TTC) of lipid extract

Total tocopherols content was determined according to Emmerie-Engel colorimetric assay (Emmerie & Engel, 1938; Harrat et al., 2018). This method is based on a redox reaction between tocopherols and ferric iron ( $Fe_3^+$ ) which is reduced to ferrous iron ( $Fe_2^+$ ). A stable red-orange complex is formed between  $Fe_2^+$  and phenanthroline having a high extinction coefficient at 510 nm. To 1 ml of the lipid extract, 1 ml of phenanthroline reagent (0.4% in absolute ethanol) was added, followed by 0.5 ml of ferric chloride reagent  $FeCl_3$  (0.12% in absolute ethanol). The mixture was stirred and left to stand for 5 min. the absorbance was read at 510 nm on a spectrophotometer (UV-1601; UV-Visible spectrophotometer; Shimadzu, Kyoto, Japan). A blank was run, using 1 ml of ethanol (solvent), 1 ml of phenanthroline reagent, and 0.5 ml of ferric chloride reagent. TTC was calculated from the standard vitamin E (tocopherol) curve and expressed in micrograms tocopherol equivalent per gram of the dry weight matter (µg T/g DW).

## 2.7 | Determination of the total sterols content (TSC) of lipid extract

Total sterols content was determined by a spectrophotometric method according to the Liebermann-Burchard test (Burke

et al., 1974), based on the formation of a stable complex between 3-hydroxysteroids (having a double bond in position 5–6) and acetic anhydride in acidic medium. One milliliter of lipid extract was mixed with 2 ml of Liebermann's reagent (the reagent consists of 60 ml of acetic anhydride, 10 ml of concentrated sulfuric acid, and 30 ml of acetic acid), then the mixture was incubated for 25 min to allow the color to develop and stabilize. Absorbance was measured at 550 nm. A blank was made, using 1 ml of ethanol (solvent) and 2 ml of Liebermann's reagent. The concentration of sterols in each extract was calculated from the standard  $\beta$ -sitosterol curve and expressed in micrograms  $\beta$ -sitosterol equivalent per gram dry weight matter (µg S/g DW).

## 2.8 | Preparation of methanolic extracts

Two grams of powder of *P. atlantica* galls was macerated in 40 ml of pure methanol for 48 hr at room temperature and in the dark. The organic extract was filtered and the residue re-extracted with 30 ml of the same solvent for 24 hr, then filtered. The filtrates were combined and the methanol was removed using a rotary evaporator at 45°C. The final residue was dried, dissolved in 10 ml of pure methanol, and kept at 6°C until analysis. The total yield for each sample was obtained by the ratio between mass of final residue and mass of dry weight.

## 2.9 | Determination of total phenolic content (TPC) of methanolic extract

The TPC was determined with the Folin-Ciocalteu reagent according to the Singleton and Rossi method (Boussoussa et al., 2014). A quantity of 100 µl of methanolic extract was mixed with 500 µl of the Folin-Ciocalteu reagent (1:10). After incubation for 3 min, 2 ml

of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%) was incorporated, the solutions were vortexed, and kept in the dark at room temperature for 30 min. Absorbance was measured at 760 nm. A blank was prepared by replacing the extract by methanol (solvent). TPC was determined from the standard gallic acid curve and expressed as milligrams gallic acid equivalent per gram of the dry weight matter (mg GA/g DW).

## 2.10 | Determination of total flavonoids content (TFC) of methanolic extract

The total flavonoids content (TFC) was analyzed using the aluminium chloride colorimetric method (Vongsak et al., 2013). The yellow complex flavonoid-aluminium absorbs in the visible at 430 nm. A quantity of 500  $\mu\text{l}$  of methanolic extract was added to 500  $\mu\text{l}$  of aluminium chloride solution ( $\text{AlCl}_3$ ) (2%). The mixture was incubated at room temperature for 15 min. Absorbance was measured at 430 nm. A blank was run, using 500  $\mu\text{l}$  of methanol (solvent) and 500  $\mu\text{l}$  of aluminium chloride solution. The TFC was determined from the standard quercetin curve and expressed in mg quercetin equivalent per gram of dry weight matter (mg Q/g DW).

## 2.11 | Determination of condensed tannins content (CTC) of methanolic extract

The CTC was determined by the vanillin method described by (Broadhurst & Jones, 1978; Chupin et al., 2013) with some modifications. Vanillin (1%) was mixed with (v/v) HCl (8%). The reagent was maintained at a temperature of 30°C. A quantity of 1 ml of the vanillin reagent was added to 200  $\mu\text{l}$  of methanolic extract. The mixture was left to stand at 30°C for 15 min. Absorbance was measured at 500 nm. A blank contains all reagents except the extract. The results were estimated as mg catechin equivalent per g of dry weight (mg C/g DW).

## 2.12 | DPPH<sup>•</sup> assay of methanolic and lipid extracts

The DPPH<sup>•</sup> test was performed following the method described by (Du et al., 2014) with minor modifications. This method is based on the reduction of DPPH (purple color) in the presence of antioxidant compounds, giving a yellow color. The absorbance measures the remaining DPPH<sup>•</sup> at 517 nm. A quantity of 1 ml of methanolic solution of DPPH<sup>•</sup> (250  $\mu\text{M}$ ) was added to 1 ml of extract, shaken vigorously, and allowed to stand for 30 min in the dark at room temperature. A blank contains only the solvent. The antioxidant capacity (AC) of the methanolic extracts was expressed as mg ascorbic acid equivalent per g dry weight (mg AA/g DW) and that of the lipid extracts (crude oil and its unsaponifiable fraction) was expressed as  $\mu\text{g}$  tocopherol equivalent per g dry weight ( $\mu\text{g}$  T/g DW). AC was calculated using the following equation:

$$AC = ((Ab_c - Ab_s) / \alpha) \cdot D \cdot V \cdot (1/W_s) \quad (1)$$

$Ab_c$ , absorbance of control (without the extract);  $Ab_s$ , absorbance of sample;  $\alpha$ , the slope of the standard curve;  $D$ , the dilution factor;  $V$ , The total extract volume (10 ml); and  $W$ , the sample weight used for extraction (g).

## 2.13 | FRAP assay of methanolic extracts

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was determined according to the method of (Benzie & Strain, 1996) with few modifications. The FRAP reagent was prepared by mixing 10 ml of acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 1 ml of TPTZ (10 mM (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) in HCl 40 mM), and 1 ml of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A quantity of 50  $\mu\text{l}$  of extract was added to 1 ml of FRAP reagent. The mixture was incubated at 37°C for 20 min and the absorbance was measured at 596 nm. A blank was prepared by replacing the extract by methanol (solvent). The ferric reduction capacity was calculated according to the equation obtained with ascorbic acid from the calibration curve, then expressed as mg ascorbic acid equivalent per g dry weight (mg AA/g DW).

## 2.14 | ABTS<sup>•+</sup> assay of methanolic extracts

The relative capacity of antioxidants to scavenge the ABTS<sup>•+</sup> radical was estimated using the (ABTS/peroxidase/hydrogen peroxide) system for ABTS<sup>•+</sup> radical formation as reported by (Chen et al., 2004) with some modifications. The ABTS<sup>•+</sup> radical has a relatively stable bluish-green color which is measured at 417 nm. In the presence of an antioxidant such as Trolox, the color production will be suppressed in proportion to the concentration of antioxidants. The final reagent contained 1 ml of ABTS (20 mM), 1 ml of horseradish peroxidase (0.2 mg/ml) prepared in phosphate buffer, pH = 6.9, and 150  $\mu\text{l}$  of hydrogen peroxide (1 mM). A quantity of 100  $\mu\text{l}$  of sample was mixed with 1 ml of the final reagent; the reading was obtained after 10 min of incubation at 417 nm. A blank was run, using 100  $\mu\text{l}$  of methanol (solvent) and 1 ml of the final reagent. The total antioxidant activity of the extracts was calculated comparing ABTS decolorization with Trolox. The results are expressed as mg ascorbic acid equivalent per g dry weight (mg T/g DW).

## 2.15 | $\alpha$ -Amylase inhibition activity (AIA) of methanolic and lipid extracts

Inhibitory activity of *Aspergillus*  $\alpha$ -amylase was determined by the method described in (Abirami et al., 2014) with some modifications. The reaction mixture was prepared by mixing 200  $\mu\text{l}$  of a potassium phosphate buffer (0.03 M; pH = 7), 100  $\mu\text{l}$  of enzyme (0.5 mg/ml), and 100  $\mu\text{l}$  of extract at different concentrations (0.1 to 4 mg/ml for the methanolic extracts and 0.05 to 3 mg/ml for crude oil and the unsaponifiable fractions). After preincubation at 37°C for 5 min, 100  $\mu\text{l}$  of substrate (10 mg/ml) was added. The enzymatic reaction

was incubated at 37°C for 4 min and then, stopped by adding 1 ml of DNS reagent (dinitrosalicylic acid). The mixture was then heated at 100°C for 5 min and cooled and diluted with 4 ml of distilled water. The solution without sample represents the control and the solution without substrate represents the blank of the test. The production of maltose was followed by the reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid (yellow color) to 3-amino-5-nitrosalicylic acid (red color) and measured at 530 nm. Preliminary experiments were performed to establish the optimal conditions and these were deemed necessary: the substrate concentration (starch) 10% and the incubation time 4 min. The % inhibition was calculated using the formula:

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \left[ (A_0 - A_s) / A_0 \right] \times 100 \quad (2)$$

$A_0$ , absorbance of control without inhibitor;  $A_s$ , absorbance of test sample.

The activities of the extracts were evaluated as the half maximal inhibitory concentration (IC50). The latter was determined from the linear regression of percent inhibition curve as a function of the concentrations. The drug GLUCONOVA which contains acarbose was used as the reference  $\alpha$ -amylase inhibitor (3–10 mg/ml).

## 2.16 | Statistical analysis

All tests were carried out in triplicate. The data were expressed as the means  $\pm$  SEM. The results were evaluated by an analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's test, using Minitab 18.1 software (Minitab Inc., United States) to detect significant differences. The values of  $p < .05$  were considered significant. The correlation between various parameters was also studied by the Pearson test (at  $p < .05$ ) with the same software. Principal Component Analysis (PCA) was performed, using XLSTAT-Pro version 2014 (Addinsoft, New York, NY).

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 | Extraction yield

Samples of *Pistacia atlantica* galls were collected in six different sites in the Laghouat region (Algeria). The methanolic extracts obtained have a dark brown color with the exception of semi-circular galls which have a red color. Thereby, the dark brown color may come from strong presence of condensed tannins, resulting of polymerization of phenolic compounds. Also, the red color may be due the presence of anthocyanins. Moreover, the lipid extracts have a dark green viscous appearance that solidify almost completely at room temperature, probably due to saturated fatty acid composition of the oils. Regarding the green color may be explained by the presence of chlorophyll. Highest yield for phenolic extracts from spherical galls was recorded in SG.8.6 galls collected in August with a value of 82.37%, while the lowest yield was recorded in SG.9.3 galls

harvested in September at 36.38% with an average of 59.36%. For the majority of spherical galls, the yield is proportional to the altitude of the sites. For semi-circulars, it is between 28.89% (SCG.9.6) and 39.19% (SCG.7.5) with an average of 34.04%. The comparison between the two forms indicates that the spherical galls have a yield twofold higher compared to the semi-circular galls. Regarding the lipid extracts, the highest and the lowest yields of the spherical galls (Table 2) were observed in the samples SG.8.5 and SG.8.4 collected the during month August but from different sites with values: 4.63% and 2.66%, respectively, giving an average of 3.65%. While those of the semi-circulars, the highest was recorded in the SCG.9.6 at a value of 7.64% and the lowest of 2.74% in the SCG.8.6 with an average of 5.19%. Semi-circular galls produce twice as much yield as spherical galls. The difference in yields may be due to the origins as well as the environmental conditions that affect the development of lipids.

### 3.2 | Fatty acid composition of *P. atlantica* gall oil

Recently, nutritionists have recommended vegetable oils as an important part of a healthy diet due to their high contents of fatty acids (FAs). The distribution and content of FAs differ in dependence on various plant sources of oils and technology process used for their production. So, their impact on human health could be assessed according to individual FAs (Orsavova et al., 2015). The results of the fatty acid composition of *P. atlantica* galls are summarized in the Table 2. The identification of FAMES detected 16 FAs with some variability in the 14 samples. Saturated FAs with fewer than 12 carbon atoms being called short and medium chain saturated fatty acids (MCFAs) have been found and varied from 2.66% (for SG.9.4) to 17.28% (for SG.9.6). The most predominant saturated FAs in our oils are palmitic acid (C16:0) for the samples (SG.8.1, SG.9.4, SG.7.5, SG.8.5, SCG.7.5, SG.8.6, and SG.9.6) representing proportions between 14.47% and 34.86% and docosanoic acid (C22:0) for the samples (SG.9.2, SG.9.3, SG.7.4, SG.8.4, SCG.8.5, SCG.8.6, and SCG.9.6) whose proportions varied from 12.18% to 34.20%. Lauric (C12:0), myristic (C14:0), margaric (C17:0), stearic (C18:0) acids, and groundnut (C20:0) were found, but in a lower proportion. Regarding unsaturated FAs, palmitoleic (C16:1 $\omega$ 7), oleic (C18:1 $\omega$ 9), linoleic (C18:2 $\omega$ 6), linolenic (C18:3 $\omega$ 3), gondoic (C20:1 $\omega$ 9), and arachidonic (C20:4 $\omega$ 6) acids were found in all the oils. Linoleic acid, and second gondoic acid were the most predominant, accounting for 1.99% to 19.86% and 1.40% to 21.86%, respectively. The unsaturated FAs to saturated FAs ratio was low in all samples ranging from 0.27 to 1.14. The high level of saturated FAs in *P. atlantica* galls oil could decrease its nutritional value. According (Orsavova et al., 2015), it has been found that lauric acid (C12:0) as well as myristic acid (C14:0) raise plasma total cholesterol concentrations, the first due to an increase in LDL cholesterol, the latter due to a rise of both LDL and HDL cholesterol concentrations. Other studies made by (Mensink et al., 2003) and (Lawrence, 2013) have reported that the ratio of total cholesterol to HDL cholesterol is a more specific marker of coronary artery

TABLE 2 Fatty acid composition of the lipids fractions from the galls of *P. atlantica* (%)

Fatty acids	Composition (%)																
	SG.8.1	SG.9.2	SG.9.3	SG.7.4	SG.8.4	SG.9.4	SG.7.5	SG.8.5	SG.8.6	SG.9.6	SG.7.5	SG.8.5	SG.8.6	SG.8.5	SG.8.6	SG.9.6	
C6:0	1.84 ± 0.2	1.22 ± 0.12	1.49 ± 0.15	-	0.84 ± 0.13	0.71 ± 0.12	Tr	2.32 ± 0.15	0.70 ± 0.12	1.64 ± 0.14	0.74 ± 0.12	1.78 ± 0.19	-	-	-	-	-
C8:0	1.36 ± 0.12	1.82 ± 0.18	1.51 ± 0.15	1.54 ± 0.16	1.09 ± 0.16	1.14 ± 0.16	2.24 ± 0.18	4.56** ± 0.17	3.17 ± 0.21	1.65 ± 0.14	1.34 ± 0.14	1.14 ± 0.2	1.32 ± 0.15	1.14 ± 0.2	1.32 ± 0.15	0.84 ± 0.12	0.84 ± 0.12
C10:0	12.03 ± 0.35	5.77 ± 0.25	1.18 ± 0.12	7.13 ± 0.31	8.88 ± 0.27	0.81 ± 0.12	3.11 ± 0.2	1.57 ± 0.12	1.32 ± 0.14	13.99 ± 0.4	1.62 ± 0.19	0.42 ± 0.12	2.35 ± 0.2	0.42 ± 0.12	2.35 ± 0.2	10.92 ± 0.3	10.92 ± 0.3
C12:0	4.95 ± 0.27	2.87 ± 0.17	2.62 ± 0.28	-	3.32 ± 0.2	7.25 ± 0.26	4.35 ± 0.24	3.07 ± 0.17	2.65 ± 0.2	0.47 ± 0.12	2.05 ± 0.19	0.66 ± 0.12	1.06 ± 0.15	0.66 ± 0.12	1.06 ± 0.15	2.60 ± 0.19	2.60 ± 0.19
C14:0	4.67 ± 0.3	2.87 ± 0.17	2.85 ± 0.24	3.42 ± 0.12	1.98 ± 0.16	1.14 ± 0.16	7.28 ± 0.36	6.89 ± 0.2	15.71 ± 0.39	8.61 ± 0.28	0.89 ± 0.15	1.13 ± 0.16	2.74 ± 0.23	1.13 ± 0.16	2.74 ± 0.23	3.65 ± 0.24	3.65 ± 0.24
C16:0	15.93 ± 0.43	12.89 ± 0.4	10.24 ± 0.27	20.51 ± 0.43	18.95 ± 0.35	26.55 ± 0.4	19.49 ± 0.32	14.47 ± 0.36	34.86 ± 0.43	19.02 ± 0.37	20.00 ± 0.42	7.11 ± 0.28	10.39 ± 0.39	7.11 ± 0.28	10.39 ± 0.39	7.19 ± 0.28	7.19 ± 0.28
C16:1 <sub>ω7</sub>	-	0.63 ± 0.25	-	-	1.89 ± 0.31	0.34 ± 0.22	1.50 ± 0.35	0.35 ± 0.23	0.66 ± 0.22	0.66 ± 0.24	1.28 ± 0.37	1.22 ± 0.5	0.93 ± 0.4	1.22 ± 0.5	0.93 ± 0.4	-	-
C17:0	2.58 ± 0.16	2.54 ± 0.22	-	-	-	0.25 ± 0.12	1.11 ± 0.17	0.88 ± 0.13	0.54 ± 0.12	1.64 ± 0.16	0.63 ± 0.12	5.45 ± 0.26	1.68 ± 0.15	5.45 ± 0.26	1.68 ± 0.15	-	-
C18:0	4.43 ± 0.23	1.20 ± 0.14	-	-	-	3.12 ± 0.18	5.39 ± 0.29	1.97 ± 0.19	4.44 ± 0.23	4.34 ± 0.2	4.49 ± 0.31	1.54 ± 0.14	1.41 ± 0.12	1.54 ± 0.14	1.41 ± 0.12	-	-
C18:1 <sub>ω9</sub>	4.91 ± 0.30	5.39 ± 0.41	1.98 ± 0.27	5.00 ± 0.5	2.82 ± 0.34	11.52 ± 0.67	6.37 ± 0.47	2.85 ± 0.36	5.13 ± 0.59	4.80 ± 0.33	4.49 ± 0.39	1.35 ± 0.26	7.49 ± 0.6	1.35 ± 0.26	7.49 ± 0.6	-	-
C18:2 <sub>ω6</sub>	13.84 ± 0.76	3.25 ± 0.4	2.54 ± 0.38	19.86 ± 0.88	8.65 ± 0.58	10.23 ± 0.7	10.96 ± 0.68	1.99 ± 0.34	6.83 ± 0.57	3.14 ± 0.42	12.02 ± 0.72	4.98 ± 0.47	10.44 ± 0.65	4.98 ± 0.47	10.44 ± 0.65	6.78 ± 0.54	6.78 ± 0.54
C18:3 <sub>ω3</sub>	3.18 ± 0.19	2.05 ± 0.16	1.28 ± 0.2	4.61 ± 0.27	2.36 ± 0.19	1.78 ± 0.24	2.92 ± 0.16	0.87 ± 0.14	1.68 ± 0.36	1.70 ± 0.39	1.76 ± 0.23	2.12 ± 0.31	1.53 ± 0.28	2.12 ± 0.31	1.53 ± 0.28	1.47 ± 0.24	1.47 ± 0.24
C20:0	Tr	-	-	-	-	1.88** ± 0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:1 <sub>ω9</sub>	4.44 ± 0.49	9.47 ± 0.49	11.98 ± 0.62	10.38 ± 0.6	9.61 ± 0.55	2.50 ± 0.45	1.40 ± 0.43	3.65 ± 0.44	2.75 ± 0.46	8.82 ± 0.56	4.49 ± 0.5	21.86 ± 0.67	14.42 ± 0.62	21.86 ± 0.67	14.42 ± 0.62	19.96 ± 0.66	19.96 ± 0.66
C20:4 <sub>ω6</sub>	2.27 ± 0.22	4.85 ± 0.37	4.28 ± 0.39	3.55 ± 0.41	3.56 ± 0.4	4.45 ± 0.43	-	1.09 ± 0.16	1.88 ± 0.15	2.79 ± 0.18	5.72 ± 0.45	3.58 ± 0.35	3.03 ± 0.14	3.58 ± 0.35	3.03 ± 0.14	3.16 ± 0.2	3.16 ± 0.2
C22:0	7.83 ± 0.32	15.93 ± 0.3	34.20 ± 0.41	21.21 ± 0.4	21.93 ± 0.36	7.36 ± 0.22	-	4.25 ± 0.13	3.99 ± 0.15	-	8.88 ± 0.27	39.51 ± 0.42	12.18 ± 0.3	39.51 ± 0.42	12.18 ± 0.3	33.68 ± 0.38	33.68 ± 0.38
TI (%)	84.54 ± 4.34	72.75 ± 4.03	76.15 ± 3.48	97.21 ± 4.08	85.88 ± 4	81.03 ± 4.57	66.12 ± 3.85	50.78 ± 3.29	86.31 ± 4.34	73.27 ± 4.23	70.4 ± 4.57	93.85 ± 4.45	70.97 ± 4.38	93.85 ± 4.45	70.97 ± 4.38	90.25 ± 3.15	90.25 ± 3.15
ΣSFA (%)	55.9 ± 2.38	47.11 ± 1.95	54.09 ± 1.62	53.81 ± 1.42	61.7 ± 2.28	50.21 ± 1.86	42.97 ± 1.76	39.98 ± 1.62	67.38 ± 1.99	51.36 ± 1.81	40.64 ± 1.91	51.63 ± 1.61	33.13 ± 1.69	51.63 ± 1.61	33.13 ± 1.69	58.88 ± 1.51	58.88 ± 1.51
ΣMCSFA (%)	15.23 ± 0.67	8.81 ± 0.55	4.18 ± 0.42	8.67 ± 0.47	10.81 ± 0.56	2.66 ± 0.4	5.35 ± 0.38	8.45 ± 0.44	5.19 ± 0.47	17.28 ± 0.68	3.7 ± 0.45	3.34 ± 0.51	3.67 ± 0.35	3.34 ± 0.51	3.67 ± 0.35	11.76 ± 0.42	11.76 ± 0.42
ΣMUFA (%)	9.35 ± 0.79	15.49 ± 1.15	13.96 ± 0.89	15.38 ± 1.1	14.32 ± 1.2	14.36 ± 1.34	9.27 ± 1.25	6.85 ± 1.03	8.54 ± 1.27	14.28 ± 1.43	10.26 ± 1.26	24.43 ± 1.43	22.84 ± 1.62	24.43 ± 1.43	22.84 ± 1.62	19.96 ± 0.66	19.96 ± 0.66
ΣPUFA (%)	19.29 ± 1.17	10.15 ± 0.93	8.1 ± 0.97	28.02 ± 1.56	14.57 ± 1.17	16.46 ± 1.37	13.88 ± 0.84	3.95 ± 0.64	10.39 ± 1.08	7.63 ± 0.99	19.5 ± 1.4	10.68 ± 1.13	15.00 ± 1.07	10.68 ± 1.13	15.00 ± 1.07	11.41 ± 0.98	11.41 ± 0.98
ΣUFA (%)	28.64 ± 1.96	25.64 ±	22.06 ± 1.86	43.4 ± 2.66	28.89 ± 2.37	30.82 ± 2.71	23.15 ± 2.09	10.8 ± 1.67	18.93 ± 2.35	21.91 ± 2.42	29.76 ± 2.66	35.11 ± 2.56	37.84 ± 2.69	35.11 ± 2.56	37.84 ± 2.69	31.37 ± 1.64	31.37 ± 1.64
U/S (%)	0.51	0.54	0.41	0.81	0.47	0.61	0.54	0.27	0.28	0.43	0.73	0.68	1.14	0.68	1.14	0.53	0.53
LY(%) dw	3.37	2.89	3.19	3.15	2.66	2.78	3.33	4.63	3.54	3.17	4.61	5.49	2.74	5.49	2.74	7.64	7.64

Abbreviations: ΣMCSFA, sum of medium chain saturated fatty acids; ΣMUFA, sum of monounsaturated fatty acids; ΣPUFA, sum of polyunsaturated fatty acids; ΣSFA, sum of saturated fatty acids; ΣUFA, sum of unsaturated fatty acids; LY, lipids yield; TI, total identified; Tr, trace; U/S, ratio (unsaturated/saturated).

\* $p < .05$  (compared between samples);

\*\* $p < .01$ .

**TABLE 3** Total phenolic contents (TPC), total flavonoid contents (TFC), Condensed tannin contents (CTC), total tocopherol contents (TTC), and total sterol contents (TSC) in various extracts of *P. atlantica* galls

Samples	Methanolic extracts			Lipid extracts	
	TPC (mg GA/g)	TFC (mg Q/g)	CTC (mg C/g)	TTC ( $\mu\text{g T/g}$ )	TSC ( $\mu\text{g S/g}$ )
SG.8.1	328.61 <sup>a</sup> $\pm$ 12.6	0.38 <sup>c</sup> $\pm$ 0.01	409.82 <sup>cd</sup> $\pm$ 37.60	5.80 <sup>e</sup> $\pm$ 0.9	73.32 <sup>cd</sup> $\pm$ 1.2
SG.9.2	156.61 <sup>d</sup> $\pm$ 7.20	0.26 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	479.93 <sup>bc</sup> $\pm$ 10.60	7.70 <sup>de</sup> $\pm$ 0.8	45.42 <sup>f</sup> $\pm$ 5.4
SG.9.3	119.45 <sup>ef</sup> $\pm$ 2.40	0.24 <sup>c</sup> $\pm$ 0.04	257.55 <sup>ef</sup> $\pm$ 59.30	5.00 <sup>e</sup> $\pm$ 1.3	57.14 <sup>def</sup> $\pm$ 4.1
SG.7.4	121.22 <sup>ef</sup> $\pm$ 19.20	0.30 <sup>c</sup> $\pm$ 0.03	307.37 <sup>de</sup> $\pm$ 59.20	7.10 <sup>de</sup> $\pm$ 1.1	48.10 <sup>ef</sup> $\pm$ 1.4
SG.8.4	155.19 <sup>d</sup> $\pm$ 1.80	0.29 <sup>c</sup> $\pm$ 0.03	395.70 <sup>cde</sup> $\pm$ 78.50	8.20 <sup>cde</sup> $\pm$ 1.2	42.14 <sup>f</sup> $\pm$ 8.4
SG.9.4	113.25 <sup>ef</sup> $\pm$ 3.80	0.46 <sup>c</sup> $\pm$ 0.07	259.44 <sup>ef</sup> $\pm$ 77.20	6.60 <sup>e</sup> $\pm$ 0.8	64.20 <sup>de</sup> $\pm$ 10.1
SG.7.5	243.85 <sup>b</sup> $\pm$ 8.80	0.61 <sup>c</sup> $\pm$ 0.07	684.61 <sup>a</sup> $\pm$ 47.10	5.40 <sup>e</sup> $\pm$ 1.3	89.20 <sup>bc</sup> $\pm$ 4.2
SG.8.5	237.13 <sup>b</sup> $\pm$ 6.00	0.63 <sup>c</sup> $\pm$ 0.13	708.70 <sup>a</sup> $\pm$ 70.80	12.25 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.6	97.50 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.2
SG.8.6	238.90 <sup>b</sup> $\pm$ 1.40	0.54 <sup>c</sup> $\pm$ 0.03	514.16 <sup>bc</sup> $\pm$ 33.50	5.53 <sup>e</sup> $\pm$ 0.9	66.32 <sup>d</sup> $\pm$ 8.7
SG.9.6	204.74 <sup>c</sup> $\pm$ 7.40	0.42 <sup>c</sup> $\pm$ 0.06	586.64 <sup>ab</sup> $\pm$ 33.10	8.20 <sup>de</sup> $\pm$ 0.4	65.30 <sup>d</sup> $\pm$ 8.3
SCG.7.5	125.91 <sup>e</sup> $\pm$ 6.40	2.31 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.84	114.71 <sup>fg</sup> $\pm$ 21.10	11.01 <sup>bcd</sup> $\pm$ 1.5	86.90 <sup>bc</sup> $\pm$ 3.3
SCG.8.5	120.60 <sup>ef</sup> $\pm$ 4.30	2.48 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.71	110.25 <sup>fg</sup> $\pm$ 19.00	14.52 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	95.10 <sup>b</sup> $\pm$ 5.2
SCG.8.6	122.54 <sup>e</sup> $\pm$ 2.80	1.83 <sup>b</sup> $\pm$ 0.36	124.70 <sup>fg</sup> $\pm$ 24.5	6.91 <sup>e</sup> $\pm$ 0.8	62.80 <sup>de</sup> $\pm$ 4.0
SCG.9.6	103.10 <sup>f</sup> $\pm$ 2.50	2.87 <sup>a</sup> $\pm$ 0.50	55.71 <sup>g</sup> $\pm$ 20.70	23.70 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	112.75 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7

Notes: Values in the same column bearing different superscripts are significantly different ( $p < .05$ ) according to Tukey's post hoc test. Superscripts a  $\rightarrow$  b  $\rightarrow$  c  $\rightarrow$  d  $\rightarrow$  e  $\rightarrow$  f  $\rightarrow$  g: indicate decreasing concentrations.

diseases than the value of LDL cholesterol. Oils rich in palmitic acids (C16:0) affected this ratio.

### 3.3 | Total tocopherol and total sterol contents

Tocopherols constitute a minor part of the unsaponifiable fraction of fatty substances. These are natural antioxidants found in oils. The results of the total tocopherol contents in the different lipid extracts from the *P. atlantica* galls are summarized in Table 3. A highly significant difference between TTC levels ( $p = .0001$ ) was recorded. The contents in spherical galls varied from  $5.00 \pm 1.3 \mu\text{g T/g}$  (for SG.9.3) to  $12.25 \pm 1.6 \mu\text{g T/g}$  (for SG.8.5) with an average of  $7.20 \pm 0.6 (\mu\text{g T/g})$  and a range of 7.25. While, in semi-circular galls, the values ranged from  $6.91 \pm 0.8 \mu\text{g T/g}$  (for SCG.8.6) to  $23.70 \pm 3.0 \mu\text{g T/g}$  (for SCG.9.6) with an average of  $14.03 \pm 1.1 (\mu\text{g T/g})$  and a range of 16.80. Among all extracts, a highest amount of TTC was recorded for semi-circular galls in September, whose average is twice that of the spherical ones. When we compare our work with that of (Guenane, 2017) on tocopherol and sterol contents of the fruits oil of *Pistacia atlantica*, our results are slightly superior.

The results showed that the lipid extracts contain an appreciable amounts of sterols (Table 3). The sterol contents varied significantly from  $42.14 \pm 8.4 \mu\text{g S/g}$  (for SG.8.4) to  $97.50 \pm 3.2 \mu\text{g S/g}$  (SG.8.5) with an average of  $64.70 \pm 1.0 (\mu\text{g S/g})$  and a range of 55.36 for spherical galls and were between  $62.80 \pm 4.0 \mu\text{g S/g}$  (for SCG.8.6) and  $112.75 \pm 1.7 \mu\text{g S/g}$  (for SCG.9.6) with an average of  $89.40 \pm 2.6 (\mu\text{g S/g})$  and a range of 49.95 for semi-circular galls. The most important value for all samples was obtained in semi-circular galls in September. Our results are close those of (Guenane, 2017) on the

fruit oils of *Pistacia atlantica*. Moreover, they are twofold lower than those made by (Harrat et al., 2018) on leaves oil of *P. lentiscus*.

### 3.4 | Total phenolic, total flavonoid, and condensed tannin contents

In this study, a quantitative analysis was carried out from the galls of *Pistacia atlantica* harvested in July, August, and September in different sites, in order to evaluate the possible influence of gall shape (spherical, semi-circular), months, and sites. Determination of the total phenol compounds, total flavonoid, and condensed tannin contents in the methanolic extracts is shown in Table 3. Total phenolic content of the different methanolic extracts of *P. atlantica* spherical galls ranged from  $113.25 \pm 3.8 \text{ mg GA/g}$  (for SG.9.4) to  $328.61 \pm 12.6 \text{ mg GA/g}$  (for SG.8.1) with an average of  $191.29 \pm 3.11 (\text{mg GA/g})$  and a range of 215.36. The TPCs of spherical galls were proportional to the altitude of the sites with the exception of sample SG.8.1 which is high at low altitude. While, those of semi-circular galls were between  $103.1 \pm 2.5 \text{ mg GA/g}$  (for SCG.9.6) and  $125.91 \pm 6.40 \text{ mg GA/g}$  (for SCG.7.5) with an average of  $119.38 \pm 2.57 (\text{mg GA/g})$  and a range of 22.81. The contents of the spherical forms were significantly higher ( $p < .01$ ) than those of the semi-circular forms (threefold). Among all the extracts, significant quantities of TPC were reached in July and August and lowest in September.

Likewise, flavonoids generate a particular interest because of their antioxidant properties and synergistic effects with other antioxidants (Ben Ahmed et al., 2017). The difference in total flavonoid content of all the methanolic extracts was significant ( $p = .0001$ ) ranging from  $0.24 \pm 0.04 \text{ mg Q/g}$  (for SG.9.3) to  $0.63 \pm 0.13 \text{ mg Q/g}$

(for SG.8.5) with an average equal to  $0.41 \pm 0.04$  (mg Q/g) and a range of 0.39 for spherical galls and contents varying from  $1.83 \pm 0.36$  mg Q/g (for SCG.8.6) to  $2.87 \pm 0.50$  mg Q/g (for SCG.9.6) with an average equal to  $2.37 \pm 0.51$  (mg Q/g) and a range of 1.04 for semi-circular galls. Furthermore, the amount of flavonoids in semi-circular galls was sixfold higher than that in spherical galls, this was confirmed by the statistical study which show a significant influence of the shape ( $p = .0001$ ).

Tannins are widespread in the plant kingdom. They are localized in bark, wood, roots, leaves, fruits, and galls where they play the role of chemical weapons defensive against certain parasites. Condensed tannins are polymers consisting of monomeric units of flavan-3-ol, linked together by carbon-carbon bonds and flavanes-3,4-diols derived from catechin or its many isomers (Rhazi, 2015). The interest to study condensed tannins lies in their increasingly beneficial potential for health (Ben Ahmed et al., 2017). The CTC are more widespread about 653-fold compared to flavonoids ranging between  $257.55 \pm 59.3$  mg C/g (for SG.9.3) and  $708.70 \pm 70.80$  mg C/g (for SG.8.5) with an average of  $460.39 \pm 27.16$  (mg C/g) and a range of 451.15 for spherical galls and going from  $55.71 \pm 20.7$  mg C/g (for SCG.9.6) to  $124.7 \pm 24.5$  mg C/g (for SCG.8.6) with an average of  $108.83 \pm 20.68$  (mg C/g) and a range of 68.99 for semi-circular galls. Indeed, ANOVA revealed significant differences in CTC ( $p = .0001$ ) between the results. Similarly, spherical galls are fivefold richer in condensed tannins than semi-circular galls. This difference was proved by a significant influence of the shape ( $p = .0001$ ) and the different sites ( $p = .011$ ) on the contents of the condensed tannins of *P. atlantica* galls. It should be noted that the highest threshold

of CTC for both forms was reached in August, whereas the lowest in September. The relative increase in standard deviations of condensed tannin levels demonstrates the heterogeneity of the composition of phenolic compounds for the same site (Guenane, 2017). In addition, the CTC values of the spherical galls are higher than the TPC (Table 3); this can be explained by the fact that the Folin-Ciocalteu test used to quantify the TPC can be sensitive to variations in the phenolic composition of a sample, which could lead to an over or underestimation of the values. There is no method that can detect all phenolic compounds. As a consequence, it is often necessary to perform several specific analyses (Vermerris & Nicholson, 2006).

Some studies on galls of different plant varieties have been carried out, giving high levels of phenolic compounds especially tannins due to necrotic development, resistance, or hypersensitive responses to arthropods in some plants (Abrahamson et al., 1991). According to plants (Abrahamson et al., 1991), the *Solidago altissima* galls formed at the stem had a phenolic content threefold to fivefold higher than the normal stem. Comparing our work with that of (Ben Ahmed et al., 2017) on the *Pistacia atlantica* leaves, our results on the condensed tannins were 103-fold highest. Moreover, the variability of polyphenol contents in our extracts can probably be due to genotypic and edaphic factors (Tahar et al., 2015).

### 3.5 | Antioxidant activities

The antioxidant properties, especially the neutralization of free radicals, are very important because of the harmful role of their

**TABLE 4** Antioxidant activities of different extracts of *P. atlantica* galls

Samples	Methanolic extracts			DPPH of lipid extracts	
	DPPH (mg AA/g DW)	FRAP (mg AA/g DW)	ABTS (mg T/g DW)	CO ( $\mu$ g T/g DW)	UM ( $\mu$ g T/g DW)
SG.8.1	$308.50^b \pm 62.90$	$456.77^b \pm 7.7$	$129.93^b \pm 10.4$	$2.93^h \pm 0.20$	$11.50^{ab} \pm 1.30$
SG.9.2	$164.93^{cd} \pm 24.00$	$235.14^{ef} \pm 9.0$	$61.92^d \pm 16.3$	$4.39^f \pm 0.20$	$7.19^{de} \pm 1.10$
SG.9.3	$169.73^{cd} \pm 20.30$	$232.45^{ef} \pm 14.0$	$69.12^{cd} \pm 8.7$	$5.07^e \pm 0.20$	$10.63^{abc} \pm 0.50$
SG.7.4	$132.50^d \pm 22.20$	$168.59^{gh} \pm 10.4$	$50.50^d \pm 16.0$	$4.34^f \pm 0.10$	$9.30^{abcd} \pm 0.10$
SG.8.4	$187.81^{cd} \pm 16.60$	$254.35^{de} \pm 3.9$	$70.2^{cd} \pm 19.3$	$3.50^{gh} \pm 0.50$	$9.37^{abcd} \pm 0.80$
SG.9.4	$162.90^{cd} \pm 10.70$	$240.16^{ef} \pm 12.0$	$70.56^{cd} \pm 6.1$	$7.50^{cd} \pm 0.20$	$6.93^{de} \pm 1.10$
SG.7.5	$233.74^{bc} \pm 51.50$	$288.0^{cd} \pm 27.5$	$113.04^{bc} \pm 15.9$	$5.93^e \pm 0.20$	$7.90^{cd} \pm 1.60$
SG.8.5	$227.30^{bc} \pm 30.50$	$315.2^c \pm 23.6$	$84.4^{bcd} \pm 17.8$	$8.04^{bc} \pm 0.03$	$7.81^{cd} \pm 1.30$
SG.8.6	$437.80^a \pm 44.20$	$553.18^a \pm 5.4$	$190.45^a \pm 32.3$	$1.91^i \pm 0.10$	$3.20^f \pm 0.80$
SG.9.6	$163.73^{cd} \pm 24.30$	$258.8^{de} \pm 17.6$	$82.47^{bcd} \pm 10.0$	$3.90^{fg} \pm 0.20$	$4.00^{ef} \pm 1.50$
SCG.7.5	$160.04^{bcd} \pm 16.90$	$222.7^{ef} \pm 19.8$	$87.08^{bcd} \pm 11.3$	$7.81^{bcd} \pm 0.10$	$7.54^{cd} \pm 0.40$
SCG.8.5	$149.80^{bcd} \pm 9.30$	$206.58^{fg} \pm 11.0$	$57.1^d \pm 18.6$	$8.24^b \pm 0.10$	$8.33^{bcd} \pm 0.60$
SCG.8.6	$127.60^d \pm 7.70$	$177.41^{gh} \pm 14.1$	$54.73^d \pm 15.8$	$7.20^d \pm 0.30$	$11.96^a \pm 1.00$
SCG.9.6	$103.13^d \pm 12.10$	$162.35^h \pm 8.8$	$49.51^d \pm 6.2$	$9.91^a \pm 0.30$	$10.80^{abc} \pm 1.80$

Notes: Values with different lowercase superscript letters are significantly different ( $p < .05$ ) according to Tukey's post hoc test. Superscripts a  $\rightarrow$  b  $\rightarrow$  c  $\rightarrow$  d  $\rightarrow$  e  $\rightarrow$  f  $\rightarrow$  g  $\rightarrow$  h  $\rightarrow$  i: indicate decreasing concentrations.

Abbreviations: ABTS<sup>++</sup>, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); CO, crude oil; DPPH<sup>\*</sup>, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DW, dry weight; FRAP, ferric reducing antioxidant power; UM, unsaponifiable matter.

radicals in biological systems (Peksel et al., 2010). In addition, it was suggested that an increased level of free radical may be one of the triggers for insulin resistance. Their decrease may be a therapeutic target for glycemic control (Khacheba et al., 2014, 2017). The antioxidant activity of methanolic extracts was estimated by three methods different antioxidant tests, that is, DPPH\*, FRAP, and ABTS\*\* assays, which are commonly used in biological samples. The antioxidant activities of methanolic extracts as shown in Table 4 were very variable and significantly different ( $p = .0001$ ).

The DPPH\* radical scavenging is a widely used method to evaluate the capacity of plant extracts to scavenge free radicals generated from DPPH reagent (Chung et al., 2006). The spherical galls had an average of  $218.88 \pm 28.92$  mg AA/g (values between  $132.5 \pm 22.2$  mg AA/g (for SG.7.4) and  $437.8 \pm 44.2$  mg AA/g (for SG.8.6)) and a range of 305.3. Moreover, the semi-circular galls had an average of  $135.14 \pm 10.92$  mg AA/g (values between  $103.13 \pm 12.1$  mg AA/g (for SCG.9.6) and  $160.04 \pm 16.9$  mg AA/g (for SCG.7.5)) and a range of 56.91. According to the results, the amount of antioxidants in spherical galls was proportional to the altitude and twice as rich as that of semi-circular galls.

For FRAP, that is, reducing power is generally associated with the presence of reductants in the antioxidant samples. Reductants cause the reduction of  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  (Duh, 1998). The reducing power in spherical galls varied from  $168.59 \pm 10.4$  mg AA/g (for SG.7.4) to  $553.18 \pm 5.4$  mg AA/g (for SG.8.6) with an average of  $300.27 \pm 6.82$  (mg AA/g) and a range of 384.60. While, in semi-circular galls, the values ranged from  $162.35 \pm 8.8$  mg AA/g (for SCG.9.6) to  $222.7 \pm 19.8$  mg AA/g (for SCG.7.5) with an average of  $192.25 \pm 12.3$

(mg AA/g) and a range of 60.35. Among all extracts, a highest value was recorded for spherical galls in August, whose average is twice that of the semi-circular ones. This difference was proved by a significant influence of the shape ( $p = .05$ ).

The ABTS\*\* assay has been used to screen the relative radical scavenging capacities of phenolic compounds, which act as electron- or H-donating agent (Djeridane et al., 2015). The spherical galls showed an average of  $92.26 \pm 13.4$  mg T/g (values between  $50.50 \pm 16.0$  mg T/g (for SG.7.4) and  $190.45 \pm 32.3$  mg T/g (for SG.8.6)) and a range of 139.15. Moreover, the semi-circular galls showed an average of  $62.09 \pm 11.9$  mg T/g (values between  $49.51 \pm 6.2$  mg T/g (for SCG.9.6) and  $87.09 \pm 11.3$  mg T/g (for SCG.7.5)) and a range of 37.57. According to the results, the amount of antioxidants in spherical galls was twice as rich as that of semi-circular galls.

The results of the lipid extracts are mentioned in Table 4; the averages of the DPPH antioxidant activity of the crude oils and unsaponifiable fractions of the spherical galls were  $4.72 \pm 0.16$   $\mu$ g T/g (values between  $1.91 \pm 0.1$   $\mu$ g T/g (for SG.8.6) and  $8.04 \pm 0.04$   $\mu$ g T/g (for SG.8.6)) and  $8.29 \pm 0.01$   $\mu$ g T/g (values between  $3.2 \pm 0.8$   $\mu$ g T/g (for SG.8.6) and  $11.5 \pm 1.3$   $\mu$ g T/g (for SG.8.1)), respectively, while the averages of antioxidant activity of crude oils and unsaponifiable fractions of semi-circular galls were  $7.77 \pm 0.88$   $\mu$ g T/g (values between  $3.2 \pm 0.8$   $\mu$ g T/g (for SCG.8.6) and  $11.5 \pm 1.3$   $\mu$ g T/g (for SCG.8.1)) and  $9.66 \pm 0.73$   $\mu$ g T/g (values between  $7.54 \pm 0.4$   $\mu$ g T/g (for SCG.7.5) and  $11.96 \pm 1.0$   $\mu$ g T/g (for SCG.8.6)), respectively. The results obtained clearly show that the antioxidant activity of crude oil is weaker than that of the unsaponifiable fraction, which demonstrates that the latter is antioxidant in nature. Also, the antioxidant

Samples	Methanolic extracts IC50 (mg/ml)	Lipid extracts IC50 (mg/ml)	
		CO	UM
SG.8.1	$1.07^{de} \pm 0.20$	$1.80^{cdef} \pm 0.70$	$1.36^{ab} \pm 0.30$
SG.9.2	$0.56^e \pm 0.10$	$2.42^{ab} \pm 0.45$	$1.19^b \pm 0.10$
SG.9.3	$1.60^{bcd} \pm 0.10$	$2.14^{abcd} \pm 0.15$	$1.37^{ab} \pm 0.20$
SG.7.4	$1.76^{bc} \pm 0.10$	$2.11^{abcd} \pm 0.11$	$1.27^{ab} \pm 0.20$
SG.8.4	$1.61^{bcd} \pm 0.30$	$1.88^{bcdef} \pm 0.37$	$1.61^a \pm 0.10$
SG.9.4	$1.95^b \pm 0.20$	$2.48^a \pm 0.10$	$1.28^{ab} \pm 0.10$
SG.7.5	$1.45^{bcd} \pm 0.30$	$2.30^{abc} \pm 0.04$	$1.17^b \pm 0.10$
SG.8.5	$1.51^{bcd} \pm 0.10$	$1.72^{def} \pm 0.12$	$1.25^b \pm 0.10$
SG.8.6	$1.04^{de} \pm 0.20$	$1.61^{def} \pm 0.03$	$0.81^{cde} \pm 0.10$
SG.9.6	$1.25^{cd} \pm 0.10$	$1.54^{ef} \pm 0.12$	$0.56^e \pm 0.02$
SCG.7.5	$1.93^b \pm 0.04$	$2.45^{ab} \pm 0.17$	$1.15^{bc} \pm 0.10$
SCG.8.5	$1.26^{cd} \pm 0.30$	$1.43^f \pm 0.21$	$0.75^{de} \pm 0.10$
SCG.8.6	$3.67^a \pm 0.30$	$1.65^{def} \pm 0.10$	$1.03^{bcd} \pm 0.01$
SCG.9.6	$3.19^a \pm 0.40$	$1.70^{def} \pm 0.13$	$1.10^{bc} \pm 0.10$
GLUCONOVA	$9.37 \pm 0.80$	-	-

**TABLE 5**  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of different extracts of *P. atlantica* galls

Notes: Values with different lowercase superscript letters are significantly different ( $p < .05$ ) according to Tukey's post hoc test. Superscripts a  $\rightarrow$  b  $\rightarrow$  c  $\rightarrow$  d  $\rightarrow$  e  $\rightarrow$  f: indicate decreasing concentrations. GLUCONOVA is a drug containing acarbose, an active pharmaceutical ingredient. Abbreviations: CO, crude oil; UM, unsaponifiable matter.

activity of lipid extracts from semi-circular galls was twice as high compared to spherical galls. In addition, the results concerning the antioxidant activity of the unsaponifiable fractions of the spherical galls are inversely proportional to the altitude. The highest values for the two types of extract (phenolic and lipid) were recorded mainly in August. According to (Ben Ahmed et al., 2016), the difference in values of antioxidant activity may be due to several factors that affect the production and stability of antioxidants, such as location, harvest period (although in our case these two factors are not significant), the meteorological conditions, and the molecular geometry of the antioxidant compounds. Indeed, some small molecules have a better ability to access the radical site.

All extracts of *Pistacia atlantica* galls have shown a positive effect on scavenging free radicals, reducing power, and can be used as a source of natural antioxidants. However, the methanolic extracts were approximately 30000-fold higher than the lipid extracts. Moreover, several studies (Ahmed et al., 2015; Ben Ahmed et al., 2016; Guenane, 2017; Maamri, 2008; Toul et al., 2017) on the different parts of the plant *Pistacia atlantica* (leaves, fruits and buds) have reported on the richness of this plant in phenolic compounds and their major role in trapping free radicals. As well as the confirmation that these phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, and tannins) were powerful antioxidants, hydrogen donors thanks to their hydroxyl groups (Cherbi et al., 2016; Khacheba et al., 2014; Tahar et al., 2015; Toul et al., 2017). According (Ben Ahmed et al., 2017), differences in the antioxidant assay results could be due to the presence of compounds having a different affinities to react with DPPH<sup>\*</sup>, FRAP, or ABTS<sup>\*+</sup>. Finally, it appears that work on lipid extracts (Bentireche et al., 2019; Maamri, 2008; Shad et al., 2012) has shown that the trapping of the DPPH<sup>\*</sup> radical can be attributed to

total phytosterols, total tocopherols, carotenoids, and other polar lipid compounds. Also, tocopherols are generally the most antioxidant molecules in oil.

### 3.6 | $\alpha$ -amylase inhibitory activity

One of the therapeutic strategies used for the treatment of diabetes is to decrease post-prandial hyperglycemia. This is done by inhibiting the enzymes involved in carbohydrate hydrolysis, such as  $\alpha$ -amylase. The latter decomposes the starch into disaccharides and oligosaccharides, before intestinal  $\alpha$ -glucosidase catalyzes the degradation of disaccharides into glucose, which is then absorbed into the bloodstream (Boussoussa et al., 2018). Several inhibitors of  $\alpha$ -amylase, including acarbose, voglibose, and miglitol are oral agents, clinically used for treatment. However, it is reported to cause a variety of secondary side effects, such as abdominal distention, diarrhea, and often too expensive. Therefore, the search for inhibitors from natural sources raise a growing interest (Abirami et al., 2014; Sama et al., 2012).

In vitro study on the inhibition of  $\alpha$ -amylase showed that phenolic extracts, crude oils and unsaponifiable fractions of *P. atlantica* galls exhibit inhibitory activity. Table 5 summarizes all the results expressed in IC50. These values are lower compared with the drug used as a reference, this value have a higher efficiency. Variance analyses indicate that there are significant differences ( $p = .001$ ) between the different extracts. Results of the methanolic extracts fluctuated from  $0.56 \pm 0.1$  mg/ml (for SG.9.2) to  $1.95 \pm 0.2$  mg/ml (for SG.9.4) with an average of  $1.38 \pm 0.09$  mg/ml for spherical galls and from  $1.26 \pm 0.3$  mg/ml (for SCG.8.5) at  $3.67 \pm 0.3$  mg/ml (for SCG.8.6) with an average of  $2.51 \pm 0.12$  mg/ml for semi-circular galls.

**TABLE 6** Pearson's correlation between the contents, antioxidant activities, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity in *P. atlantica* galls

	TPC	TFC	CTC	TSC	DPPH of ME	FRAP of ME	DPPH of CO (mg T/g)	DPPH of UM (mg T/g)	AIA of CO	AIA of UM
TPC (mg GA/g)	1		0.725**							
TFC (mg Q/g)	-0.445	1								
CTC (mg C/g)		-0.689**	1							
DPPH of ME	0.760**	-0.400	0.520							
FRAP of ME (mg AA/g)	0.820*	-0.404	0.551*		0.980*					
ABTS of ME (mg T/g)	0.740*	-0.304	0.485		0.970*	0.941*				
AIA of ME	-0.503	0.590*	-0.606*							
TTC ( $\mu$ gT/g)				0.713*			0.715*	0.190	-0.318	-0.181
TSC ( $\mu$ g S/g)							0.708*	0.620*	-0.258	-0.331
DPPH of UM										0.566*

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); AIA,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity; CO, crude oil; CTC, condensed tannin contents; DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, Ferric reducing antioxidant power; ME, methanolic extracts; TFC, total flavonoid contents; TPC, total phenolic contents; TSC, total sterols contents; TTC, total tocopherols contents; UM, unsaponifiable matter.

\*Correlation is significant at the 0.05 level (two-tailed);

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (two-tailed).

The results obtained from the lipid extracts showed that they varied from one extract to another. Indeed, the IC<sub>50</sub> values of crude oils were between  $1.54 \pm 0.12$  mg/ml (for SG.9.6) and  $2.48 \pm 0.1$  mg/ml (for SG.9.4) with an average of  $2.00 \pm 0.02$  mg/ml for the spherical galls and  $1.43 \pm 0.21$  mg/ml (for SCG.8.5) and  $2.45 \pm 0.17$  mg/ml (for SCG.7.5) with an average of  $1.81 \pm 0.13$  mg/ml for the semi-circular galls. Also, the average of IC<sub>50</sub> of the unsaponifiable fractions for the spherical galls was from  $1.19 \pm 0.03$  mg/ml (values oscillating from  $0.56 \pm 0.02$  mg/ml (for SG.9.6) to  $1.61 \pm 0.1$  mg/ml (for SG.8.4)) against an average of  $1.01 \pm 0.04$  mg/ml (values varying from  $0.75 \pm 0.1$  mg/ml (for SCG.8.5) to  $1.15 \pm 0.1$  mg/ml (for SCG.7.5)) for semi-circular galls. All the IC<sub>50</sub> values of the samples of the unsaponifiable fraction were lower than those of the crude oil, therefore, more effective, which demonstrates that the effectiveness of the lipid extract in inhibiting the  $\alpha$ -amylase was due to the molecules constituting the unsaponifiable fraction. Methanolic and lipid extracts from the spherical galls harvested in September revealed better inhibition. However, concerning those of semi-circular galls, the best inhibition was recorded in August.

Many studies confirmed that the inhibition of the  $\alpha$ -amylase enzyme was due to the presence of active substances in plants belonging to the different classes of secondary metabolites (e.g.: phenolic compounds, alkaloids, polysaccharides, terpenoid, and peptides) (Bhutkar et al., 2018; Sales et al., 2012). According to (Mamun-or-Rashid et al., 2014) and (Abirami et al., 2014), the most commonly involved active constituents are flavonoids, tannins, phenols, and alkaloids.

Additionally, (Firdaus et al., 2015) attributed the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Sargassum* species to their high polyphenol content, emphasizing their ability to chelate enzymes, leading to precipitation and alteration of the structure, associated with a loss of biological functions. Likewise, the variety of polyphenols may exhibit synergistic effects, leading to a higher efficiency of  $\alpha$ -amylase inhibition (Nagappan et al., 2017; Telli, 2017). In the work done by (Ahmad et al., 2012), on seeds of *Momordica charantia* against the two enzymes  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase, they demonstrated that the oil of these seeds was a powerful antidiabetic agent. According to (Conforti et al., 2005), squalene and other compounds in the

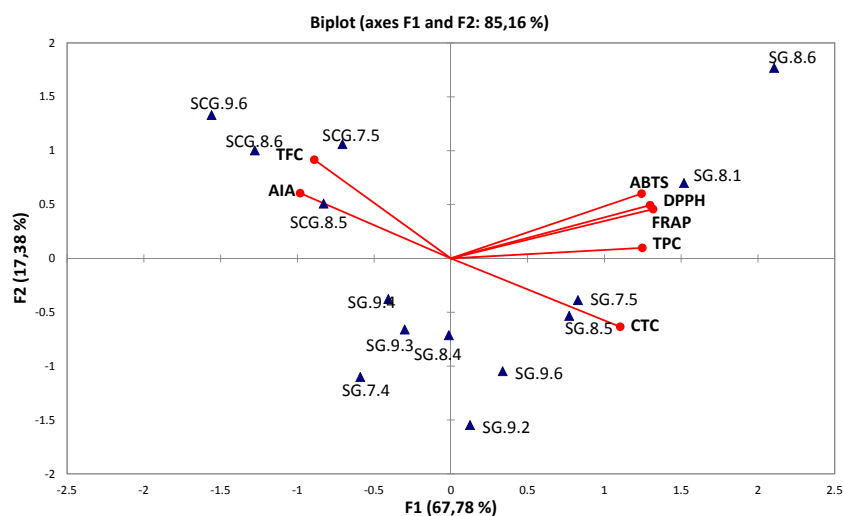
unsaponifiable fraction can also contribute to the overall inhibition of  $\alpha$ -amylase performance.

### 3.7 | Correlation between the contents, DPPH scavenging activity, and $\alpha$ -amylase inhibitory activity

The correlation calculated by the Pearson test between the content of the extracts and the activities studied was allowed us to verify if there is a significant relationship. Table 6 illustrates the set of calculated correlations.

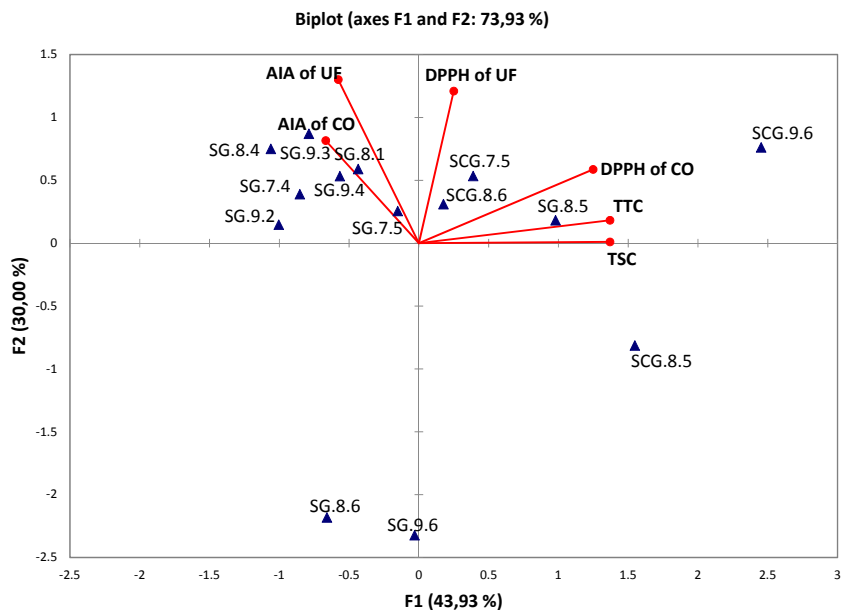
First, the correlation carried out between the TPC, TFC, and CTC was indicated that there was a highly significant positive correlation between TPC and CTC ( $0.725$ ;  $p < .01$ ) and an inversely proportional relationship between TFC and CTC ( $-0.689$ ;  $p < .01$ ). This demonstrates the nonsimultaneous variation between the contents. The contents in TTC and TSC revealed an absence of significant correlation.

Moreover, there was a highly significant correlation between antioxidant activities DPPH\* ( $0.760$ ;  $p < .01$ ), FRAP ( $0.820$ ,  $p < .05$ ), and ABTS\*+ ( $0.740$ ;  $p < .05$ ) and positive correlation between FRAP and TTC ( $0.551$ ;  $p < .05$ ). Also, a strong positive correlation was recorded between antioxidant activities, DPPH\* and FRAP; DPPH\* and ABTS\*+; FRAP and ABTS\*+ ( $0.980$ ,  $0.970$ , and  $0.941$ ;  $p < .05$ , respectively). Indeed, phenolic compounds are considered powerful antioxidants allowing the inactivation of free radical chains and the reducing ability. The concentration of phenolic compounds seems to influence the antioxidant activity. However, the lack of correlation between TFC and antioxidant activities may be linked to the assumption that most of the flavonoids could be in their glycoside forms and thus less effective compared to their aglycone forms (Ben Ahmed et al., 2017). Regarding to crude oils and unsaponifiable fractions, there was a positive significant correlation between TTC and TSC ( $0.713$ ;  $p < .05$ ). Also, a highly significant correlation was recorded between the antioxidant activity of the crude oils and the two contents (TTC and TSC) ( $0.715$ ,  $0.708$ ;  $p < .05$ ) and between the antioxidant activity of the unsaponifiable fractions and TSC ( $0.620$ ;  $p < .05$ ). According to a study conducted by (Guenane, 2017)



**FIGURE 2** Scatter plot (F2 versus F1) of the phenolic compounds (TPC, TFC, and CTC) and in vitro activities (DPPH\*, FRAP, ABTS\*+, and AIA) among different samples of *P. atlantica* galls

**FIGURE 3** Scatter plot (F2 versus F1) of the unsaponifiable compounds (TTC and TSC) and in vitro activities (DPPH\* and AIA) of unsaponifiable fractions (UF) and crude oils (CO) among different samples of *P. atlantica* galls



on *Pistacia atlantica* fruit oil demonstrated a significant correlation between antioxidant activity, tocopherols, and sterols. Therefore, a qualitative analysis of the tocopherols and phytosterols in the lipid extracts of *P. atlantica* galls as well as the verification of a possible correlation with the antioxidant activity is required.

The correlation performed between the IC50 of  $\alpha$ -amylase activity inhibitory and the contents of phenolic compounds revealed that there was a significant negative relationship between IC50 and CTC ( $-0.606$ ;  $p < .05$ ) and a significant positive relationship between IC50 and TFC ( $0.590$ ;  $p < .05$ ), knowing that a lower value of IC50 indicates a high inhibitory activity and vice versa. These results clearly suggested that phenolic compounds, in particular CTCs, are involved in the inhibition of  $\alpha$ -amylase. Indeed, tannins are powerful chelating agents for metals, which can form insoluble complexes with proteins and subsequently lead to their precipitation. Also the study made by (Gonçalves et al., 2011) demonstrated the close relationship between this capacity and the degree of polymerization of tannins. However, there was no significant correlation between IC50 values and contents (TTC and TSC). These inhibitory activities could be attributed to the presence of individual active molecules such as tocopherols, sterols, essential oils, etc. Their identification and the study of their individual inhibitory capacity seem to be necessary to reinforce this hypothesis. Finally, the moderate positive correlation was observed between the antioxidant activity and the  $\alpha$ -amylase inhibitory assay of unsaponifiable fractions ( $0.566$ ;  $p < .05$ ). This observation proves that the extracts having a better antioxidant activity are less effective for the inhibition of  $\alpha$ -amylase.

### 3.8 | Data analysis by PCA

In order to confirm and get a better insight in the relationships between the content of the extracts and the activities studied, the PCA calculation was conducted to visualize the data. Figure 2 presents

the vectors of the variables (TPC, TFC, and CTC, DPPH\*, FRAP, ABTS\*, and AIA) and the distribution of all the studied samples in the plane defined by the values of the two principal components. PCA showed that the first two principal components accounted for 85.16% of the total data variance, of which 67.78% was along the first principal component (F1), and 17.38% was along the second one (F2). The results confirmed that free radical-scavenging ability (DPPH\* and ABTS\*), ferric ion reducing power, and TPC were shown to be highly loaded on F1. The antioxidant activities (DPPH\*, FRAP, and ABTS\*) behaved similarly and more were related to TPC and CTC, which suggests phenolic compounds are good antioxidants. Moreover, there is an appreciable negative correlation between TFC and CTC suggesting an opposed variation. PCA also allowed gaining an overview of the similarities and differences between shapes, sites, and harvest months. The distance between two samples on a biplot is directly proportional to their degree of similarity or difference. Figure 2 showed that spherical galls harvested in August are situated at higher F1 values, which demonstrated their highest antioxidant activity. In Factor 2, semi-circular galls constituted a distinctive cluster characterized by high levels of TFC. However, this group had the highest  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (AIA) values indicating the lowest inhibitory activity. The sites could not be differentiated on plot. This result confirmed the finding that TPC, TFC, CTC, DPPH\*, FRAP, ABTS\* and AIA were non-significantly affected by the factor site.

Figure 3 represents the vectors of the variables (TTC, TSC, DPPH\* of UF, DPPH\* of CO, AIA of UF, and AIA of CO) of all the studied samples on the bidimensional space formed by rotated F1 and F2. The first two principal components explained 73.93% of the total data variance, of which 43.93% was along the first principal component (F1), and 30.00% was along the second one (F2). By examining the scatter plots, the results showed that the variables, such as DPPH free radical-scavenging ability by unsaponifiable fractions and crude oils, TTC and TSC are situated in the upper side of the plot (F1). The

DPPH free radical-scavenging capacity were related to TTC and TSC. Thereby, it was clear that TTC and TSC were effective antioxidant. In F2, spherical galls presented high values of AIA indicating the lowest inhibitory activity. However, the samples who are situated at the lower side of the plot, indicate the highest inhibitory activity.

## 4 | CONCLUSION

In the present work, the methanolic and lipid extracts of *Pistacia atlantica* galls revealed that they not only possess antioxidant activity through free radical-scavenging and reducing power but also an inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase. Indeed, it was shown that the methanolic extracts from *P. atlantica* galls contain a considerable amount of phenolic compounds, in particular condensed tannins and that the shape of the galls has been a significant influence on the content of flavonoids and condensed tannins. In addition, the correlation observed between the results of AIA and condensed tannin contents indicated that these compounds are the predominant sources of inhibitory capacity.

Also, this study was the first to analyze and to compare the antioxidant and antihyperglycemic activities of the crude oils and unsaponifiable fractions of *P. atlantica* galls. The results obtained showed that the extracts have significant inhibitory effects but much less for antioxidant activity. The fatty acid composition of the oils revealed a diversity, containing saturated fatty acids (SFA) such as palmitic acid (C16:0) but also unsaturated fatty acids (MUFA and PUFA) such as: oleic acids (C18:1) and linoleic acids (C18:2). The presence of tocopherols and phytosterols in *Pistacia atlantica* galls conferred nutritional value and a possibility of reducing cholesterolemia. Further studies may be taken up on the knowledge of the compounds responsible for these beneficial properties.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest for this article.

## ORCID

Fatiha Hefied  <https://orcid.org/0000-0001-5006-4764>

Mohamed Yousfi  <https://orcid.org/0000-0003-3947-9867>

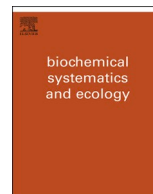
## REFERENCES

- Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2014). *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.02.001>
- Abrahamson, W. G., McCrea, K. D., Whitwell, A. J., & Vernieri, L. A. (1991). The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19(8), 615–622. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(91\)90077-D](https://doi.org/10.1016/0305-1978(91)90077-D)
- Ahmad, Z., Zamhuri, K. F., Yaacob, A., Siong, C. H., Selvarajah, M., Ismail, A., & Hakim, M. N. (2012). *In vitro* anti-diabetic activities and chemical analysis of polypeptide-k and oil isolated from seeds of *Momordica charantia* (bitter melon). *Molecules*, 17(8), 9631–9640. <https://doi.org/10.3390/molecules17089631>
- Ahmed, I. A., Mikail, M. A., bin Ibrahim, M., bin Hazali, N., Rasad, M. S. B. A., Ghani, R. A., Wahab, R. A., Arief, S. J., & Yahya, M. N. A. (2015). Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food Chemistry*, 172, 778–787. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.122>
- Basri, D. F., & Fan, S. H. (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian Journal of Pharmacology*, 37, 26–29. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.13851>
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaeger, B., Demeyer, K., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2016). Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchemical Journal*, 128, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.023>
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaeger, B., Demeyer, K., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2017). Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1185–1194. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1291690>
- Benabid, A. (2000). *Flore et écosystèmes du Maroc: Evaluation et préservation de la biodiversité*. Paris, France: Librairie et éditions Kalila Wa Dimna.
- Bentireche, F., Guenane, H., & Yousfi, M. (2019). Fatty acids, the unsaponifiable matter, and polyphenols as criteria to distinguish *Pistacia atlantica* unripe fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(8), 903–910. <https://doi.org/10.1002/aocs.12209>
- 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(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhutkar, M. A., Bhinge, S. D., Randive, D. S., Wadkar, G. H., & Todkar, S. S. (2018). *In vitro* studies on alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Modern applications in Pharmacy & Pharmacology*, 1, 1–5. <https://doi.org/10.31031/MAPP.2018.01.000518>
- Boussoussa, H., Hamia, C., Djeridane, A., Boudjeniba, M., & Yousfi, M. (2014). Effect of different solvent polarity on extraction of phenolic compounds from Algerian *Rhanterium adpressum* flowers and their antimicrobial and antioxidant activities. *Current Chemical Biology*, 8(1), 43–50.
- Boussoussa, H., Khacheba, I., Berramdane, T., Maamri, A., Bendahgane, H., & Yousfi, M. (2018). *In vitro* antidiabetic effect of saponins and phenolic extracts from fruits and seeds of Algerian cypress tree: *Cupressus sempervirens* L. *Current Enzyme Inhibition*, 14(2), 92–96. <https://doi.org/10.2174/1573408014666180115153812>
- Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(9), 788–794. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290908>
- Burke, R. W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, R. A., & Menis, O. (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(7), 794–801. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.7.794>
- Chen, I.-C., Chang, H.-C., Yang, H.-W., & Chen, G.-L. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: A fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(1), 29–33.
- Cherbi, R., Saidi, M., Yousfi, M., & Rahmani, Z. (2016). Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds extracts of *Lawsonia alba* (henna) from Algeria. *Der Pharma Chemica*, 8(11), 216–221.
- Chevalier, A. (1923). Les Galles de Chine et leur origine. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 3(24), 513–522. <https://doi.org/10.3406/jatba.1923.4093>

- Chung, Y.-C., Chien, C.-T., Teng, K.-Y., & Chou, S.-T. (2006). Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food Chemistry*, 97(3), 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.019>
- Chupin, L., Motillon, C., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., & Charrier, B. (2013). Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. *Industrial Crops and Products*, 49, 897–903. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.045>
- Conforti, F., Statti, G., Loizzo, M. R., Sacchetti, G., Poli, F., & Menichini, F. (2005). *In vitro* antioxidant effect and inhibition of  $\alpha$ -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(6), 1098–1102. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1098>
- Dauphin, P. (2012). *Guide des galls de France et d'Europe*. Belin.
- Delattre, J., Gardès, M., & Jore, D. (2001). Stress oxydant et diabète sucré. *Journal de la Société de Biologie*, 195(4), 375–376. <https://doi.org/10.1051/jbio/2001195040375>
- Djeridane, A., Hamdi, A., Bensania, W., Cheifa, K., Lakhdari, I., & Yousfi, M. (2015). The *in vitro* evaluation of antioxidative activity,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.10.007>
- Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2014). Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts. *Food Chemistry*, 153, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.072>
- Duh, P.-D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455–461.
- Emmerie, A., & Engel, C. (1938). Colorimetric determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 57(12), 1351–1355. <https://doi.org/10.1002/recl.19380571207>
- Fernandes, P., & Cabral, J. M. S. (2007). Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98(12), 2335–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>
- Firdaus, M., Nurdiani, R., & Prihanto, A. A. (2015). Antihyperglycemic of *Sargassum* sp. extract. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, 2, 381–394. <https://doi.org/10.1002/9783527679577.ch24>
- Generalić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S. S., Ljubenkov, I., Katalinić, A., Šimat, V., & Katalinić, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 9(2), 441–457. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100219>
- Gonçalves, R., Mateus, N., & De Freitas, V. (2011). Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, 125(2), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.061>
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., & Gaydou, E. (2010). Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(2), 157–166. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1481-5>
- Gourine, N., Yousfi, M., Nadjemi, B., & Bombarda, I. (2009). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of leaves of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 21(2), 1249–1257.
- Guenane, H. (2017). *Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du Pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.)* (PhD thesis). KASDI Merbah-Ouargla, Ouargla, Algeria.
- Harrat, M., Benalia, M., Gourine, N., & Yousfi, M. (2018). Variability of the chemical compositions of fatty acids, tocopherols and lipids antioxidant activities, obtained from the leaves of *Pistacia lentiscus* L. growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 11(2), 199–215. <https://doi.org/10.3233/MNM-18198>
- Hashemnia, M., Nikousefat, Z., & Yazdani-Rostam, M. (2015). Antidiabetic effect of *Pistacia atlantica* and *Amygdalus scoparia* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology*, 24(6), 1301–1306. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2068-1>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., & Yousfi, M. (2017).  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plant traditionally used in Algeria for diabetes. *Current Enzyme Inhibition*, 13(1), 67–78.
- Khacheba, I., Djeridane, A., Kameli, A., & Yousfi, M. (2014). The inhibitory effect of some algerian plants phenolics extracts on the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities and their antioxidant activities. *Current Enzyme Inhibition*, 10(1), 59–67.
- Lawrence, G. D. (2013). Dietary fats and health: Dietary recommendations in the context of scientific evidence. *Advances in Nutrition*, 4(3), 294–302. <https://doi.org/10.3945/an.113.003657>
- Maamri, S. (2008). *Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud Algérie: Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens* (thesis). Consulté À L'adresse. <http://192.168.100.2:8080/handle/123456789/125>
- Mamun-or-Rashid, A. N. M., Hossain, M. S., Hassan, N., Dash, B. K., Sapon, M. A., & Sen, M. K. (2014). A review on medicinal plants with antidiabetic activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 149–159.
- Masunda, T. A., Mbala, M. B., Kayembe, S. J., Longoma, B. F., Ngbolua, K. N., Tshibangu, D. S. T., & Mpiana, P. T. (2014). Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild. (Arecaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(6), 2441–2451. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i6.7>
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146–1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>
- Nagappan, H., Pee, P. P., Kee, S. H. Y., Ow, J. T., Yan, S. W., Chew, L. Y., & Kong, K. W. (2017). Malaysian brown seaweeds *Sargassum siliquosum* and *Sargassum polycystum* : Low density lipoprotein (LDL) oxidation, angiotensin converting enzyme (ACE),  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition activities. *Food Research International*, 99, 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.023>
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12871–12890. <https://doi.org/10.3390/ijms160612871>
- Peksel, A., Arisan-Atac, I., & Yanardag, R. (2010). Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia Atlantica* Desf. leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 451–476. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00290.x>
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A.-M. (2000). Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939–966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)
- Rajopadhye, A. A., Upadhye, A. S., Dandge, C. N., & Naik, D. G. (2016). Essential oil from leaf galls on *Pistacia chinensis* ssp. *integerrima*: Chemical composition, *in vitro* and *in vivo* antioxidant and hepatoprotective activity. *TEOP*, 19(7), 1648–1659.
- Rand, K., Bar, E., Ben-Ari, M., Lewinsohn, E., & Inbar, M. (2014). The mono- and sesquiterpene content of aphid-induced galls on *Pistacia palaestina* is not a simple reflection of their composition in intact leaves.

- Journal of Chemical Ecology*, 40(6), 632–642. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0462-9>
- Rhazi, N. (2015). *Mise au point de mélanges collants écologiques à partir des écorces d'Acacia mollissima du Maroc* (Thesis, Pau). Consulté à l'adresse. <http://www.theses.fr/2015PAUU3049>
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012).  $\alpha$ -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141–183. <https://doi.org/10.18433/J35S3K>
- Sama, K., Murugesan, K., & Sivaraj, R. (2012). *In vitro* alpha amylase and alpha glucosidase inhibition activity of crude ethanol extract of *Cissampelos* *arnottiana*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(4), 550–553.
- Shad, M. A., Pervez, H., Zafar, Z. I., Nawaz, H., & Khan, H. (2012). Physicochemical properties, fatty acid profile and antioxidant activity of peanut oil. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1), 435–440.
- Sifi, I., Dzoyem, J. P., Ouinten, M., Yousfi, M., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2015). Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3), 150–155.
- Tahar, S. B., Hadj-Mahammed, M., & Yousfi, M. (2015). Etude de l'Activité Antioxydante des Extraits Phénoliques de l'*Atriplex Halimus* L et de l'*Haloxylon Scoparium* Pomel du Sahara Septentrional. *Ḥawliyyāt al-'Ulūm wa-al-Tiknūlūjiyyā*, 281(5389), 1–10.
- Telli, A. (2017). *Activités anti-oxydante, antimicrobienne et antidiabétique de deux espèces spontanées utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Ouargla: Amodaucus leucotrichus et Anvillea radiata* (PhD thesis). KASDI Merbah-Ouargla.
- Toul, F., Belyagoubi-Benhammou, N., Zitouni, A., & Atik-Bekkara, F. (2017). Antioxidant activity and phenolic profile of different organs of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Natural Product Research*, 31(6), 718–723.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). Isolation and identification of phenolic compounds. In W. Vermerris & R. Nicholson (Éds.), *Phenolic compound biochemistry* (pp. 151–196). Dordrecht: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_4)
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>

**How to cite this article:** Hefied F, Ben Ahmed Z, Yousfi M. In vitro antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of methanolic and lipid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. galls. *J Food Process Preserv*. 2020;00:e14956. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14956>



## Study of the antioxidant activity of *Pistacia atlantica* Desf. Gall extracts and evaluation of the responsible compounds

Ziyad Ben Ahmed<sup>a,b,\*</sup>, Fatiha Hefied<sup>b</sup>, Mohamed Yousfi<sup>a</sup>, Kristiaan Demeyer<sup>c</sup>,  
Yvan Vander Heyden<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Fundamental Science, University Amar Telidji, Laghouat, Algeria

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Applied Chemometrics and Molecular Modelling, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium

<sup>c</sup> Department of Toxicology, Dermato-Cosmetology and Pharmacognosy, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Pistacia atlantica* galls  
Anacardiaceae  
Chromatographic fingerprinting  
Partial least squares regression  
Antioxidant activity

### ABSTRACT

Defensive gall traits against natural enemies, such as predators and parasitoids, attracted much attention of ecologists and evolutionary biologists. To our knowledge, naturally occurring antioxidant compounds present in *Pistacia atlantica* Desf. Galls have not yet been reported and characterized. The objective of this study is to evaluate the effects of the harvest period and plant gender on these antioxidant activities. Furthermore, peaks present in chromatographic fingerprints, probably showing significant antioxidant activities, were identified. Three antioxidant assays, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2 azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging besides the ferric reducing antioxidant power (FRAP), were applied to determine the total antioxidant activity in galls from both genders of *Pistacia atlantica*. Fingerprints of ten *P. atlantica* gall extracts were obtained by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). Extensive pre-treatment of the data and a linear multivariate calibration technique, Partial Least Squares (PLS), were used for model construction. Our findings highlighted that gender and harvest period affected the antioxidant activities. Major peaks, potentially influencing the antioxidant activity of the samples, were indicated by studying the regression coefficients of the PLS models. Individual antioxidant compounds of *P. atlantica* galls were identified by UPLC coupled to a hybrid quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF/MS). The phenolic compounds methyl gallate and valoneic acid dilactone were considered to be important antioxidants in the FRAP and scavenging ABTS assays, while quinic acid showed to be the main component influencing the antioxidant activity measured with the DPPH method. The findings of the present study suggest that *P. atlantica* gall might be used as an accessible source of natural antioxidants and for the treatment of diseases resulting from oxidative stress.

### 1. Introduction

Galls result from abnormal plant growth induced by various parasitic organisms, mainly insects. They are considered neoformed plant organs developed from cellular hypertrophy, tissue hyperplasia and cellular redifferentiation of the host tissues (Oliveira et al., 2016). Many herbivorous insects induce galls on various plant organs, such as leaves, shoots and flowers (Inbar et al., 2010). Gall initiation starts with the recognition of reactive plant tissues to gall inducers, with subsequent feeding and/or oviposition triggering a cascade of events (Oliveira et al., 2016). The induction of galls represents both an adaptation of the insect to the host plant, and of the plant to the insect (Miller and Raman, 2019).

Ananthakrishnan (1998) reported that galls originally were considered as a mechanism of defense developed by insects against attacks by their natural enemies. Moreover, the main function of the gall is to give shelter and food to the larvae of the galling insect. However, host plant growth and metabolism are altered under the influence of the associated parasites, leading to the production of secondary metabolites. These may provide a defensive role against the behavior of non-gall-inducing (free-living) insects, particularly in their nutritional physiology and population dynamics (War et al., 2012).

*Pistacia atlantica* Desf. belongs to the Anacardiaceae family and naturally occurs from the Mediterranean basin to central Asia, especially in Iran, Turkey, Iraq and Saudi Arabia. It is a dominant tree in its natural

\* Corresponding author. University Amar Telidji-Laghouat, Laboratory of Fundamental Science, BP37G, Laghouat, Algeria.

E-mail addresses: [z.benahmed@lagh-univ.dz](mailto:z.benahmed@lagh-univ.dz), [Ziyad.Ben.Ahmed@vub.be](mailto:Ziyad.Ben.Ahmed@vub.be) (Z. Ben Ahmed).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104358>

Received 9 July 2021; Received in revised form 27 October 2021; Accepted 13 November 2021

Available online 16 November 2021

0305-1978/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

areas, and plays an important economic role in these regions (Ben Ahmed et al., 2021). Leaves are imparipinnate with five to nine leaflets, lanceolate, 26–70 mm long and 8–22 mm wide. Petioles are winged. Panicles are extra-axillaries, 7–15 cm long (Ben Ahmed et al., 2020a).

*P. atlantica* develops leaf galls due to insect attacks, especially aphids and chalcid wasps (Mehrejjad, 2010). The aphids manipulate the leaves and buds to form tumorous galls, lodging their larvae for food and safety. Common aphid species are *Slavum wertheimae* and *Baizongia pistaciae* L. (Rostás et al., 2013). In Algeria, the galls of *P. atlantica* Desf. are used as an embalming agent by rural inhabitants. They are also known in Arabia as 'afse', are edible and sold in markets (Sifi et al., 2015).

Accordingly, galled tissue was found to contain higher levels of defensive secondary metabolites than ungalled plant tissues (Yoram and Inbar, 2011). It is reasonable to expect that accumulation of such metabolites in the galls provides multilevel protection against variable natural enemies, but their role in protection against pathogens infection received little attention (Yoram and Inbar, 2011).

In recent years, natural antioxidants from herbal sources receive a great deal of attention because of their prominent role in the control or prevention of oxidation processes and associated diseases (Giampieri et al., 2019). Extracts from plant material may be rich in phenolics and provide a good alternative to synthetic antioxidants (Shah et al., 2014). Grape seed (*Vitis vinifera* L.), green tea (*Camellia sinensis* L.), pine bark (*Pinus maritima* Mill.), rosemary (*Salvia rosmarinus* Schleid.), pomegranate (*Punica granatum* L.), nettle (*Urtica dioica* L.) and cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl.) have exhibited similar or better antioxidant properties than some synthetic compounds (Shah et al., 2014). A systematic assay of the antioxidant capacities of eighteen Algerian medicinal plants, associated with antidiabetic activities, was conducted earlier in our laboratory (Khacheba et al., 2017). Fifteen Indian medicinal plants, commonly used in Ayurveda, were reviewed with respect to their antioxidant capacities in Govindarajan et al. (2005).

*P. atlantica* Desf. is known as an excellent source of natural antioxidants and contributes to the daily antioxidant diet in the Maghreb countries (Tunisia, Algeria and Morocco) (Ben Ahmed et al., 2017, 2018). In this regard, many studies have evaluated the antioxidant potential of bark, leave, root and fruit extracts from *P. atlantica*. Furthermore, Benmahieddine et al. (2021) have shown that most of the phytochemicals as well as antioxidant and antimicrobial activities of 34 extracts prepared from *Pistacia atlantica* Desf. according to gender and organ type (roots, buds and fruits), are produced in response to environmental disturbances and stimulations. The growth parameters of *Pistacia atlantica* Desf. under different soil conditions (pure forest soil, sandy soil, nursery soil and mixed forest soil) in Iran were investigated by Rezaeyan et al. (2009). The height, vitality, leaf number, collar diameter, survival, stem length, root length, stem: root length ratio and stem: root dry weight ratio of *P. atlantica* Desf. seedlings were measured. This study revealed that the forest soil had better effects on the vegetative parameters of *Pistacia atlantica* Desf. seedlings. In addition, Hatamnia et al. (2014) studied the influence of genotype factor on the phenolic profile as well as on potential antioxidant activity in hulls, shells and kernels of different genotypes of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* fruits. The results indicated that there is a correlation between total phenolic content and antioxidant activity. Hull extract with higher total phenolic content had higher antioxidant activities than the other fruit parts.

To the best of our knowledge, data related to the free radicals scavenging capacity of *P. atlantica* Desf. Gall extracts are not available in the literature. Additionally, their chemical profiles, as determined by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to a hybrid quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer (UPLC-Q-TOF/MS), were not reported so far in the literature. This study aimed to evaluate the effects of harvest month and gender on the antioxidant activity of *P. atlantica* Desf. Galls. Secondly, combining the information from the antioxidant assays with the UPLC fingerprints, applying data-handling

tools, allows indicating the peaks potentially responsible for a given activity (Klein-Júnior et al., 2016). The antioxidant activity of a sample can be determined accurately by applying two methods to reflect and differentiate both single electron transfer (SET, radical reducing) and hydrogen atom transfer (HAT, radical quenching). The present study used three assays, i.e. the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, the 2,2 azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP), representing the main methods to measure the antioxidant properties (Ben Ahmed et al., 2020b). Important compounds, contributing to the antioxidant properties were indicated on the UPLC fingerprints applying a linear multivariate calibration technique, Partial Least Squares regression (PLS). The peaks potentially responsible for the antioxidant activity of the samples were indicated by studying the regression coefficients of the models. Furthermore qualitative analyses were performed by UPLC-Q-TOF/MS in order to identify the most relevant components responsible for the antioxidant activity.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The chemical profiles of plant tissues are known to be affected by many factors, such as genotype, environment, growth stage, time of harvesting, processing and storage conditions, as well as the method of analysis (Zargoosh et al., 2019). We hypothesize that seasonal variations provoke changes in the active secondary metabolites composition in *P. atlantica* galls, affecting their antioxidant activity. Therefore, there is a need to establish the changes in phytochemical contents along with the antioxidant activities of *P. atlantica* galls as a function of biotic and abiotic factors. For this reason, galls from male ( $n = 5$ ) and female ( $n = 5$ ) *P. atlantica* Desf. trees were collected periodically in the middle of each month, starting in July and ending November 2010. Trees with a similar age were sampled from the Laghouat region, located at 400 km south of Algiers, Algeria. The location of Laghouat (latitude 33° 47' (N); longitude 02° 52' (E); altitude 750m) is characterized by an annual precipitation of 18 mm, an average summer temperature of 41.4 °C and clay soil type, locally known as "Daya". The soil is composed of tiny particles that are hard and become easily impacted.

Galls of one gender (collected from five randomly selected trees) were carefully mixed, dried and cleaned to remove insects and eggs and then smashed manually, before storing them in polyethylene bags at ambient temperature in the dark until use.

The identity of the gall samples was confirmed by Prof. S. Belhadj (Department of Agropastoralism, Faculty of Science, Achour Zian University, Djelfa, Algeria), and a voucher specimen (GLO32010ULDB) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, Faculty of Science, University of Laghouat (Algeria).

### 2.2. Sample preparation

The crude extract of *P. atlantica* galls was prepared according to the method described by Hefied et al. (2020). 2.0 g *P. atlantica* galls powder was macerated in 40 mL methanol in the dark for 48 h at room temperature. The crude extract was filtered and the residue re-extracted with 30 mL of the same solvent for 24 h, and again filtered. The filtrates were combined and the methanol was removed by using a rotary evaporator at 45 °C. The final residue was dried, redissolved in 10.0 mL pure methanol and kept at 6 °C until analysis.

### 2.3. Evaluation of antioxidant activity

#### 2.3.1. DPPH assay

The DPPH assay was performed according to a previous study by Du et al. (2014). Methanolic DPPH<sup>•</sup> solution (250 μM) was prepared daily. Then, 1 mL of a 1:12000 diluted extract in methanol was mixed with 1

mL DPPH solution and incubated for 30 min in the dark covered with alumina foil. Immediately after mixing, at time  $t = 0$  min ( $t_0$ ), and after 30 min, the absorbances at 517 nm were measured. A standard curve was prepared by determining the decrease in absorbance of the DPPH radical solution over a period of 30 min with different concentrations of ascorbic acid (2.5–9  $\mu\text{g/mL}$ ). The DPPH radical scavenging activity (RSA) was defined as ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAEAC) and expressed as mg ascorbic acid equivalents per g dry gall weight (Leong and Shui, 2002). AAEAC was calculated using the following equation (1):

$$\text{AAEAC} = (\Delta A_{\text{sample}} / K) \times D \times V \times (1/W_{\text{sample}}) \quad (1)$$

where  $\Delta A_{\text{sample}}$  is the change in absorbance in the presence of extract,  $K$  the slope of the standard curve,  $D$  the dilution factor of the extract (12,000),  $V$  the total extract volume (10 mL) and  $W_{\text{sample}}$  the sample weight used for extraction (g). Each sample was prepared in triplicate and the mean value calculated.

### 2.3.2. FRAP assay

The ferric reducing antioxidant power assay was applied according to the method described in Hefied et al. (2020). The FRAP reagent was prepared by mixing 10 mL of acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 1 mL TPTZ (10 mM (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) in HCl (40 mM) and 1 mL  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). 50  $\mu\text{L}$  extract was added to 1 mL of FRAP reagent. The mixture was incubated at 37 °C for 20 min and the absorbance measured at 596 nm. The reducing power activity was calculated from a standard curve, based on a set of ascorbic acid solutions (10–100  $\mu\text{g/mL}$ ). Results were reported as AAEAC (Eq (1)) and expressed as mg of ascorbic acid equivalents per g of dry gall weight. Each sample was prepared in triplicate and the mean AAEAC result calculated.

### 2.3.3. ABTS assay

The antioxidant activity was also determined using the ABTS<sup>•+</sup> method described in Hefied et al., (2020). Free radicals are generated by an enzymatic system consisting of the horseradish peroxidase enzyme, its oxidant substrate (hydrogen peroxide) and the ABTS chromophore. The final reagent contained 1 mL ABTS (20 mM), 1 mL of horseradish peroxidase (0.2 mg/mL) prepared in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9 with 0.006 M sodium chloride and 150  $\mu\text{L}$  hydrogen peroxide (1 mM). Consecutively, 100  $\mu\text{L}$  sample was mixed with 1 mL ABTS<sup>•+</sup> radical cation and incubated for 10 min in the dark covered with alumina foil. Immediately after mixing, at time  $t = 0$  min ( $t_0$ ), and after 10 min, the absorbances at 417 nm were measured. A standard curve was prepared, by determining the decrease in absorbance of the ABTS radical solution over a period of 10 min, with different ascorbic acid concentrations (4–16  $\mu\text{g/mL}$ ). The ABTS radical scavenging activity was defined as AAEAC (eqn (1)) and expressed as mg ascorbic acid equivalents per g dry gall weight. Each sample was prepared in triplicate and the mean AAEAC result calculated.

## 2.4. Development of UPLC fingerprints

The chromatographic conditions developed in Hamdi et al. (2018) were applied. A Waters Acquity UPLC I-Class chromatograph equipped with a binary pump, in-line degasser, autosampler, column oven and photodiode array (PDA) detector was coupled to a Waters ESI-QTOF tandem mass spectrometer. A 50 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 1.7  $\mu\text{m}$ , Acquity BEH C18 UPLC<sup>R</sup> column, conditioned at 40 °C, was used. Separation was performed at a flow rate of 0.3 mL/min with a mobile phase consisting of formic acid 0.1% (A) and methanol (B) in the following gradient: 0 min, 15% (B); 5 min, 30% (B); 10 min, 40% (B); 14 min, 45% (B); 16 min, 45% (B); 20 min, 55% (B); 25 min, 100% (B). A 2  $\mu\text{L}$  aliquot of the samples was injected and the UV detection performed at 254 nm. The solutions were freshly prepared in methanol before injection and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose regenerated membrane filter. Data was

processed using Waters Empower<sup>TM</sup> software.

### 2.4.1. MS conditions

The mass spectrometry was performed on a Waters definition accurate mass quadrupole time-of-flight (Q-TOF) XevoG2-S mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The mass spectrometer was operated in negative mode. The conditions for the ESI source were as follows: a cone voltage of 40 V; capillary voltage of 3 kV, source temperature 120 °C; desolvation gas temperature 450 °C and flow rate 800 L/h. Sample analysis was done by data independent acquisition MS<sup>E</sup> (where E represents collision energy) using full scan mode from  $m/z$  50 to 1200, with 1 s scan time. Acquisition of mass spectral data was accomplished in two continuous functions. In the first, precursor data were collected without collision energy in MS mode and in the second, the MS<sup>E</sup> function, the precursor ions were further fragmented using high collision energy ramped from 15 to 35 eV. For accurate mass measurements, data were centroided during acquisition, and 200  $\mu\text{g/mL}$  of leucine-enkephalin dissolved in acetonitrile/0.1% formic acid (50:50, v/v), was infused continuously as an external reference into the ESI source. Leucine-enkephalin ( $m/z$  556.2771) was used as a reference lock-mass compound, with automatic mass correction enabled. The data were processed using MassLynx<sup>TM</sup>4.1 software with MS<sup>E</sup> program. The MassLynx software was used to identify and retrieve the chemical compounds in the *P. atlantica* galls. It suggests the molecular formula of the parent mass ion based on the elemental composition. A search of the major fragment ions in the MS spectra of potential compounds was performed using metabolome databases, including MASS bank (<http://www.massbank.jp/>), METLIN (<https://metlin.scripps.edu/>), and the human metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>).

## 2.5. Data analysis

UPLC-DAD data of ten *P. atlantica* gall samples imported in Matlab 2013b (The Mathworks, Natick, MA), which was used for the data (pre) processing. The chromatograms were equalized in length to 11501 time points. All metabolic profiles are organized in an  $n \times p$  matrix X, with  $n$  fingerprints constituting the rows and  $p$  data points per fingerprint, constituting the columns. First, correlation optimized warping (COW) algorithm was applied to align the peaks and to correct for retention time shifts between the different samples (Klein-Júnior et al., 2016). It is segmented data processing method, aiming to align the peaks in a sample chromatogram to those in the corresponding segment of the target chromatogram (T). The latter was selected as that with the highest correlation to all chromatograms in the sample set. At the start of the procedure, the profile to be aligned (P) and the target profile (T) are cut into a user-specified number of sections (N) with equal length (L). Each section is aligned accordingly to a shift of the section's end point by a maximal limit, defined as the slack parameter  $t$ , allowing the sections end points to shift from  $-t$  to  $+t$  points. The start and end points of the chromatograms are fixed in the COW algorithm, therefore the first and last segments can only be warped on the right and left ends, respectively. The optimal combination of the L warped sections is considered the optimal alignment, resulting in the aligned chromatogram (P) (Vest Nielsen et al., 1998). The correlation coefficients (CC) are calculated (eqn. (2)) for each permutation of adding or removing data points (Kumar, 2017). A more detailed description of the COW method can be found in (Vest Nielsen et al., 1998).

$$CC = \frac{\text{cov}(\text{target} - \text{sample})}{\text{std}(\text{target})\text{std}(\text{sample})} \quad (2)$$

where cov indicates the covariance and std the standard derivation.

Useful information resides in the between-sample variation of the variables, not in their absolute values. Additional preprocessing approaches can be applied in order to remove interferences in the analysis. Column centering is a generally applied preprocessing technique, which

removes the column mean from each corresponding column element. A centered variable has a mean of zero (Klein-Júnior et al., 2016). Normalization methods aim to give the same weight to each variable by correcting for the intensity differences. It divides each row element by the absolute difference between the maximum and minimum intensities. The dataset is scaled so that each variable lies within a predefined range (i.e. between 0 and 1).

Finally, standard normal variate (SNV) transformation, used to remove slope variation, was also examined. SNV transforms the data by performing row centering, followed by row scaling, that is, dividing each row by its corresponding standard deviation (Ben Ahmed et al., 2020b).

### 2.5.1. Partial least squares (PLS)

PLS is a well-known multivariate regression technique to model an  $n \times 1$  response vector  $\mathbf{y}$  as a function of an  $n \times p$  data matrix  $\mathbf{X}$ . PLS models apply latent variables (LV) in  $\mathbf{X}$ , which maximize the covariance between  $\mathbf{X}$  and  $\mathbf{y}$  (Vest Nielsen et al., 1998). In our case, the  $\mathbf{X}$  matrix was composed of the pre-treated fingerprints, and the  $\mathbf{y}$  vector of the AAEAC values obtained by the DPPH, FRAP or ABTS assays.

The nonlinear iterative partial least squares (NIPALS) algorithm was used in the present study. The model can be written as follows (Ribeiro et al., 2009):

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} = \sum_{i=1}^A (\mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^T) \times \mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (3)$$

where  $\mathbf{b}$  is the regression coefficients vector that can be used to evaluate the contribution of the original variables,  $\mathbf{t}_i$  and  $\mathbf{p}_i$  are the scores and loading vectors,  $A$  is the number of latent variables and  $\mathbf{e}$  represents the residuals vector.

The optimal model complexity is determined by a leave-one-out cross-validation (LOO-CV) procedure. During LOO-CV each object is left out once and the model is built using the remaining objects (Tistaert et al., 2009). Then, the root mean squared error of cross-validation (RMSECV) (Eq. (4)) is computed for the PLS models with different numbers of latent variables. The model that has the optimal number of LVs is determined by selecting the simplest one which results in a low root mean squared error of CV (RMSECV) (Eq. (4)) from the graph of RMSECV versus number of LVs. The optimal complexity usually corresponds to the number of latent factors resulting in (nearly) the lowest RMSECV.

$$\text{RMSECV} (f) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(\hat{y}_{cv,i} - y_i)^2}{N}} \quad (4)$$

where  $f$  is the model complexity,  $N$  the number of calibration samples,  $y_i$  the measured response of the  $i$ th sample, and  $\hat{y}_{cv,i}$  the corresponding response predicted from the calibration model obtained without the  $i$ th sample.

### 2.6. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. Data were expressed as means  $\pm$  SD. One-way analyses of variance (ANOVA), followed by a Student-Newman Keuls (SNK) *post hoc*-test, were used to estimate the significance of the factors “harvest time” and “gender” on the antioxidant activities. Paired *t*-tests were used to compare the differences in the averages of AAEAC between harvest months and gender. Calculations were performed using SPSS (version 16, SPSS, 2007). All applied data (pre)processing methods (column centering, normalizing, SNV, and PLS) are performed using m-files written in Matlab 2013b (The Mathworks, Natick, MA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Antioxidant capacity

The presence of a radical scavenging activity is very important because of the deleterious effects of free radicals in biological systems (Yang et al., 2018). Diverse methods are currently used to assess the antioxidant activity in plant extracts (Chohra et al., 2020). Chemical assays are based on the ability to scavenge synthetic free radicals, using a variety of radical generating systems and methods (Köksal et al., 2009). The concept of a single test that might reflect total antioxidant capacity (TAC) is an attractive one. However, the analytical methods that allow the evaluation of the antioxidant capacity in a given sample act differently, taking into consideration that the natural antioxidants act by different mechanisms and even the same compound can have different ways of action (Chohra et al., 2020; Mandade et al., 2011). In this regard, no single assay can provide an accurate measurement because it does not reflect the complexity of the potential interactions of the antioxidants (Ben Ahmed et al., 2020b). Thus, the evaluation of the overall antioxidant capacity requires multiple assays in order to generate a representative antioxidant profile. Therefore, in the present study three methods (DPPH, FRAP and ABTS assays), based on different principles, were applied to determine the antioxidant capacity in the samples. The FRAP assay is based on single electron transfer, whereas the DPPH $^{\bullet}$  and ABTS $^{\bullet+}$  assays rely on the transfer of an electron or a hydrogen atom from the antioxidants to the radicals (Li et al., 2018). Expressing TAC as a function of standard antioxidants, such as ascorbic acid equivalents, enables to understand the potential of a sample plant extract relative to such antioxidants (Apak et al., 2016). This allows comparison of antioxidant activities from different plant parts and plant species. Ascorbic acid is extensively used in pharmaceuticals and its antioxidant activity is used in nutrition and therapy. The results of the different antioxidant assays used in the present investigation of the extracts were compared. As shown in Table 1, clearly different AAEAC values for a given sample were obtained by the three methods. The antioxidant activity of *P. atlantica* galls ranged from 122 to 227 mg AAE/g dry gall when measured by the DPPH assay, from 194 to 434 mg AAE/g dry gall when measured by the FRAP assay, and from 352 to 771 mg AAE/g dry gall when measured by the ABTS assay. The TAC values from ABTS $^{\bullet+}$  were higher than those from the DPPH $^{\bullet}$  and FRAP assays. This may result from the presence of antioxidants that more selectively interact with the fast reacting ABTS $^{\bullet+}$  radicals.

**Table 1**

The DPPH and ABTS scavenging activities, and the reducing power capacity (FRAP) of *P. atlantica* galls. Results are expressed as mg ascorbic acid equivalents (AAE)/g dry gall. Average and standard deviation of three determinations for each extract are reported.

Assay	Month	GLM	GLF
DPPH	July	227.0 <sup>b</sup> $\pm$ 17	132.1 $\pm$ 16
	August	224.7 <sup>b</sup> $\pm$ 23	159.1 $\pm$ 21
	September	203.9 <sup>b</sup> $\pm$ 18	126.0 $\pm$ 13
	October	183.1 <sup>b</sup> $\pm$ 14	147.5 $\pm$ 18
	November	129.1 <sup>a</sup> $\pm$ 20	122.3 $\pm$ 14
ABTS	July	512.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 48	488.3 $\pm$ 98
	August	485.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 55	366.2 <sup>a</sup> $\pm$ 65
	September	770.6 <sup>c</sup> $\pm$ 16	742.8 <sup>b</sup> $\pm$ 18
	October	399.7 <sup>a</sup> $\pm$ 95	352.3 <sup>a</sup> $\pm$ 81
	November	589.2 <sup>b</sup> $\pm$ 24	527.0 <sup>a</sup> $\pm$ 148
FRAP	July	270.1 <sup>b</sup> $\pm$ 24	274.9 <sup>b</sup> $\pm$ 31
	August	263.9 <sup>b</sup> $\pm$ 10	193.1 <sup>a</sup> $\pm$ 19
	September	433.9 <sup>c</sup> $\pm$ 13	299.3 <sup>b</sup> $\pm$ 19
	October	229.3 <sup>a</sup> $\pm$ 21	193.5 <sup>a</sup> $\pm$ 24
	November	283.0 <sup>b</sup> $\pm$ 16	276.2 <sup>b</sup> $\pm$ 5

Values in one column and for a given assay with the same superscript do not differ significantly according to the SNK *post-hoc* test. Superscripts a  $\rightarrow$  b  $\rightarrow$  c  $\rightarrow$  d: indicate increasing activities (increasing AAEAC). GLM: Lghouat male gall, GLF: Lghouat female gall.

### 3.2. Influence of harvest time and gender

The obtained results were further analyzed in order to evaluate possible influences of harvest time and gender. To our knowledge, there are no reports on the influence of these parameters on the total antioxidant activities of *P. atlantica* galls.

One-way ANOVA was performed for each gender, to evaluate the effect of the harvest month on the TAC. The results showed that only significant differences with the DPPH assay were found for the male galls ( $p < 0.0005$ ) over the considered period. To evaluate the differences in DPPH radical scavenging between months, within an observed profile, the Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test was applied (Table 1). For the male galls, the SNK test showed statistically significant differences in DPPH radical scavenging between two subgroups, i.e. with samples from (a) July till October and (b) November.

Furthermore, a paired *t*-test was performed on the monthly averages to evaluate systematic differences between male and female galls. The results showed that gender had a significant effect on antioxidant activity measured with the DPPH assay ( $p = 0.023$ ). It can therefore be concluded that DPPH radical scavenging profiles seem to be different in both genders.

The FRAP assay measures the antioxidant potential in samples through the reduction of ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) to ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) by antioxidants present in the samples. Monthly variations of the reducing power activity in *P. atlantica* galls are given in Table 1. A variation in the reducing power activity was observed between harvest time and occasionally gender. The male galls generally seem to show a higher reducing power capacity than the female. One-way ANOVA, revealed significant differences in reducing power between different harvest months and this for both genders ( $p < 0.0005$ ). In the male galls, the SNK post hoc test distinguished three subgroups, i.e. (a) one with samples from October, (b) one with samples from July–August and November, and (c) one with samples from September (Table 1). The SNK post-hoc test for the female galls identified a statistical difference in reducing power capacity between two subgroups, i.e. the samples from July, September and November were significantly higher than the samples from August and October. Generally, the FRAP results seem to go through a maximum in September.

The paired *t*-test did not show a statistically significant difference in reducing power capacity between both genders ( $p = 0.125$ ). Overall, findings suggest that the reducing power profile seems to be rather similar in both genders.

The ABTS assay is the most widely employed for estimating the antioxidant activity. The  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical is soluble in water and organic solvents, enabling the determination of the antioxidant capacity of both hydrophilic and lipophilic compounds. The results shown in Table 1 indicate that male galls tend to show a somewhat higher activity than female ones across the entire studied period. One-way ANOVA confirmed that these activities were significantly different over the months and this in the two galls types ( $p \leq 0.003$ ). The SNK post-hoc test for the male galls identified three subgroups i.e. (a) one with samples from July, August and October, (b) one with samples from July, August and November, and (c) one with samples from September. The results again go through a maximum in September.

On the other hand, the SNK test for the female galls identified statistically significant differences in  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  scavenging activity between two subgroups, i.e. (b) one with samples from September (again maximal activity), and (a) one with samples from the remaining months. The paired *t*-test on the monthly averages showed a significant difference in  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  scavenging activity between male and female galls ( $p = 0.031$ ).

Our results mainly confirm the presence of a seasonal trend in scavenging antiradical activity and reducing power capacity in the *P. atlantica* galls. Thus, both genders seem to have a maximum antioxidant activity in September, but later in the year, the activities decrease. Significant changes may be related directly to photo-oxidative stress occurring at given moments in the growing season. Similar to results

found in this study, Zargoosh et al. (2019) suggested earlier that most of the responsible phytochemicals are produced in response to external stimuli, such as light intensity, moisture stress, day and night temperatures, rainfall, drought and their duration. It is therefore possible that, depending on the harvest month, the content and presence of these bioactive compounds vary, in parallel with the presence or absence of the stimuli, resulting in a different antioxidant activity of the *P. atlantica* galls.

The male galls seem to have higher antioxidant activities than female and this for all assays (even where not significantly different). Differences in the antioxidant activities between both genders may be due to (i) differences in content and composition of bioactives, (ii) diversity in structural characteristics of antioxidants present, (iii) a synergism of bioactives with other components present in individual genders, and (iv) differences in kinetic behavior of potential antioxidants. In face of the obtained results, *P. atlantica* galls used in traditional medicine should be harvested in September in order to achieve maximal antioxidant activity.

In an earlier study (Ben Ahmed et al., 2016), the antioxidant capacity of the acetone/water (70:30, v/v) extract of the leaves of this species was evaluated by two methods, i.e. DPPH and reducing power capacity. The AAEAC were found to be  $467 \pm 114$  and  $509 \pm 30$  mg AAE  $\text{g}^{-1}$  dry leaf for DPPH and reducing power capacity, respectively. This leaf extract exhibited a higher antioxidant activity, than the methanolic gall extract. This difference may be due to various factors, among which the studied the plant parts (galls in our study vs leaves) and the extraction procedure.

A direct comparison with the data obtained in previous studies on the leaf galls of *Syzygium cumini*, *Quercus infectoria* and *Pistacia integerrima* (Eshwarappa et al., 2014; Kaur et al., 2008; Zahoor et al., 2018), is not possible, since the results are expressed differently, e.g.  $\text{IC}_{50}$  (concentration required for 50% inhibition of free radical) or percent inhibition or Trolox-equivalent antioxidant capacity.

### 3.3. Multivariate modelling of the antioxidant activity

Data preprocessing has a significant impact on the performance of the subsequently built supervised models (Klein-Júnior et al., 2016). Different data preprocessing techniques were performed on the raw data matrix prior to building multivariate calibration models. Aligning the peaks is usually recommended because retention time shifts between different runs in a chromatogram introduce uninformative variability in the data (Şahin et al., 2012). For this purpose, a warping technique, called correlation optimized warping (COW) was applied. In this preprocessing method, the target chromatogram was selected as the one with the highest mean Pearson's correlation coefficient with respect to all other chromatograms. For COW alignment the segment length *N* and slack size *t* were optimized by varying *N* from 120 to 180, and *t* from 40 to 80. The COW procedure resulted in well-aligned chromatograms showing a high correlation with the target chromatogram (mostly above 0.94) (Fig. 1). Visually, 5 peaks are identified as common peaks in the *P. atlantica* gall extracts.

In order to model the antioxidant activity of the samples, different combinations of other pre-treatments, such as column centering, normalization followed by column centering, and SNV transformation followed by column centering were applied to the aligned data.

The next step in the study was to model the data from the DPPH, FRAP and ABTS assays as a function of the chromatographic data. PLS models were built and their regression coefficients used to indicate in the fingerprints of the *P. atlantica* galls peaks responsible for the antioxidant activity.

For this particular data set, the best linear multivariate calibration model was obtained after SNV and column centering (Table 2).

Multivariate modelling of LC fingerprints does not require the quantification of specific compounds. Chromatograms were evaluated to determine whether specific regions or peaks were responsible for the

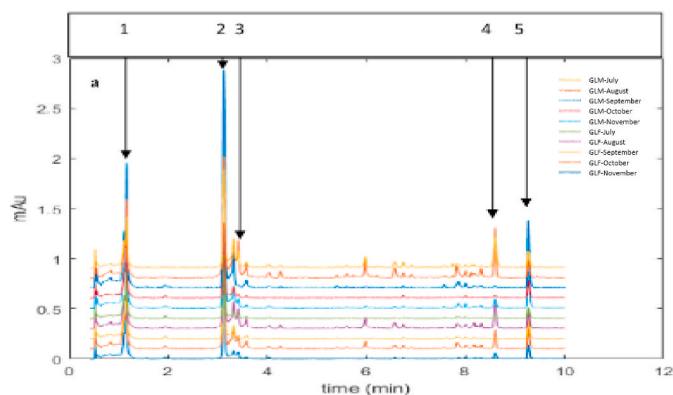


Fig. 1. Warped fingerprints of 10 *P. atlantica* extracts measured on the Acquity BEH C18 UPLC<sup>R</sup> column. Experimental conditions; see text.

Table 2

Model complexity (number of latent variables, # LV and RMSECV of the models for the antioxidant activities, build with the warped fingerprints using three preprocessing approaches.

Antioxidant activity	Preprocessing	# LV	RMSECV <sub>AAEAC</sub>
AAEAC <sub>DPPH</sub>	Column centering	3	41
	Normalization and column centering	4	99
	SNV and column centering	4	34
AAEAC <sub>ABTS</sub>	Column centering	4	89
	Normalization and column centering	3	110
	SNV and column centering	2	28
AAEAC <sub>FRAP</sub>	Column centering	3	79
	Normalization and column centering	3	145
	SNV and column centering	4	46

predicted total antioxidant capacity and could therefore be used as markers. Standard quantitative analysis of one or more major or active components (markers) in a herbal product does not represent its quality accurately as its efficacy usually results from multiple compounds and/or synergistic effects between constituents (Tistaert et al., 2009). It usually is also insufficient to identify straightforwardly a herbal sample. Because herbal products have such complex chemical profiles, minor differences between strongly related compounds could affect the health of individuals, even when these cannot be observed by normal quantitative analysis (Klein-Júnior et al., 2016).

As our study is based on only ten different samples, it is not possible to divide them in a calibration and test set to validate the predictive properties. Prediction of the antioxidant activity of new samples is, however, also not the primary goal of this study. The main focusing on the indication of antioxidant compounds from the modelling results. The optimal model complexity was determined from the calculated RMSECV obtained from a leave-one-out cross validation procedure (LOO-CV), for models with different numbers of PLS components. Generally, as the number of latent variables (model complexity) increases, the goodness of fit increases but not necessarily the predictive ability. Different numbers of LVs were examined for establishing the lowest RMSECV value related to the model with best predictive properties. The influence of the three preprocessing approaches on the antioxidant activity modelling was evaluated. The RMSECV's of the different best PLS models are given in Table 2.

### 3.4. Indication of antioxidant activity

In order to indicate the peaks in the fingerprints potentially

responsible for the antioxidant activity of the measured samples, for each model, the regression coefficients of the original variables were plotted as a function of time. Since the AAEAC<sub>DPPH</sub>, AAEAC<sub>FRAP</sub> and AAEAC<sub>ABTS</sub> values increase with an increase in antioxidant activity of the sample, the peaks associated with positive regression coefficients may correspond to chemical components improving the antioxidant activity of the samples (Figs. 2–4).

Regarding the scavenging of the DPPH free radical, the regression coefficients indicate that the compound associated with peak 1 (1.50 min) shows the highest positive value (Fig. 2).

The regression coefficients obtained with the FRAP and ABTS assays are plotted in Figs. 3 and 4. Here, 2 major positive peaks (2 and 5), eluting at 3.12 and 9.20 min, were found with a positive effect on the reducing power capacity (Fig. 4) and the scavenging ABTS<sup>•+</sup> radical activity (Fig. 3). Three peaks (1, 3, and 4) with negative regression coefficients were also indicated.

It is generally assumed that the ABTS and FRAP assays respond in a similar way towards antioxidants (Cerretani and Bendini, 2010). This is confirmed by our results and can be explained by the fact that the redox potential of ferric reduction (0.70 V) is comparable to that of ABTS<sup>•+</sup> (0.68 V) (Shivakumar and Yogendra, 2018). Therefore, compounds are expected to react in a similar way in both the FRAP and ABTS assays. On the other hand, component 1 shows a positive regression coefficient in the DPPH assay while negative values were found with both other assays. This indicates that this substance has a redox potential higher than 0.68 V (Ben Ahmed et al., 2020b).

The information obtained from Figs. 2–4 reveals also that *P. atlantica* gall extracts contain less antioxidants that react with DPPH (1 compound) than with FRAP and ABTS (2 compounds).

The DPPH method which can be used for solid or liquid samples is not only specific to particular antioxidants, compared to FRAP and

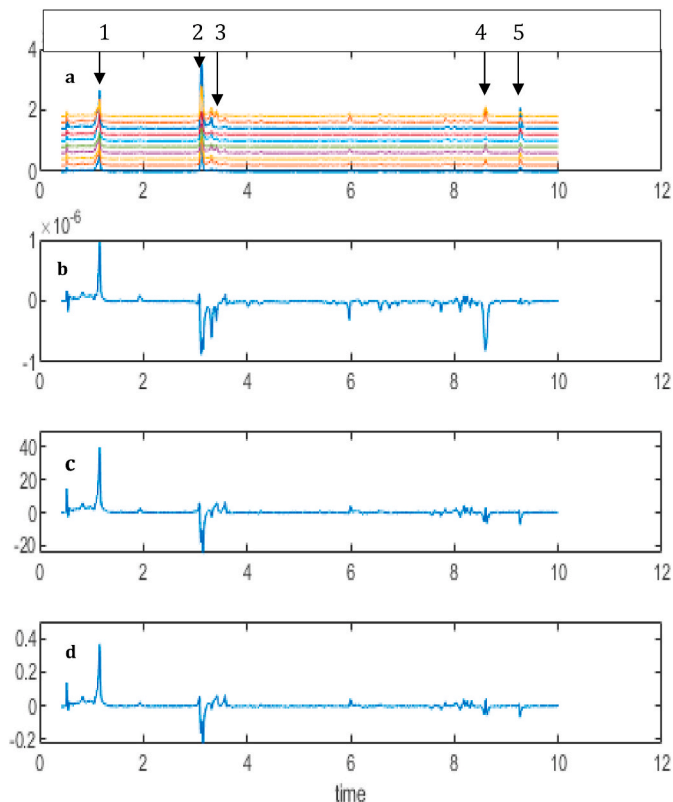
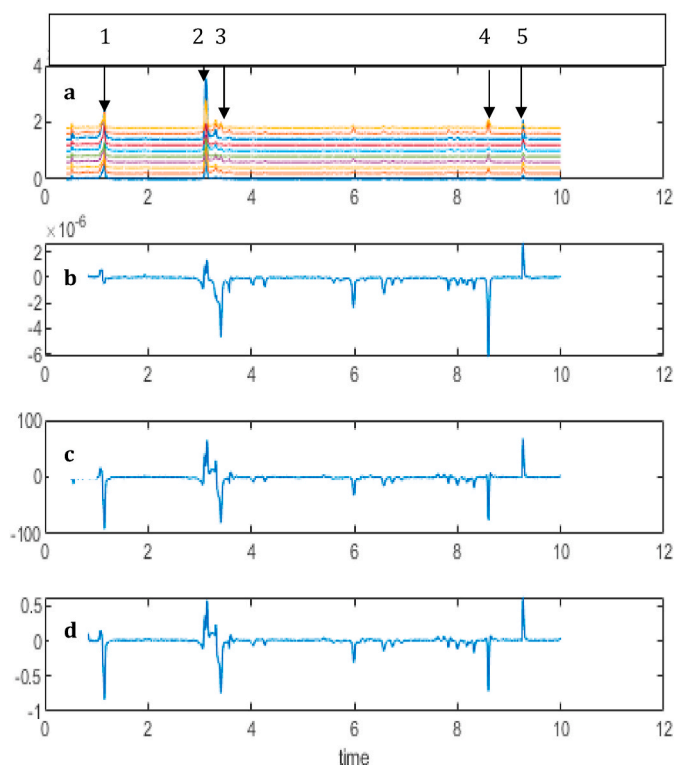


Fig. 2. Chromatograms (a) and regression coefficients of PLS models (b–d) for TAC<sub>DPPH</sub> of *P. atlantica* extracts. The regression coefficients of PLS after (b) column centering, (c) normalization and column centering, and (d) standard normal variate and column centering are shown.



**Fig. 3.** Chromatograms (a) and regression coefficients of PLS models (b–d) for TAC<sub>ABTS</sub> of *P. atlantica* extracts. The regression coefficients of PLS after (b) column centering, (c) normalization and column centering, and (d) standard normal variate and column centering are shown.

ABTS, but is also less sensitiveness towards hydrophilic antioxidants and its interaction with antioxidants depend on their structure, number of aromatic and hydroxyl groups, and on the distribution of these groups in the structure (Moniruzzaman et al., 2012).

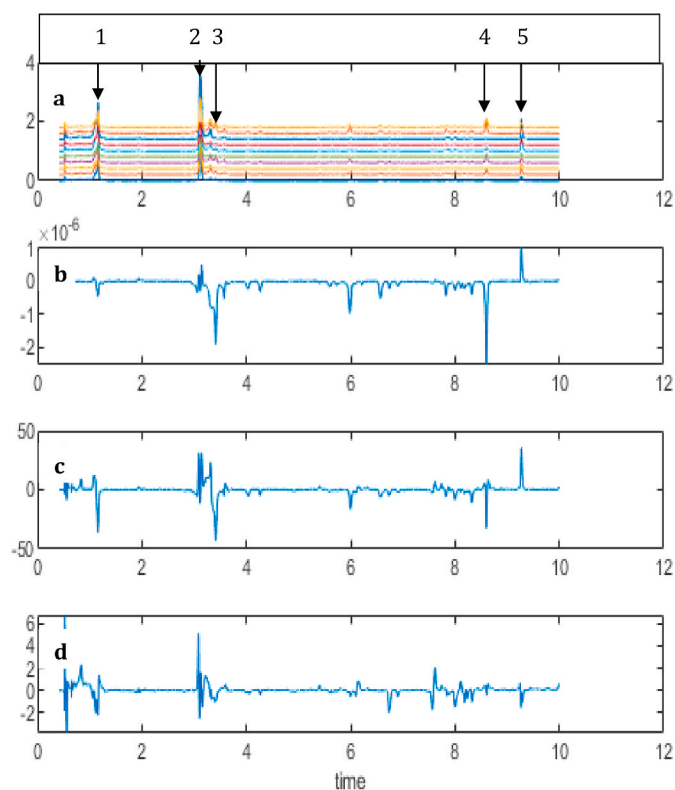
Natural antioxidants are often multifunctional and the activity and mechanism dominating in a particular test system depends on their chemical structure (Bastos et al., 2019). Therefore, the search for new compounds that inhibit free radicals, such as DPPH and ABTS, and that show strong ferric reducing antioxidant power as well is an interesting topic.

### 3.5. Tentative identification interesting compounds

A qualitative analysis of the natural antioxidants in the extracts from *P. atlantica* galls was performed by UPLC–DAD–ESI–QTOF–MS operated in negative ionization mode. Different collision energy values were applied to each of the constituents of interest in order to acquire mass spectra with various fragmentation degrees from the precursor ion and to obtain as much structural information as possible. The analytical data obtained for the examined compounds are listed in Table 3, including their retention times, UV absorption maxima and fragmentation pattern. The full scan spectrum of the ions is shown in Fig. 5.

**Compound 1.** showing a  $m/z$  of 191.0564 and supporting a molecular formula of  $C_7H_{12}O_6$ , was tentatively identified as quinic acid. The fragmentation pattern showed the presence of ions at  $m/z$  173  $[-H_2O]^-$ , 155  $[-2H_2O]^-$ , 127  $[-CH_4O_3]^-$  and 111  $[-CO_2-2H_2O]^-$ . The same fragmentation pattern was also observed by Bastos et al. (2019).

**Compound 2.** showing a  $m/z$  of 183.0298 and supporting a molecular formula  $C_8H_8O_5$ , was putatively identified as methyl gallate. The fragmentation pattern showed the presence of ions at  $m/z$  168 and  $m/z$  124. The former resulted from the loss of a methyl radical  $[M-H-15]^-$ , the latter was due to further elimination of a  $CO_2$  molecule  $[M-H-44]^-$ .



**Fig. 4.** Chromatograms (a) and regression coefficients of PLS models (b–d) for TAC<sub>FRAP</sub> of *P. atlantica* extracts. The regression coefficients of PLS after (b) column centering, (c) normalization and column centering, and (d) standard normal variate and column centering are shown.

Methyl gallate is a derivative of hydroxybenzoic acid and has been reported to be a constituent of *P. atlantica* leaves (Ben Ahmed et al., 2016).

**Compound 3.** was tentatively identified as digalloyl quinic acid because of the sequential losses of galloyl moieties (152 Da) from the parent ion at  $m/z$  495. The fragmentation ion at  $m/z$  343 yielded other fragments, such as  $m/z$  191, related to the elimination of a galloyl group  $[M-152-H]^-$ , and the corresponding fragment at  $m/z$  169, corresponding to the elimination of quinic acid with formation of deprotonated gallic acid. Compounds with different degrees of galloyl quinic acids were also reported in several other plants species belonging to the Anacardiaceae, such as *P. lentiscus* (Romani et al., 2002) and *P. atlantica*.

**Compound 4.** exhibited a parent ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  335 with major fragment ions at  $m/z$  183,  $m/z$  168 and  $m/z$  124, suggesting the presence of a methyl gallate moiety. Based on these data this compounds was identified as a methyl digallate isomer (Abu-Reidah et al., 2015).

**Compound 5.** with  $[M-H]^-$  469 presented a main fragment at  $m/z$  169, i.e., a galloyl moiety. The loss of 300 Da corresponds to an ellagic acid moiety. This compound was, therefore, tentatively identified as valoneic acid dilactone (Rojas-Garbanzo et al., 2017; Wyrepkowski et al., 2014).

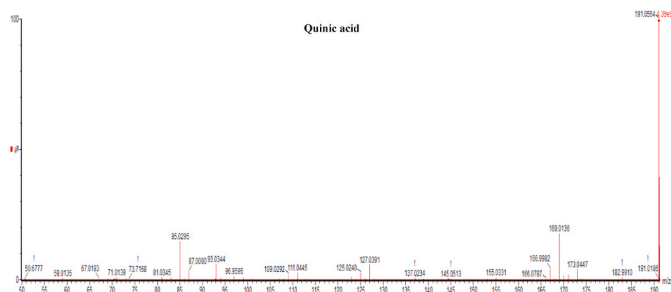
The five identified compounds can be allocated into three structurally related groups, i.e., esterified gallic acid derivatives (peaks 2 and 4), quinic acid derivatives (peaks 1 and 3) and ellagitannin (peak 5).

### 3.6. Discussion

The comparison of the phenolic compounds profile of methanolic galls extracts from *P. atlantica*, studied in this study with that of the leaves and fruits from the same species, studied in previous studies, showed differences. Indeed, rutin, caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillin

**Table 3**UPLC-ESI-QTOF-MS data for phenolic compounds in *P. atlantica* gall extracts.

Peak	t <sub>R</sub> min	[M-H] <sup>-</sup>	Fragment ions (m/z)	UV (nm)	MF	Assigned identity
1	1.16	191	171, 127, 109, 93,85	272	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	Quinic acid
2	3.12	183	169, 124,78	272	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Methyl gallate
3	3.39	495	343, 325, 191,161	274	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	Digalloylquinic acid
4	8.61	335	183,168,124	278	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Methyl digallate
5	9.2	469	169,125,232		C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	Valoneic acid dilactone

Peak numbers correspond to Figs.1–4, t<sub>R</sub>: retention time, MF: molecular formula.**Fig. 5.** MS spectra in negative mode of individual compounds.

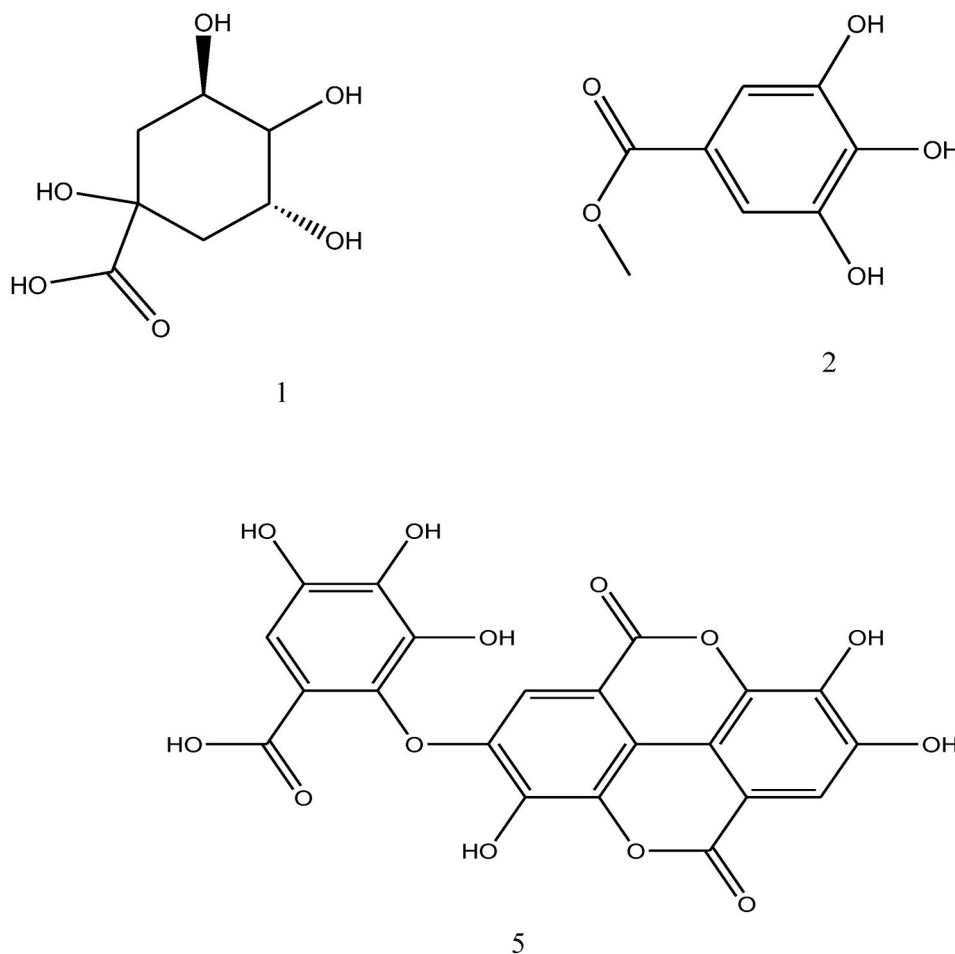
acid, p-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid and sinapic acid were identified by HPLC-MS in the methanolic extract of the fruits (Hatamnia et al., 2014). In the methanolic extract of *Pistacia atlantica* Desf. leaf, the presence of gallic acid derivatives and glycosylated flavonoids, rutin, quercetrin and heterosides was confirmed by Amiri et al. (2018).

Further, Ben Ahmed et al. (2016) identified glucogallin, galloylquinic acid, gentisic acid, galloylshikimic acid, digallic acid, trigalloylglucose, tetragalloylglucose, and tetragalloylquinic acid in the ethyl acetate fraction of a hydro-acetonic extract of *P. atlantica* Desf. leaf. These phenolic compounds are not detected in the analyzed gall extracts. On the other hand, valoneic acid dilactone and methyl digallate were found and, to our knowledge, it was the first time these two compounds are identified in *P. atlantica* species.

Antioxidants inhibit apoptosis, which was mediated by oxidative stress (Li et al., 2002). This activity indicates that phenolic gall compounds might be used to prevent or treat several chronic pathological conditions caused by oxidative stress, such as cancer, diabetes, obesity and infectious diseases.

The PLS regression models of scavenging radicals in the three assays indicate that three major peaks (quinic acid (peak 1), methyl gallate (peak 2) and valoneic acid dilactone (peak 5)) in the UPLC-UV chromatograms are important in the different TAC values.

Quinic acid seems to be responsible for scavenging the DPPH radical, which is in agreement with previous findings. Yang et al. (2018) showed

**Fig. 6.** Chemical structures of phenolic compounds identified from *P. atlantica* galls: (1) quinic acid, (2) methyl gallate and (5) valoneic acid dilactone.

that quinic acid is a potent antioxidant with the ability to scavenge the DPPH radical. Methyl gallate and valoneic acid dilactone were considered to be important for the reducing power ( $\text{Fe}^{+3}$  to  $\text{Fe}^{+2}$ ) and scavenging the  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical.

The relation between the antioxidant activity and the presence of these compounds in *P. atlantica* galls is here reported for the first time.

The ability of the phenolic compounds to act as antioxidants depends on their molecular structures, particularly the number and positions of the hydroxyl groups, and the nature of substitutions on the aromatic rings (Shivakumar and Yogendra Kumar, 2018). Furthermore, quinic acid, methyl gallate and valoneic acid dilactone (Fig. 6) each contain more than three hydroxyl groups, indicating that they may exert strong antioxidant properties (Ben Ahmed et al., 2016). The main mechanisms of action of phenolic antioxidants are considered to be the scavenging of free radicals by hydrogen-atom donation or the transfer of an electron and the formation of adducts between the free radicals and the phenolic molecule (Alov et al., 2012). The DPPH and ABTS assays involve a hydrogen or electron donating activity, while the FRAP assay is based on an electron transfer from the antioxidants to the ferric ion complex. From the models built, it was found that methyl gallate and valoneic acid dilactone react in both FRAP and ABTS assays which could indicate that those two compounds deactivate radicals only by the single electron transfer (SET) mechanisms (Li et al., 2018). In this mechanism methyl gallate or valoneic acid dilactone transfer an electron to the  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical, resulting in a change of the radical structure. Quinic acid shows a positive regression coefficient in the DPPH model. This indicates that its capacity to scavenge DPPH free radicals can be attributed to hydrogen-donating properties. In the hydrogen atom transfer (HAT) mechanism, the DPPH free radicals remove a hydrogen atom from the quinic acid resulting also in a change of the radical form. Hereby,  $\text{DPPH}^{\bullet}$  is likely to be more selective than  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  in its reaction with hydrogen donors. Our findings (Figs. 2–4) indicate that the electron-donating capacity of *P. atlantica* gall extracts is larger than their H-atom donating capacity.

In the study by Hefied et al. (2020), Pearson correlation coefficients were calculated between the contents of the total phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins, and the antioxidant activities. The results revealed that the free radical scavenging ability ( $\text{DPPH}^{\bullet}$  and  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) and ferric ion reducing power (FRAP) were positively and mostly significantly correlated with the phenolic compounds ( $r > 0.740$ ) and condensed tannins ( $r > 0.485$ ), which confirm our results that the phenolic compounds in *P. atlantica* galls are good natural antioxidants. These findings are in agreement with another report that suggests that the phenolic compounds are likely to be responsible for *P. atlantica*'s antioxidant effects. Alidadi et al. (2017) have studied the ability of crude ethanol extract of *P. atlantica* Desf. leaves to scavenge the  $\text{DPPH}^{\bullet}$  radical. The ethyl acetate fraction was found to be rich in phenols and flavonoids, exhibiting the highest antioxidant potential, compared to the ethanol crude extract and its other sub-fractions, i.e. n-butanol, chloroform and n-hexane. In a study conducted by Benamar et al. (2018), the antioxidant activities of crude aqueous extract and four solvent sub-fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, and butanol), obtained from *P. atlantica* Desf. leaves, were evaluated using the DPPH-spectrophotometric assay. Among all fractions and crude extract, the ethyl acetate fraction exhibited the highest activity. It was concluded that polyphenol-rich fractions were more efficient than the crude extract.

Many reports do not take into account seasonality, geography, or phenology while analyzing production and accumulation of antioxidant compounds, implying that plants always present a steady concentration of compounds. However, our findings highlighted that the moment of sampling was crucial to determine when highest antioxidant activities of *P. atlantica* gall extracts occur under natural conditions, since plants are constantly changing their physiology, degrading and synthesizing new molecules in response to new environmental challenges.

Our findings demonstrated the applicability of LC fingerprinting and

screened out the antioxidant compounds in *P. atlantica* galls. Antioxidant activity can be measured by a variety of methods, that include hydrogen atom transfer and single electron transfer principles. Most techniques are spectrophotometric, and thus incapable of indicating individual antioxidant compounds (Ben Ahmed et al., 2020a). Furthermore, the integration of chromatographic and chemometric approaches helps in the identification and activity prediction of herbal products.

This study provided experimental evidence that *P. atlantica* gall extract could be an interesting source of natural antioxidants that may be used in the protection against the detrimental effects of free radicals in humans.

#### 4. Conclusions

Our data revealed the changes in the antioxidant activity of *P. atlantica* galls as a function of harvest month and gender. The statistical analysis of the results suggests that antioxidant activities were to a certain extent affected by the factor harvest month. The gall samples harvested in September exhibited highest reducing power and the ABTS scavenging capacities. The results of the FRAP and ABTS radical scavenging for the September samples were in the ranges 293–433 and 742–777 mg AAE/g dry gall, respectively. The DPPH radical scavenging activity was found to be high in August (159–224 mg AAE/g dry gall). These findings indicated that the gall samples collected in August–September had a strong antioxidant activity. The factor gender also results in samples with different antioxidant activities. Our results revealed that male galls tend to be more active than female.

Major peaks, potentially influencing the antioxidant activity of the samples, were indicated by studying the regression coefficients of the PLS models. Individual antioxidant compounds of *P. atlantica* galls were identified by UPLC-QTOF-MS. The phenolic compounds methyl gallate and valoneic acid dilactone were considered to be important antioxidants in the FRAP and scavenging ABTS assay, while quinic acid showed to be the main component influencing the antioxidant activity measured with the DPPH method.

*P. atlantica* galls thus may be considered as a possible source of phenolic compounds with efficient antioxidant properties. However, confirmation of the biological activity of these selected extracts in appropriate cell and/or animal models is still required.

#### Contributors' statement

Concept and design of work: Vander Heyden Y, Yousfi M, Ben Ahmed Z; data collection: Ben Ahmed Z; Hefied F, Yousfi M; analysis and interpretation of data: Ben Ahmed Z and Vander Heyden Y; Drafting of manuscript: Ben Ahmed Z, Statistical analysis: Ben Ahmed Z; critical revision of manuscript: Vander Heyden Y and Demeyer K.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgement

The authors thank General Directorate of Research and Technology Development, Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (DGRSDT) for financial support.

#### References

- Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arráz-Román, D., Segura-Carretero, A., 2015. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L.(Sumac) fruits. *Food Chem.* 166, 179–191.

- Alidadi, S., Moradi, M.T., Asadi-Samani, M., Lorigooini, Z., 2017. Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 9 (4), 293–297.
- Alov, P., Tsakovska, I., Pajeva, I., 2012. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 85–104.
- Amiri, M., Nasrollahi, F., Barghi, S., Ebrahimi, N., Rajzadeh, A., Nayyeri, N.D., Ahmadi, H., 2018. The effect of ethanol baneh skin extract on the expressions of bcl-2, bax, and caspase-3 concentration in human prostate cancer pc3 cells. *Int. J. Cancer Manag.* 11 (3), e9865.
- Ananthkrishnan, T.N., 1998. Insect gall systems: patterns, processes and adaptive diversity. *Curr. Sci.* 75 (7), 672–676.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant activity/capacity measurement Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1028–1045.
- Bastos, R.G., Salles, B.C.C., Bini, I.F., Castaldini, L.P., Silva, L.C.D., Vilela, A.A., Santos, L.L., 2019. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. *South Afr. J. Bot.* 123, 317–332.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Vander Heyden, Y., 2021. Effects of growing region and maturity stages on oil yield, fatty acid profile and tocopherols of *Pistacia atlantica* Desf. fruit and their implications on resulting biodiesel. *Renew. Energy* 181, 167–181.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaeane, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y., 2018. Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 149, 547–556.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaeane, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y., 2016. Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchem. J.* 128, 208–217.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaeane, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y., 2017. Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves. *Pharm. Biol.* 55, 1185–1194.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaeane, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y., 2020a. Four *Pistacia atlantica* subspecies (*atlantica*, *cabulica*, *kurdica* and *mutica*): a review of their botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 265, 113329–113357.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaeane, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Vander Heyden, Y., 2020b. Defining a standardized methodology for the determination of the antioxidant capacity: case study of *Pistacia atlantica* leaves. *Analyst* 145, 557–571.
- Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur, M., 2018. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *J. Herbs, Spices, Med. Plants* 24 (3), 229–244.
- Benmahieddine, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., El Zerey-Belaskri, A., Gismondi, A., Di Marco, G., Djebli, N., 2021. Influence of plant and environment parameters on phytochemical composition and biological properties of *Pistacia atlantica* Desf. *Biochem. Systemat. Ecol.* 95, 104231.
- Cerretani, L., Bendini, A., 2010. Rapid assays to evaluate the antioxidant capacity of phenols in virgin olive oil. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands. 2010, pp. 625–635.
- Chohra, D., Ferchichi, L., Cakmak, Y.S., Zengin, G., Alsheikh, S.M., 2020. Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.). *South Afr. J. Bot.* 132, 164–170.
- Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z., 2014. Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts. *Food Chem.* 153, 279–284.
- Eshwarappa, R.S.B., Iyer, R.S., Subbaramiah, S.R., Richard, S.A., Dhanaajaya, B.L., 2014. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *Bioimpacts: BI* 4, 101–107.
- Giampieri, F., Afrin, S., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., Cianciosi, D., Reboredo-Rodriguez, P., Battino, M., 2019. Autophagy in human health and disease: novel therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 30 (4), 577–634.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol.* 99 (2), 165–178.
- Hamdi, A., Viaeane, J., Mahjoub, M.A., Majouli, K., Gad, M.H.H., Kharbach, M., Demeyer, K., Marzouk, Z., Vander Heyden, Y., 2018. Polyphenolic contents, antioxidant activities and UPLC–ESI–MS analysis of *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves extracts. *Int. J. Biol. Macromol.* 106, 1071–1079.
- Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., 2014. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chem.* 145, 306–311.
- Hefied, F., Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., 2020. In vitro antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of methanolic and lipid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. *Galls. J Food Process Pres.* 10.1111/jfpp.14956.
- Inbar, M., Izhaki, I., Kopolovich, A., Lup, I., Silanikove, N., Glasser, T., Lev-Yadun, S., 2010. Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod-Plant Inte.* 4, 1–6.
- Kaur, G., Athar, M., Alam, M.S., 2008. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem. Biol. Interact.* 171, 272–282.
- Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., Yousfi, M., 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eight plants traditionally used in Algeria for diabetes. *Curr. Enzym. Inhib.* 13 (1), 67–78.
- Klein-Júnior, L.C., Viaeane, J., Tuenter, E., Salton, J., Gasper, A.L., Apers, S., Andries, J.P.M., Pieters, L., Henriques, A.T., Vander Heyden, Y., 2016. The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (*Palicourea* comb. nov.). Part II: indication of peaks related to the inhibition of butyrylcholinesterase and monoamine oxidase-A. *J. Chromatogr. A* 1463, 71–80.
- Köksal, E., Gülçin, I., Beyza, S., Sarikaya, O., Bursal, E., 2009. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 24 (2), 395–405.
- Kumar, K., 2017. Discrete wavelet assisted correlation optimised warping of chromatograms: optimizing the computational time for correcting the drifts in peak positions. *Anal. Method.* 9, 2049–2058.
- Leong, L.P., Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76 (1), 69–75.
- Li, J., Lee, J.M., Johnson, J.A., 2002. Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 388–394.
- Li, X., Chen, B., Xie, H., He, Y., Zhong, D., Chen, D., 2018. Antioxidant structure-activity relationship analysis of five dihydrochalcone. *Molecules* 23, 1162–1175.
- Mandade, R., Sreenivas, S.A., Choudhury, A., 2011. Radical scavenging and antioxidant activity of *Carthamus tinctorius* extracts. *Free Radic. Antioxidants* 3, 87–93.
- Mehrejad, M.R., 2010. Potential biological control agents of the common Pistachio *Psylla Agonosceia Pistaciae*, a review. *Entomofauna* 31, 317–340.
- Miller III, D.G., Raman, A., 2019. Host-plant relations of gall-inducing insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 112, 1–9.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M.L., Sulaiman, S., Gan, S.H., 2012. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med.* 9, 36–42.
- Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S., Fernandes, G.W., Ferreira, B.G., Carneiro, R.G.S., Fuzaro, L., 2016. Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *J. Insect Physiol.* 84, 103–113.
- Rezaeyan, S., Pourmajidian, M.R., Jalilv, H., Parsakho, A., 2009. Growth parameters of *Pistacia atlantica* Desf under different soil conditions in Iran. *Afr. J. Plant Sci.* 3 (9), 184–189.
- Ribeiro, J.S., Augusto, F., Salva, T.J., Thomaziello, R.A., Ferreira, M.M.C., 2009. Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares. *Anal. Chim. Acta.* 634 (2), 172–179.
- Rojas-Garbanzo, C., Zimmermann, B.F., Schulze-Kaysers, N., Schieber, A., 2017. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. Criolla) by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Food Res. Int.* 100, 445–453.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M., 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem. Anal.* 13, 79–86.
- Rostás, M., Maag, D., Ikegami, M., Inbar, M., 2013. Gall volatiles defend aphids against a browsing mammal. *BMC Evol. Biol.* 13, 193–204.
- Şahin, S., Işık, E., Aybaster, Ö., Demir, C., 2012. Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. *J. Chemom.* 26, 390–399.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A., 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.* 98 (1), 21–33.
- Shivakumar, A., Yogendra Kumar, M.S., 2018. Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48, 214–236.
- Sifi, I., Gourine, N., Gaydou, E.M., Yousfi, M., 2015. Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Nat. Prod. Res.* 29, 1945–1949.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., Hoai, N.N., Chataigné, G., Rivière, C., Hong, V.N.T., Vander Heyden, Y., 2009. Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part I: indication, using linear multivariate calibration techniques. *Anal. Chim. Acta* 649 (1), 24–32.
- Vest Nielsen, N.P., Carstensen, J.M., Smedsgaard, J., 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *J. Chromatogr. A* 805, 17–35.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7 (10), 1306–1320.
- Wyrepkowski, C.C., Gomes da Costa, D.L.M., Sinhorin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R. A., Resende, F.A., Dos Santos, L.C., 2014. Characterization and quantification of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules* 19, 16039–16057.
- Yang, H., Villani, R.M., Wang, H., Simpson, M.J., Roberts, M.S., Tang, M., Liang, X., 2018. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 266–289.
- Yoram, G., Inbar, M., 2011. Distinct antimicrobial activities in aphid galls on *Pistacia atlantica*. *Plant Signal. Behav.* 6, 2008–2011.
- Zahoor, M., Zafar, R., Rahman, N.U., 2018. Isolation and identification of phenolic antioxidants from *Pistacia integerrima* gall and their anticholinesterase activities. *Heliyon* 12, 1–22.
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G., Tavili, A., 2019. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–15.