



DEPARTEMENT : Sciences Naturelles

MEMOIRE DE MAGISTER

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Valorisation des bio-ressources végétales

THEME DU PROJET :

Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et les activités antioxydantes et biologiques dans les galls de Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf.*)

Présenté par :

M^{elle} HEFIED Fatiha

Dirigé par :

Pr. YOUSFI Mohamed

Devant les membres du jury

Pr. SAIDAT Boubakeur	Université de Laghouat,	Président
Dr. BENAROUS Khedidja	Université de Laghouat,	Examinatrice
Dr. KHACHEBA Ihen	Université de Laghouat,	Examinatrice
Pr. YOUSFI Mohamed	Université de Laghouat,	Encadreur de mémoire.
Dr. BENAHMED Ziyad	Université de Laghouat,	Co-encadreur de mémoire.

Année universitaire : 2017-2018

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma grande mère «Allah Yarhmha»

***A* mes **parents**,**

***A* mes deux **frères** : Mohamed et Yacine.**

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche des sciences fondamentales à l'Université Amar Telidji de Laghouat et a atteint son terme grâce à l'assistance, la générosité, la bonne humeur et la collaboration de nombreuses personnes.

En premier lieu, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à mon promoteur, le professeur *M. Yousfi*, directeur du laboratoire de recherche des sciences fondamentales à l'Université de Laghouat, de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ce mémoire sur un sujet passionnant. Grâce à son encadrement, son aide, sa disponibilité aussi souvent que possible malgré ses multi tâches et ses précieux conseils, j'ai pu mener à bien ce travail qui m'a été confié.

Mes remerciements et ma gratitude vont également à mon co-promoteur, *Dr. Z. Ben-Ahmed*, pour son aide précieuse surtout sur l'aspect analyse statistique de ce travail.

Je tiens à remercier vivement chaque personne du membre de jury d'avoir consacré leur temps à la lecture de ce manuscrit et m'avoir fait l'honneur d'examiner et juger ce travail. Qu'ils trouvent ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mon travail de recherche au laboratoire des sciences fondamentales a été particulièrement facilité, grâce aux trois personnes qui sont *Mr M. Harrath*, *M^{lle} S. Bendahgane* et *M^{lle} S. Hachani*. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour leurs conseils pertinents, leur disponibilité et l'ensemble des échanges.

Je souhaite remercier *Dr. I. Kfacheba* et *Dr. H. Boussoussa*, pour le partage de leurs compétences en enzymologie pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de nos échantillons vis-à-vis des enzymes digestives (α -amylase et α -glucosidase).

Je ne remercierai jamais suffisamment *Dr. Kh. Benarous*, pour ses précieux conseils prodigués, sa vitalité remarquable et sa gentillesse.

Mes remerciements vont également à *M^{me} F. Baroud*, technicienne du laboratoire des sciences fondamentales pour son soutien, sa disponibilité en dépit de sa condition de grossesse.

Je ne saurais oublier mes collègues de magister, merci pour ces échanges, ces discussions animées, et cette bonne humeur passée durant ces deux années d'étude.

Je profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin m'ont aidé.

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 mes frères qui ont été d'un grand soutien et mes parents, qui ont toujours répondu présent surtout dans les moments difficiles.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 01

Chapitre 01 : *Pistacia atlantica*

1-Introduction 04

2-Pistachier de l'atlas 04

2-1-Description morphologique 04

2-2-Systématique 04

3-Utilisation de *Pistacia atlantica* 05

3-1- Valeur agro- écologique 05

3-2-Valeur medicinale 05

3-3-Valeur nutritionnelle 06

4- Travaux antérieurs 06

5-Galles 07

5-1-Généralités 07

5-2- Utilisation des galles 10

5-3-Etudes antérieures 10

Références 12

Chapitre 02 : Optimisation des conditions d'extraction des galles de *P. atlantica*

1-Introduction 14

2-Terminologie 14

3-Plan d'expérience 16

4- Surfaces de réponse 16

4-1-Modélisation mathématique 17

4-2-Le modèle de l'expérimentateur 18

5-Plan de Box-Behnken 18

6-Applications du plan de Box-Behnken (PBB) 19

7-Matériel et Méthodes 20

7-1-Réactifs chimiques	20
7-2-Matériel végétal	20
7-3-Méthodes	21
7-3-1-Analyse préliminaire	21
7-3-1-1-Le temps d'extraction	22
7-3-1-2- La température d'extraction	22
7-3-1-3- Le rapport solide-liquide	22
7-3-2-Dosage des polyphénols totaux	22
7-3-3-Dosage des flavonoïdes	22
7-3-4-Dosage des tanins condensés	23
7-3-5-Activité anti-oxydante	23
7-3-5-1-Test DPPH [*] (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)	23
7-3-5-2-Test de chélation de fer	24
7-3-6-Matrice d'expériences	24
7-3-7-Analyse statistique	25
8-Résultats et Discussion	25
8-1- Résultats de l'étude préliminaire sur les conditions d'extraction des composés phénoliques	25
8-1-1- Temps d'extraction	25
8-1-2-Température d'extraction	26
8-1-3-Rapport solide-liquide	27
8-3-Domaines expérimentaux des facteurs	28
8-3-Optimisation des conditions d'extraction	28
8-4-Analyse des diagrammes des surfaces de réponse	33
8-5-Validation des conditions optimales d'extraction selon le profileur de prévision	37
9-Conclusion	39
Références	40

Chapitre 03 : Effets des variations mensuelles et genre sur les composés phénoliques et les activités antioxydantes des galles de *P. atlantica*

1-Introduction	42
2-Composés phénoliques	42

2-1-Généralités	42
3- La biosynthèse des composés phénoliques	45
4-Classifications des composés phénoliques	45
4-1- Les formes simples	45
4-1-1- Les acides phénoliques	46
4-1-2-Les flavonoïdes	46
4-2-Les formes condensés	47
4-2-1-Les tanins	47
4-2-1-1- Les tanins hydrolysables	47
4-2-1-2- Les tanins condensés	48
5-Rôle antioxydant des composés phénoliques	48
6-Matériel et Méthodes	51
6-1-Réactifs chimiques	51
6-2-Matériel végétal	51
6-3-Méthodes	52
6-3-1-Choix de la méthode d'extraction et solvant utilisé	52
6-3-2-Préparation des échantillons	52
6-3-3-Activité anti-oxydante	53
6-3-3-1- Test d'oxyde nitrique (NO [•])	53
6-3-4-Analyse statistique	53
7-Résultats et Discussion	54
7-1-Teneurs en CPT, flavonoïdes et tanins	54
7-2- Evaluation de l'activité antioxydante	57
7-3-Corrélation entre les teneurs (CPT, flavonoïdes et tanins) et les activités antioxydantes (DPPH [•] , TPT et NO [•])	60
7-3-1-Correlation entre les teneurs CPT, flavonoïdes et tanins	60
7-3-2- Corrélation entre les activités antioxydantes (DPPH [•] , TPT et NO [•])	61
7-3-3- Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes	62
8-Conclusion	64
Références	65

Chapitre 04 : Etude de l'effet inhibiteur des extraits phénoliques des galles de *P. atlantica* sur α -amylase et α -glucosidase

1-Introduction	68
2-Généralités sur le diabète	68
3- Enzymes digestives glucidiques	69
3-1- α -amylase	69
3-2- α -glucosidase	70
3-3- Inhibition des enzymes digestives glucidiques	70
4- La phytothérapie antidiabétique	71
5-Matériel et Méthodes	72
5-1-Produits chimiques	72
5-2-Préparation des échantillons	72
5-3-Méthodes	72
5-3-1- Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' α -amylase	73
5-3-2- Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' α -glucosidase	73
5-3-3-Traitement statistique	74
6-Résultats et discussion	74
7-Conclusion	76
Références	77
Conclusion et perspectives	79
Annexes	

Liste des tableaux

Chapitre 01

01	Classification botanique de <i>Pistacia atlantica</i> Desf.	05
02	Quelques études antérieures sur la plante de <i>Pistacia atlantica</i> .	07

Chapitre 02

01	La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.	18
02	Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des galles (G09) du <i>Pistacia atlantica</i> .	27
03	La matrice expérimentale de Box-Behnken pour trois facteurs (X_1 , X_2 et X_3) et leurs réponses (la moyenne des composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes, tanins, DPPH [*] , test phénanthroline (TPT) exprimé en (mg/g matière sèche).	28
04	L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre.	29
05	Coefficients de régression et leurs significations statistiques.	31

Chapitre 03

01	code adapté pour chaque échantillon	51
02	Teneurs en phénols totaux, tanins et flavonoïdes des galles de <i>P. atlantica</i> de la région de Laghouat, exprimées en mg équivalent par g matière sèche.	53
03	Valeurs des activités antioxydantes, DPPH [*] (mg EAA/g MS), NO [*] (IC ₅₀ en mg/ml) et TRT (mg ET/g MS) des galles de <i>P. atlantica</i> de la région de Laghouat.	57

Chapitre 04

01	Valeurs d'IC ₅₀ (mg/ml) des α -amylase et α -glucosidase des galles de <i>P. atlantica</i> de la région de Laghouat.	73
-----------	---	-----------

Liste des figures

Chapitre 01

01	Quelques exemples de galles dans différentes parties de la plante d'après.	08
-----------	--	-----------

Chapitre 02

01	Représentation graphiques des axes présentant les facteurs et l'espace expérimental.	14
02	Représentation graphique d'un domaine du facteur.	14
03	Représentation schématique des niveaux des facteurs définissant un point expérimental.	14
04	Représentation schématique d'un domaine d'étude.	15
05	L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse.	16
06	Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs.	18
07	Galles de <i>P. atlantica</i> dans la région de Laghouat.	20
08	Effet du temps d'extraction sur la teneur des composés phénoliques totaux des galles de <i>Pistacia atlantica</i> (G09).	25
09	Effet de température d'extraction sur la teneur des composés phénoliques totaux des galles de <i>Pistacia atlantica</i> (G09).	25
10	Effet du rapport (S/L) sur la teneur des composés phénoliques totaux des galles de <i>Pistacia atlantica</i> (G09).	26
11	Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et le rapport solide-liquide sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH [•] et test phénanthroline (PT).	33
12	Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du temps et la température d'extraction sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH [•] et le test phénanthroline (PT).	34
13	Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solide-liquide et la température d'extraction sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH [•] et le test phénanthroline (PT).	35
14	Combinaison optimale pour une meilleure extraction des CPT, flavonoïdes et tanins et les réponses prévues.	37
15	Combinaison optimale pour une meilleure activité antioxydante (DPPH [•] et test phénanthroline) et les réponses prévues.	38

Chapitre 03

01	Quelques exemples des structures des composés phénoliques.	43
02	Structure de l'acide hydroxybenzoïque (a) et de l'acide hydroxycinnamique (b).	45
03	Structure du 2- Phényle chromane (a) et structure générale des flavonoïdes (b).	45

04	Structures des principaux flavonoïdes.	46
05	Structure chimique des acides gallique (a) et ellagique (b).	47
06	Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés.	47
07	Variation mensuelle des composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes et tanins des galles mâles et femelles de <i>P. atlantica</i> dans la région de Laghouat.	54
08	Variation mensuelle des activités antioxydantes (DPPH [•] , TFT et NO [•]) des galles mâles et femelles de <i>P. atlantica</i> dans la région de Laghouat.	58
09	Relation entre les CPT et tanins des galles mâles (GM) et femelles (GF) de <i>P. atlantica</i> .	60
10	Corrélation entre DPPH [•] et le test phénanthroline (TPT) des galles mâles (GM) et galles femelles (GF) de <i>P. atlantica</i> .	60
11	Corrélation entre le test phénanthroline (TPT) et le IC50 du test NO [•] des galles femelles (GF).	61
12	Corrélation entre le test phénanthroline (TPT) et la teneur en flavonoïdes des galles mâles (GM).	61
13	Corrélation entre le IC50 du test NO [•] et la teneur en CPT des galles femelles (GF).	62
Chapitre 04		
01	La moyenne des pourcentages d'inhibition des galles de <i>P. atlantica</i> contre α -amylase.	74

Liste des abréviations

ABTS: Azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfoniacid

ADN: Acide désoxyribonucléique

ANOVA: Analysis of variance

BBD: Box-Behnken design

CA: Capacité antioxydante

CCD: Central composite design

CPT: Composés phénoliques totaux

DNS: Acide 3,5-dinitrosalicylique

DPPH[•]: 2, 2- Diphényl-1-Picrylhydrazyl

EAA: Equivalent acide ascorbique

EAG: Equivalent acide gallique

EC: Equivalent catéchine

EQ: Equivalent quercetine

ERA: Espèce réactive d'azote

ERO: Espèce réactive d'oxygène

ET: Equivalent tocophérol

F_eCl₃ : Chlorure de fer

G09: Galle du moins de septembre

GC: Gas Chromatography

GC – MS: Gas chromatography-mass spectrometry

GDB: Growth-Differentiation Balance

GF: Galle femelle

GM: Galle mâle

Hcl: Acide chlorhydrique

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

MS: Matière sèche

MSR: Méthode de surface de réponse

Na_2CO_3 : Bicarbonate de sodium

NaOH: Hydroxyle de sodium

$\text{NO}^\bullet$: Oxyde nitrique

NPS: Nitroprussiate de sodium

$\text{O}_2^{\bullet-}$: Anions superoxyde

OMS: Organisation mondiale de santé

PCM: Protein competition Model

PI: Pourcentage d'inhibition

R^2 : Coefficient de détermination

(S/L): Solide/Liquide

TPT: Test phénanthroline

UV: Ultra-violet

(v/v) : volume/volume

Introduction générale

A travers les siècles, l'Homme s'est toujours reposé sur les plantes à des fins curatives et préventives. En effet, la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales ont été développées grâce à des traditions humaines [1].

Bien que, les propriétés thérapeutiques des plantes étaient connues empiriquement depuis l'antiquité, ce n'est que vers le début du 20^{ème} siècle [2] que l'axe de recherche s'est focalisé sur les produits naturels qui se trouvent être une source importante de nouveaux composés actifs contre divers maladies [3]. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes [1].

La flore algérienne est considérée comme un réservoir intéressant d'espèces de plantes dont 7.9% sont endémiques pour la recherche de métabolites actifs [4].

Le présent travail est réalisé dans le cadre de la valorisation de bio-ressources végétales, visant à évaluer le pouvoir antioxydant ainsi que l'activité inhibitrice contre l' α -amylase et l' α -glucosidase des extraits polaires des galls de Pistachier de l'Atlas. C'est une continuité d'un travail réalisé par **Ben-Ahmed (2016)** [4] dans sa thèse de doctorat sur l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles de *Pistacia atlantica*.

Plusieurs espèces végétales algériennes telles que le *Pistacia atlantica* ont été étudiées pour divers propriétés biologiques. Différentes parties de cette plante ont fait l'objet de nombreux travaux en particulier la recherche des métabolites secondaires comme les polyphénols car il présente une teneur élevée de ces derniers et divers effets pharmacologiques [4, 5, 6, 7]. Néanmoins, l'étude des composés phénoliques des galls de *P. atlantica* n'a pas été réalisée.

Les composés phénoliques sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-carcinogènes [1] ou encore antidiabétique [8]. En outre, l'identification et la quantification des composés phénoliques peuvent fournir des informations vitales liées non seulement à la fonction antioxydante mais également à la qualité et aux avantages potentiels de la plante [4].

Les objectifs de notre étude sont les suivants :

- Trouver une meilleure combinaison des variables indépendantes (temps, température et rapport (S/L) pour extraire le maximum des composés phénoliques des galls de *P. atlantica*.
- Déterminer la meilleure période de récolte des galls riches en composés bioactifs.
- Evaluer l'activité inhibitrice des galls sur *α -amylase et α -glucosidase* ainsi que déterminer la meilleure période de l'action inhibitrice.

Ce manuscrit s'articule comme suit :

-Le premier chapitre fait l'état d'une description botanique générale, l'utilisation et les études antérieures déjà réalisés concernant la plante de *Pistacia atlantica*, ainsi que les galles.

-Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des effets des paramètres (température, rapport solide-liquide et temps) sur le rendement d'extraction des composés phénoliques des galles de *Pistacia atlantica* en utilisant la conception expérimentale de Box-Behnken qui est une méthode de surface de réponse (MSR) afin d'optimiser les paramètres d'extraction pour évaluer le rendement maximal des composés phénoliques.

-Compte tenu de l'importance des polyphénols, leur large distribution dans l'espèce *Pistacia atlantica* [4] et la volonté de démontrer une quelconque possibilité de l'influence des variations saisonnières ainsi que le genre de l'espèce sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante, le troisième chapitre est porté sur l'étude de la teneur des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante par quelques méthodes (piégeage des radicaux libre tels que DPPH[•], NO[•] et la chélation de fer) des galles de *P. atlantica* récoltés durant cinq mois de juillet à novembre dans la région de Laghouat.

-Le quatrième chapitre est accordé à l'évaluation de l'activité inhibitrice des extraits contre les enzymes (α -amylase et α -glucosidase) par des méthodes *in vitro* qui est considérée comme un moyen de lutte contre l'hyperglycémie.

-Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale et quelques perspectives envisagées et des annexes.

Références

- [1] Benhammou, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorale en biologie, Option : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse, Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen (Algérie), 174p.
- [2] Djenidi, H. (2011). 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), 80p.
- [3] Chikhi, I. (2013). Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Thèse doctorale en chimie, Option : Chimie Bio-Organique & Thérapeutique, Université Abou-Bekr Belkaid- Tlemcen (Algérie), 174p.
- [4] 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.
- [5] Gourine, N., Sifi, I., Gaydou, E. M. and Yousfi, M. (2011). «Chemical Composition of the Essential Oil of Unripe Galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria.» *The Natural Products Journal*, 1(2): 125-127.
- [6] Gourine, N., Yousfi, M., Nadjemi B., and 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.
- [7] Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Ben Bertal, D. (2003). «Étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien.» *OCL*, vol 10, n° 5-6: 425-427.
- [8] Masunda, T.A., Mbala, M.B., Kayembre, S.J., Longoma, B.F., Ngbolua, K.N., Tshibangu, D.S.T. and Mpiana, P.T. (2014). «Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild. (Arecaceae).» *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8 (16): 2441-2451.

Chapitre 01

Pistacia atlantica

1-Introduction

Le genre *Pistacia* appartient à la famille botanique des *Anacardiaceae* (Therebinthaceae) [1]. Ce genre est répandu dans la région Méditerranéenne et Moyen-Orientale [2]. D'après Zohary (1952), le genre *Pistacia* comprend onze espèces. Parmi elles, *Pistacia atlantica* Desf [3], c'est une espèce endémique qui figure parmi les plantes non cultivées protégées en Algérie [1]. On la trouve disséminée dans la région de Djelfa (Senalba, Ain Oussara, Messaad), Laghouat (partie sud) et Ghardaia (dans l'ouest m'zab), sa limite extrême se trouve en plein cœur du Hoggar où il existe à l'état de relique [4], parfois en montagne dans la région Ain Sefra et sur les hauts plateaux oranais [5]. Le *Pistacia atlantica* Desf a une capacité de pousser dans plusieurs types du sol incluant les alcalins et se contente d'une faible pluviométrie de l'ordre de 150 mm et parfois moins [2]. On le trouve en association avec jujubier (*Ziziphus lotus*) qui constituerait une bonne protection aux jeunes pousses contre les vents et le pâturage. Le *Pistacia atlantica* Desf possède un système racinaire puissant qui fixe des sols très étendu et profond permettant à l'arbre de rester vert même lors des périodes de sécheresse [6].

2-Pistachier de l'Atlas

2-1-Description morphologique

Le Pistachier de l'Atlas, connu sous le nom vernaculaire de « Betoum » ou « Botma » au singulier en langue arabe [7] ou encore « Tismelal » en langue berbère [4]. Cet arbre est également appelé pistache sauvage ou faux pistachier [4, 6]. C'est une espèce ligneuse et spontanée, pouvant attendre 20m de hauteur dans les conditions favorables [7], à tronc bien individualisé et à frondaison hémisphérique, le port est arrondi et à ramifications étalées [6, 8]. Ses feuilles composées sont constituées de sept à neuf folioles, les fleurs sont en grappes lâches, les fruits, gros comme un pois, sont des drupes [2].

2-2-Systématique

La classification botanique du Pistachier de l'Atlas est synthétisée dans le Tableau 01 [9, 2].

Tableau 01 : Classification botanique de *Pistacia atlantica* Desf. [9, 2].

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Super-division	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia atlantica</i>

3-Utilisation de *Pistacia atlantica*

Le rôle du Pistachier de l'Atlas est multiple, il a été utilisé en médecine traditionnelle et notamment dans d'autres utilisations spécifiques à chaque partie de cette plante.

3-1- Valeur agro- écologique

L'arbre fournit un bois lourds de bonne conservation. C'est un bois artisanat, utilisé pour le chauffage et la carbonisation [4], en raison de sa rusticité et sa résistance à la sécheresse, il est utilisé dans les reboisements pour lutter contre la désertification [10]. Il est utilisé comme aliment de bétail en période de disette [7]. C'est une source d'ombre pour les animaux, d'ailleurs, il est souvent le seul arbre dans la région [5]. Notamment considéré comme un porte-greffe de vigueur modérée [10].

3-2-Valeur medicinale

La résine : l'écorce produit une résine -mastic (Oléorésine) [10], employée dans quelques usages selon la région locale, en pharmacie s'est longtemps servi pour la fabrication d'onguents [4], la préparation des masticatoires dans l'industrie photographique et en médecine dentaire ou également utilisé comme colle [11]. Sa richesse en huiles essentielles lui confère un pouvoir antibactérien très intéressant surtout vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus pyogens* [12].

Les feuilles donnent un extrait phénolique qui présente une activité antifongique [13]. Egalement utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de la paralysie, diarrhée, les infections de la gorge, des calculs rénaux, des douleurs ictère, l'asthme et le traitement de l'estomac. La plante dispose d'une puissante activité antioxydante piègeurs de radicaux libres [10]. Des études

épidémiologiques sur les graines de Pistachier de l'Atlas ont démontré un risque réduit de maladies cardiovasculaires avec de fréquentes consommations de graines ou encore d'autres études cliniques sur des graines montrant un effet d'abaissement du cholestérol total et du LDL-cholestérol [10].

3-3-Valeur nutritionnelle

Les drupes comestibles sont très énergétiques, importante source de nourriture, même s'ils sont petits et non pas une valeur commerciale comme celles de *Pistacia vera* L. [14]. Ils présentent un taux élevé de protéines, de glucides et d'huile alimentaire de l'ordre de 40% [7]. Le Pistachier de l'Atlas Algérien contient un taux important (73 %) d'acides gras insaturés [11].

4- Travaux antérieurs

Le Pistachier de l'Atlas a fait l'objet de plusieurs études phyto-chimiques indiquant que les espèces de *Pistacia* sont riches en monoterpènes [15], triterpénoides tétracyclique [16, 2] et d'autres; en flavonoïdes [17, 2] en d'autres composés phénoliques y compris l'acide gallique [18, 19, 2] et en huiles essentielles [20, 2]. En Algérie, des études sur le *Pistacia atlantica* ont été plus centrées non seulement sur l'analyse qualitative et quantitative de la composition chimique de divers parties de la plante, sur l'huile essentielle mais aussi sur les activités anti oxydantes et biologiques (anti microbienne, antifongique, antidiabétique...). Le tableau suivant présente quelques études réalisées sur la plante de *Pistacia atlantica*.

Tableau 02 : Quelques études antérieures sur la plante de *Pistacia atlantica*.

Auteurs	Travaux	Références
Djenidi (2011)	Etude du pistachier de l'Atlas (<i>Pistacia atlantica</i> Desf.): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne.	[2]
Benabdallah (2011)	Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (<i>Pistacia atlantica</i> Desf.) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléorésine.	[6]
Benhassaini et al. (2007)	Etude de la composition chimique des fruits <i>Pistacia atlantica</i> Desf. Subsp.	[8]
Yaaqobi et al.(2009)	Etude biologique de <i>Pistacia atlantica</i> .» <i>Biometec Echo</i> ,3 (6): 39-49.	[9]
Achehab (2012)	Valorisation de l'huile des graines de Pistachier de l'Atlas, optimisation de l'extraction par presse et caractéristiques phytochimique.	[10]
Yousfi et al (2003)	Etude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien.	[11]
Ghalem et Benali (2009)	Etude de l'activité bactéricide de <i>Pistacia atlantica</i> Desf contre certains pathogènes.	[12]
Benhammou et al. (2008)	Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Pistacia atlantica</i> .	[13]
Gourine et al. (2009)	Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> Desf. en Algérie.	[21]
Ben-Ahmed (2016)	Etude de l'activité antioxydante des extraits phenoliques des feuilles de <i>Pistacia atlantica</i> .	[22]

5-Galles

5-1-Généralités

Il existe plusieurs définitions de galle (ou cécidie), plus ou moins restrictives, parmi elles, on cite la définition proposé par **Meyer (1987)** [23]: « 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 » ou encore plus récemment la définition mentionnée par **Dauphin (2012)** [23] : « Une galle est une déformation structurée d'une plante provoquée par un parasite ». La déformation s'accompagne presque toujours d'une hypertrophie des tissus végétaux ; cependant, il y a des cas où il n'y a pas ou très peu d'hypertrophie mais seulement une déformation caractéristique (exemple les plis des feuilles de chênes dus **aux Macrodiplosis**). Les plantes sont les seules hôtes des galles, à de très rares exceptions près (exemple le rotifère *Proales*, déforme une algue filamenteuse ; le diptère *Agathomyia* forme des galles sur un champignon polypore). La diversité des galles en termes de structure est captivante. Elle exhibe l'énorme capacité morphogénèse végétale

qui permet à la plante de produire des organes déconcertant. Tous les organes de la plante peuvent être affectés (**figure 01**). Les organismes qui provoquent la formation de galle sont nommés galligènes (ou cécidogènes), pouvant être : des bactéries (qui forment des bactériocécidies, exemple : *Agrobacterium tumefaciens*,) ; des champignons (mycocécidies causant généralement des déformations peu structurées, exemple : au sein des rouilles (Uredinales)) ; 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) [23].



Figure 01 : Quelques exemples de galles dans différentes parties de la plante d'après^{1, 2} : 1.galle provoquée par un hémiptère (*Anopleura lentisci*) sur la feuille de *Pistacia lentiscus*. 2. Transformation en énorme corne sur la feuille de *Pistacia terebinthus* provoquée par un hémiptère (*Baiçongia pistaciae*). 3. Renflement de la tige de *Cirsium arvense* causé par un diptère (*Urophora cardui*). 4. Mycocécidie provoquée par une rouille déformante (*Puccinia*) sur la tige d'une Bourdaine (*Frangula alnus*). 5. Fleur gonflées (*Lotus corniculatus*) due à un diptère (*Contarinia loti*). 6. Galle sur la racine d'un melon (*Cucumis melo*) provoqué par un nématode (Meloidogyne). 7. Hypertrophie d'un fruit (*Linaria vulgaris*) par un coléoptère (*Rhinusa antirrhini*). 8. Galle fixée sur un gland de chêne (*Quercus robur*) provoquée par un hyménoptère (*Andricus quercusclavicornis*). 9. Hypertrophie d'un bourgeon de chêne (*Quercus robur*) par un hyménoptère (*Andricus kollari*). 10. Hypertrophie d'un bourgeon de chêne (*Quercus petraea*) par un hyménoptère (*Andricus foecundatrix*).

¹ <http://www.pflanzengallen.de>

² <http://ephytia.inra.fr>

5-2- Utilisation des galles

Au cours des années et dans différentes populations, les galles ont été employées dans plusieurs domaines principalement dans la médecine traditionnelle. En Inde, les galles (exemple : *Rhus chinensis*, *Quercus infectori*, *Galla chinensis*, *Pistacia chinensis* ssp. *Integerrima*...) sont utilisés comme remède dans le traitement de la toux, la phtisie, l'asthme, la diarrhée, dysenterie, fièvre, vomissement, perte d'appétit, le saignement du nez, les piqûres de serpents, les piqûres de scorpion ou encore comme tonique et expectorant [24]. Ils sont également mélangés avec d'autres herbes comme remède potable par les femmes après l'accouchement pour restaurer l'élasticité de la paroi utérine en Malaisie. Certaines galles telles que *Quercus infectoria* possède des propriétés pharmacologiques telles que l'astringence, antidiabétique, antimicrobiens, anesthésiques locaux, antiviraux, antibactériens, antifongiques, larvicides et anti-inflammatoires [25]. En Chine, ils sont employées contre la dysenterie, la paralysie et pour le laquage des dents [26].

D'après **Dauphin (2012)** [23], certains anciens textes mentionnent les galles dans plusieurs remèdes contre les troubles gastro-intestinaux, respiratoires, en usage externe pour aider la cicatrisation, ou même contre les insomnies. En Algérie, il y a différentes utilisations tout dépend des régions parmi-elles, la préparation des galles en poudre, seules ou associées au souchet rond comme anti diarrhéique et stomachique [5]. Cependant ils ont aussi été très employés en teinture en raison de leur richesse en tanin, pour le tannage des peaux, il existe encore dans certains pays un commerce important de « noix de galles » à cet effet [26], dans la confection d'encres, mais semble abandonnée ; le principe général consiste en un mélange de galles broyées, de sels de fer et de gomme arabique [23]. De point de vue alimentaire, Certaines galles de Cynipides sont comestibles ; exemple : les galles produites sur *Salvia pomifera* et espèces voisines. D'après le Dictionnaire des Sciences médicales (**Adelon et Chaumeton, 1820**) [23] qui cite : « On mange, dans l'Orient, des galles que produit sur le *Salvia pomifera* Lin., la pique d'un insecte du genre Cynips. On vend ces galles dans les marchés de Constantinople. Dans l'île de Scio, au rapport d'olivier, on en prépare avec du sucre et du miel, une confiture très agréable, et regardée comme stomachique. ».

5-3-Etudes antérieures

Bien que les galles ont été découvertes depuis l'antiquité et utilisés comme remède dans plusieurs régions. La recherche approfondie de sa composition phyto-chimique et l'étude d'éventuelles activités biologiques ont récemment débuté. L'étude s'est plus centrée sur l'analyse des huiles essentielles et certaines activités biologiques, parmi les recherches : en Inde, on citera le travail de **Kaur et al. (2007)** [27] sur l'activité antioxydant des extraits éthanoliques des galles de *Quercus infectoria* et leur effet inhibiteur contre les altérations fonctionnelles induites par le stress oxydatif dans

les macrophages murins. Ils ont constaté que l'extrait éthanolique contenait une grande quantité de polyphénols, l'analyse HPLC a démontré la présence de 19,925% d'acide tannique et 8,75% d'acide gallique, possédait un puissant pouvoir réducteur contre le DPPH[•] (IC₅₀ = 0,5 g / ml), ABTS (IC₅₀ = 1 g / ml), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (IC₅₀ = 2,6 g / ml), l'hydroxyle (•OH) (IC₅₀ = 6 g / ml) et protège de façon significative les macrophages exposés au t-BOOH (ter-butyl hydroperoxide). Ainsi que **Rajopadhye et al. (2016)** [24] qui ont effectué un travail sur l'activité antioxydant (*in vitro* et *in vivo*) et l'activité hépato-protectrice de l'huile essentielle à partir de galles de *Pistacia chinensis* ssp. *Integerrima*. Les principaux composants de l'huile essentielle se sont révélés être l' α -pinène, le terpinène-4-ol, le β -pinène, le Δ^3 -carène, le limonène, le γ -terpinène et l' α -terpinéol. Ils présentent une activité antioxydante remarquable. Le prétraitement avec l'huile essentielle était efficace contre les dommages hépatiques chez les souris causées par le CCl₄ qui est un produit chimique toxique provoquant des lésions hépatiques aiguës. Les effets étaient comparables au médicament standard Silymarin.

En Malaisie, **Basri et Fan (2005)** [25] ont évalué le potentiel anti bactérien des extraits aqueux et acétoniques des galles de *Quercus infectoria* par détermination de la concentration minimale inhibitrice et la valeur de concentration minimale bactéricide contre trois bactéries Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus subtilis*) et trois bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli* NCTC 12079 sérotype O157: H7, *Salmonella typhimurium* NCTC 74 et *Pseudomonas aeruginosa* A TCC 27853). Les extraits des galles de *Q. infectoria* ont un fort potentiel en tant qu'agent antibactérien. Ce travail donne un aperçu de l'utilisation des galles de *Q. infectoria* dans le traitement traditionnel des plaies ou des brûlures associées à des infections bactériennes.

En Algérie, on évoquera deux travaux, le premier réalisé par **Gourine et al. (2011)** [28] sur l'évaluation de composition chimique de l'huile essentielle des galles non mûres de *Pistacia atlantica* Desf. dans la région de Laghouat. Le rendement des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des galles mâles et femelles a donné 0,53% et 0,46% v / w, respectivement. Ils ont été analysées par GC et GC-MS, montrant l'apparition chez les galles femelles le composé Δ^3 -carène à une teneur de 75,34%, par contre chez les galles males, deux composants majoritaires α -pinène (59.01%) et β -pinene (13.26%). Le second effectué par **Sifi et al. (2015)** [29] concernant l'évaluation de l'activité antimycobactérienne contre trois espèces de mycobactéries : *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* et *Mycobacterium fortuitum*, l'activité antioxydante à l'aide (DPPH et ABTS) et la cytotoxicité déterminée par le test de bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) sur des cellules de rein de singe (Vero) et des cellules de carcinome hépatocellulaire humain (C3A) des huiles essentielles des galles de *Pistacia atlantica* Desf. Les résultats obtenus confirment leur potentiel.

Références

- [1] Moreau, S. D., Benziene, A. S. D., Boudjadja, A. D., Gaouar, A. Ph. D., Kaabeche, M. D., Moali, A. D., Sellami, D. (2005). «Conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles des sites de MERGUEB (M'SILA), OGLETED DAIRA (NAAMA) et TAGHIT (BECHAR).» ALGERIE: Projet DGF/ GEF/ PNUD-ALG/00/G35., p69.
- [2] Djenidi, H. (2011). «Etude du pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne». Mémoire de Magistère, Université de Biskra (Algérie), 80p
- [3] Al-Saghir, M. G., Porter, D. M. (2011). «Taxonomic Revision of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae)» *American Journal of Plant Sciences*, vol 3: 13.
- [4] Monjausa, A. (1980) .«Connaissance du bétoum Pistacia atlantica Desf. Biologie et foret.» *Revue forestière française* ,vol 4: 357-363.
- [5] Mansour, Ch. (2011). «Contribution à l'étude de la répartition du pistachier de l'atlas (Pistacia atlantica Desf.) dans la wilaya de Naama- cas de Gaaloul». Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en foresterie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 115p.
- [6] Benabdallah, F. Z. (2011). «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.» Mémoire de magistère en Biologie, Option: Biotechnologie .Université Mohamed KHEIDER Biskra (Algerie), 76p.
- [7] Kaddour, H. A. (2008)«Contribution à l'étude du comportement morpho-physiologique et biochimique de Pistacia atlantica Desf. sp. atlantica stressé à la salinité.» .Mémoire de Magistère en physiologie végétale, option: Eco-physiologie végétale. Université d'Oran (Algérie), 94p.
- [8] Benhassaini, H., Bendahmane, M., Benchalco, N. (2007).«The chemical composition of fruits of Pistacia atlantica Desf. Subsp. atlantica from Algeria.» *Chemistry of Natural Compounds* 43 (2): 103-105.
- [9] Yaaqobi A., El Hafid L. and Haloui B. (2009).«Etude biologique de Pistacia atlantica.» *Biomatec Echo* ,3 (6): 39-49.
- [10] Achehab H. (2012).«Valorisation de l'huile des graines de Pistachier de l'Atlas (Pistacia atlantica Desf.), optimisation de l'extraction par presse et caractéristiques phytochimique.» Thèse doctorale en science agronomique. E.N.S.A El-Harrach (Algérie). 127p.
- [11] Yousfi, M., Nedjemi, B., Belal, R., Ben Bertal, D. (2003). «Étude des acides gras de huile de fruit de pistachier de l'Atlas algérien.» *OCL*, vol 10, n° 5-6: 425-427.
- [12] Ghalem, B., R., Benali, M. (2009).«Bactericidal activity of Pistacia atlantica. Desf mastic gum against certain pathogens.» *African Journal of Plant Science*, 3 (1): 13-15.
- [13] Benhammou N., Bekkara F., A., Panovska T., K. (2008).«Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts.» *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2) : 22-28.
- [14] Pourreza M., Shaw J., D., Zangeneh H. (2008).«Sustainability of wild pistachio (Pistacia atlantica Desf.) in Zagros forests, Iran.» *Forest Ecology and Management*, 255 (2008): 3667–3671.

- [15] Monaco P., Previtera L., Mangoni L. (1982). « Terpenes in Pistacia plants: A possible defence role for monoterpenes against gall-forming aphids.» *Phytochemistry*, 21 (9): 2408-2410.
- [16] Ansari, S., H., Ali, M., Quadry, J., S. (1993). «Tree new tetracyclic triterpenoids from Pistacia integerrimagalls.» *Pharmazie*, vol 49: 356-357. In mémoire Magistere (Djenidi, H.,2011).
- [17] Kawashty, S. A., Mosharrata, S., A., M., El Gibali, M., Saleh, N., A., M. (2000). « The flavonoids of four Pistacia species in Egypt.» *Biochemical Systematics and Ecology* vol 28: 915-917.
- [18] Shi, Q., Zuo, C. (1992). «Chemical components of the leaves of Pistacia chinensis Bge. » *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, vol 17: 422-446. In mémoire Magistere (Djenidi, H.,2011).
- [19] Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T., Xin, W., (2005). «Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of Pistacia.» *Biochimica Biophysica Acta*, 17(25) :103-110.
- [20] Kusmenoglu, S., Baser, K. H. C., Özek, T. (1995). «Constituents of the essential oil from the hulls of Pistacia veraL. » *Journal of Essential Oil Research*, vol 7: 44-442.
- [21] Gourine, N., Yousfi, M., Nadjemi B., and 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.
- [22] Ben Ahmed, Z. (2016) . «Antioxidant activity of phenolic extracts of Pistacia atlantica leaves.». A Doctoral thesis in sciences, Specialty: Chemistry. University Amar Telidji- Laghouat (Algeria):, 218p.
- [23] Dauphin, P. (2012). « *Guide des galles de France et d'Europe* ». Edition Belin, Paris, pp. 7-25.
- [24] Rajopadhye, A., A., Upadhye, A., S., Dandge, C., N., and Naik, D., G. (2016).«Essential Oil From Leaf Galls on Pistacia chinensisssp. integerrima: Chemical Composition, In Vitro and In Vivo Antioxidant and Hepatoprotective Activity » *TEOP* 19(7): 1648 - 1659.
- [25] Basri, D., F. , Fan, S., H. (2005). «The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quer cus infectoria as antibacterial agents.» *Indian J Pharmacol*, vol 37: 26-29.
- [26] Chevalier, A. (1923). «Les Galles de Chine et leur origine.» *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 3(24) : 513-522.
- [27] Kaur, G., Athar, M., Alam, S., M. (2007). «Quercus infectoriagalls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages.» *Chemico-Biological Interactions* 171(2008): 272–282.
- [28] Gourine, N., Sifi, I., Gaydou, E. M. and Yousfi, M. (2011).«Chemical Composition of the Essential Oil of Unripe Galls of Pistacia atlanticaDesf. from Algeria.» *The Natural Products Journal*, 1(2): 125-127.
- [29] Sifi, I., Dzoyem, J. P., Ouinten, M. Yousfi, M., McGaw, L. J. and Eloff, N., J. (2015). «Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of Pistacia atlantica Desf. from Algeria.» *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 12 (3): 150-155.

Chapitre 02

*Optimisation des conditions d'extraction des
galles de *P. atlantica**

1-Introduction

L'extraction est une étape importante pour la récupération et l'identification des composés phénoliques à partir du matériel végétal. Elle est influencée par plusieurs facteurs qui peuvent être la nature chimique des composés (simples ou complexes), la méthode d'extraction utilisée (extraction par solvants, par ultrason ...etc.) et le temps et les conditions de stockage [1]. L'extraction par ultrason a été prouvée pour accélérer l'extraction par solvant des composés bioactifs à partir de plante [2]. Elle offre beaucoup d'avantages tels que la réduction des solvants, de la température et du temps d'extraction, ce qui est très bénéfique pour l'extraction de composés thermolabiles et instables [2]. En plus des facteurs mentionnés au-dessus d'autres peuvent également influencer l'efficacité de l'extraction, le rendement des polyphénols et l'activité antioxydante tels que le temps d'extraction, la température d'extraction et le rapport solide-liquide. Ainsi, il est nécessaire d'optimiser ces paramètres pour obtenir le maximum de ces composés phénoliques [3].

Traditionnellement, l'optimisation a été réalisée en variant un seul facteur à la fois, les autres restent constants. Cette méthode était laborieuse, coûteuse et lente, y compris qu'elle ne mettait pas en considération les interactions de divers facteurs [3], donc ne représentait pas les effets complets des paramètres sur la réponse [4]. La méthode des surfaces de réponse (MSR) peut surmonter ces difficultés [3]. En outre, MSR nécessite un nombre réduit d'expériences et moins de temps et de travail. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée avec succès pour modéliser et optimiser l'extraction de composés phénoliques de différentes sources [4, 5, 6, 7].

De nombreux modèles ont été exploités pour l'optimisation de l'extraction tels que le plan factoriel complet, plan de Plackett-Burman, plan de Taguchi, plan composite centré (CCD) et plan de Box-Behnken [6]. Parmi ces options, le plan Box-Behnken (BBD) est couramment utilisé pour optimiser l'extraction des constituants bioactifs [7].

2-Terminologie

Facteurs sont des grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses [8].

Réponse est généralement notée y [9]. C'est une grandeur mesurable que l'on observe lorsqu'on fait varier les facteurs étudiés [10].

Espace expérimental est définie par un repère cartésien à deux ou plusieurs dimensions (**figure 01**), cet espace comprend tous les points du plan (facteur1 x facteur2). S'il y a un troisième facteur, il est représenté aussi par un axe orienté et gradué, et positionné perpendiculairement aux deux premiers [9].

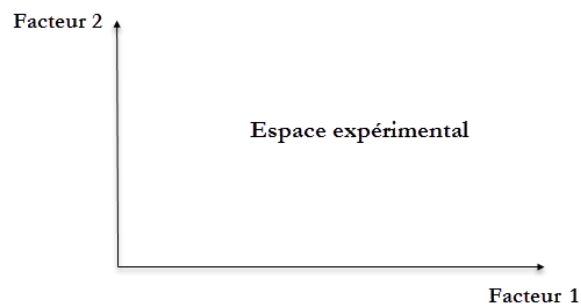


Figure 01 : Représentation graphique des axes présentant les facteurs et l'espace expérimental [9].

Domaine du facteur appelé aussi le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut (**figure 02**) [9].

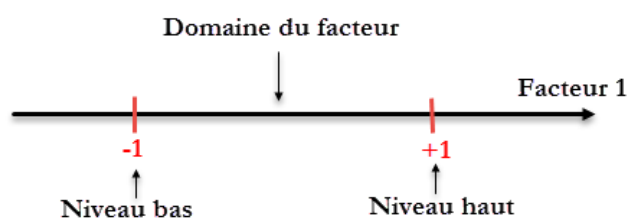


Figure 02 : Représentation graphique d'un domaine du facteur [9].

Point expérimental est obtenu par l'intersection de deux niveaux (X_1 , X_2) dans un espace expérimental (**figure 03**) [11].

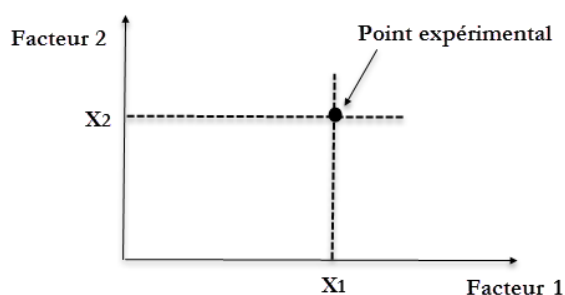


Figure 03 : Représentation schématique des niveaux des facteurs définissant un point expérimental [11].

Domaine d'étude est défini comme étant l'espace où tous les points expérimentaux se regroupent, ce domaine d'étude est délimité par les niveaux bas et haut de chaque facteur (**figure 04**) [10].

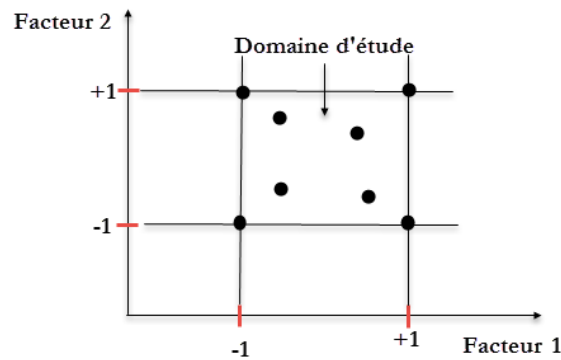


Figure 04 : Représentation schématique d'un domaine d'étude [9].

3-Plan d'expérience

Il est issu des méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation [12]. Présenté sous forme de matrice comportant autant de colonnes que de facteurs (m), et autant de lignes que d'expériences (n), de niveaux ou de modalités retenus pour l'expérimentation [10].

De manière générale, la méthode des plans d'expériences permet de déterminer et à établir les liens existant entre 2 types de variables qui sont la réponse et les facteurs. Pour cela, il faut établir un modèle, exprimant la réponse en fonction des facteurs [8].

La méthode des plans d'expérience se repose sur deux principales utilisations qui sont :

➤ La technique du screening

C'est un outil qui permet de déterminer, parmi un ensemble initial de facteurs, les éléments influents. Il s'agit donc d'un procédé de sélection ou de criblage [8].

➤ La méthode des surfaces de réponse

Les réponses sont calculées en fonction des facteurs jugés influents. C'est une étude quantitative car l'objectif est de savoir comment la réponse varie [8].

4- Surfaces de réponse

L'ensemble des points du domaine d'étude correspond à un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse (**figure 05**) [9].

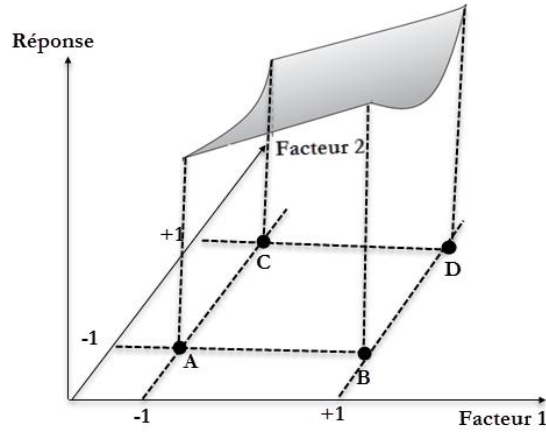


Figure 05 : L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse [9].

4-1-Modélisation mathématique

La méthode des surfaces de réponse est un ensemble de technique mathématiques se basant sur la conception expérimentale pour déterminer la portée des variables d'entrée indépendantes [13]. Pour cela, On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs, dont la formulation la plus générale est la suivante [9]:

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k) \quad (01)$$

Où f est la fonction-réponse qui dépend des variables aléatoires x_i indépendantes ;

Si l'on suppose, par exemple, que la réponse doit être linéaire à l'ensemble des facteurs, la forme du modèle s'écrit comme telle [14] :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{j>i}^{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} a_{ij} X_i X_j \quad (02)$$

Par contre, si la réponse est une fonction plus compliquée, il y a l'utilisation d'autre modèle, par exemple un polynôme d'ordre 2 [14]:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{j>i}^{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2 \quad (03)$$

Où y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée [9].

$-X_i$ représente un niveau du facteur i ,

- X_j représente un niveau du facteur j,

- a_0 a_i a_{ij} a_{ii} sont des coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences [9].

4-2-Le modèle de l'expérimentateur

Deux compléments doivent être apportés au modèle purement mathématique.

-Le premier complément est le « manque d'ajustement (lack of fit en anglais). Ce dernier représente l'écart entre le modèle a priori choisi par l'expérimentateur et le modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles) [9].

-Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En mesurant plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, les résultats seront dispersés. Cette différence est appelée erreur aléatoire ou expérimentale (pure error en anglais). Donc La formule générale (01) doit être modifiée ainsi [9] :

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k) + \Delta + \varepsilon \quad (04)$$

Où

Δ : Le manque d'ajustement

ε : L'erreur aléatoire

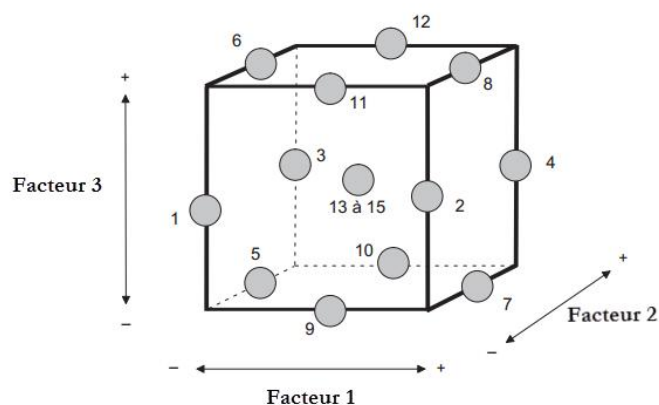
5-Plan de Box-Behnken

Box et Behnken (1960) ont présenté un type de plan d'expérience pour des modèles du deuxième ordre et qui permet l'estimation de certaines interactions [10]. Tous les facteurs comme l'indique le **tableau 01** ont trois niveaux : -1, 0 et +1 [9].

Tableau 01 : La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour 3 facteurs [11].

n° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	0	- 1	- 1
2	+ 1	0	- 1
3	0	+ 1	- 1
4	- 1	0	- 1
5	- 1	- 1	0
6	+ 1	- 1	0
7	+ 1	+ 1	0
8	- 1	+ 1	0
9	- 1	- 1	+ 1
10	+ 1	0	+ 1
11	0	+ 1	+ 1
12	- 1	0	+ 1
13	0	0	0

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est illustré par la **figure 06**, a une forme cubique et n'exigent que 12 essais accompagnés d'un point central. Dans la pratique, il y a la réalisation de (3 à 4) points centraux [11].

**Figure 06** : Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs [9].

6-Applications du plan de Box-Behnken (PBB)

Le plan de Box-Behnken est un outil qui est extrêmement exploité pour l'optimisation dans différents secteurs notamment pour l'extraction des métabolites secondaires dans diverses parties des plantes tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes ou encore les huiles essentielles. Cette

optimisation via la méthode des surfaces de réponse a été étudiée par de nombreux chercheurs qui ont fait usage du PBB, on évoquera quelques-unes :

En génie agronomique, **Zaddem (2014)** [13], fait l'étude sur l'application de la méthode des surfaces de réponse en choisissant le plan Box-Behnken pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain.

En chimie, on cite l'étude d'**Alberti et al. (2013)** [15] sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des pommes, les trois études sur l'optimisation de l'extraction par ultrason réalisées par **Yang et al. (2010)** [2] à partir des fleurs de *Citrus aurantium. Var. Amara Engl*, **Jennan et al. (2014)** [16] à partir de la plante *T. hyemalis* et **Majd et al. (2014)** [5] à partir des feuilles de *Phlomischema parviflorum*, l'étude d'**Akalin et al. (2015)** sur l'optimisation de l'extraction d'huile de sauge [6], les travaux de **Wu et al. (2015)** [7] sur l'optimisation de l'extraction des alcaloïdes anti-tumoraux à partir des tiges de *Berberis amurensis* ou encore l'étude faite par **Ben Ahmed (2016)** [17] concernant l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *P. atlantica*.

Cependant, Comme il n'existe aucune étude concernant l'optimisation d'extraction des composés phénoliques des galles de *P. atlantica*. Par conséquent, l'objectif de la présente étude est d'optimiser les paramètres tels que le temps, le rapport solide-liquide et la température d'extraction et d'étudier leurs effets et leur interactions à l'aide de la méthode des surfaces de réponse, en employant le plan Box-Behnken.

7-Matériel et Méthodes

7-1-Réactifs chimiques

Le méthanol, folin-Ciocalteu, acide gallique, DPPH, vanilline, quercétine, Catéchine, chlorure de fer (FeCl_3) et phénanthroline sont de marque Sigma- Aldrich. Le bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), vitamine E (α -tocophérol), Vitamine C (acide ascorbique) et Acide chlorhydrique (HCl) sont de la marque Fluka.

7-2-Matériel végétal

Les galles des arbres du *Pistacia atlantica* (**Figure 07**) ont été collectées en 2010 du mois de Septembre (G09) au sud de la wilaya de Laghouat. Le matériel végétal a été nettoyé, étalé sur papier, laissé à température dans une pièce aérée à l'abri de la lumière pendant une semaine et protégé de l'humidité. Une fois séché, les galles ont été broyées, tamisées et conservées dans des sacs en papier jusqu'à leur utilisation.



Figure 07 : Galles de *P. atlantica* dans la région de Laghouat.

7-3-Méthodes

Les composés phénoliques peuvent être extraits par divers solvants et méthodes d'extraction. L'extraction par solvants est la méthode la plus commune utilisée pour isoler des antioxydants naturels [18]. De nos jours, différentes techniques d'extraction novatrices ont été développées pour l'extraction de composés phénoliques à partir de sources végétales. Parmi ces méthodes, l'extraction par bain ultrason qui offre un rendement élevé pour des courtes périodes, une manipulation simplifiée et une diminution de la température réduite [19]. D'où l'intérêt de l'utiliser dans nos travaux.

Les cavitations ultrasonores créent des forces de cisaillement qui perturbent mécaniquement les parois cellulaires et augmentent le processus de transfert de masse. En outre, il n'y a pas de réaction chimique au cours de l'extraction par ultrasons ce qui peut empêcher une dégradation chimique probable des composés ciblés [20].

Afin d'optimiser les meilleures conditions pour l'extraction des composés phénoliques des galles du *Pistacia atlantica*, deux étapes ont été procédées :

- La première est de faire une analyse préliminaire pour trouver la valeur qui permet de donner le maximum de rendement de l'extraction des composés phénoliques à partir de galle (G09) de *Pistacia atlantica* pour trois paramètres (temps, température et rapport (solide/liquide)) ;
- La seconde est d'exploiter les effets de variables indépendantes et leurs interactions dans l'extraction des composés phénoliques pour optimiser les conditions d'extraction à l'aide de la méthode des surfaces de réponse.

7-3-1-Analyse préliminaire

L'objectif de l'étude préliminaire des conditions d'extraction a été de sélectionner à partir d'un intervalle de chaque facteur, la valeur qui permet de donner le maximum de rendement des

composés phénoliques totaux, en variant l'un des trois paramètres étudiés et fixant les deux autres et ainsi de suite. L'étude préliminaire a été répétée trois fois.

7-3-1-1-Le temps d'extraction

1g de poudre de galles (G09) de *P. atlantica* a été mélangée avec 25 ml de méthanol pur et placée dans un appareil ultrasonique (Joident Ultrasonic- Cleaner, METO 5, Ningbo, Chine) à une température fixée à 25°C avec un temps d'extraction qui varie de 5 à 60 min avec un intervalle de 5 min . L'extrait a été filtré et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur 45°C. Le résidu a été solubilisé dans 5 ml de méthanol puis les composés phénoliques totaux ont été quantifiés.

7-3-1-2- La température d'extraction

A un temps de 45 min et un rapport liquide/solide de (1g/25ml), les échantillons ont été extraits à une température qui varie de 20°C à 65°C pour un intervalle de 5°C. Tous les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C. Le résidu a été solubilisé dans 5 ml de méthanol puis les composés phénoliques totaux ont été quantifiés.

7-3-1-3- Le rapport solide-liquide

L'extraction a été effectuée en plusieurs séries de rapport solide-liquide dans un intervalle (1 :10 à 1 :90 g/ml), tandis que le temps et la température sont fixés à 45 min 50°C, respectivement. Les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C. Le résidu a été solubilisé dans 5 ml de méthanol puis les composés phénoliques totaux ont été quantifiés.

7-3-2-Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Ribéreau-Gayon (1968)** [21] et avec quelques modifications. 100 µl de chaque extrait ont été introduits dans des tubes secs, suivis de l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 à 3 minutes, 2 ml de bicarbonates de sodium Na₂CO₃ (2%) ont été incorporées, les solutions ont été mélangé à l'aide d'un vortex et immédiatement maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japon). La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**annexe 01**) et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG /g MS). Le dosage a été répété 3 fois pour calculer la moyenne.

7-3-3-Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux ont été analysés en utilisant une méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium [22]. Le complexe jaune flavonoïde-aluminium formé absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 430nm. 500µl de chaque extrait a été mélangé avec 500µl avec une solution de chlorure d'aluminium à 2%. Le mélange a été incubé à une température ambiante et pendant 15 minutes. L'absorbance du mélange a été mesurée à 430 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japon). La quercétine a été utilisée comme étalon (flavonoïde de référence). La teneur des flavonoïdes a été calculé comme étant la moyenne (n = 3) et exprimé en mg équivalent en quercétine par g de matière sèche.

7-3-4-Dosage des tanins condensés

La teneur en tanin condensé a été déterminée selon la méthode vanilline décrite par **Broadhurst et Jones (1978)** [23] avec quelques modifications. (1%) de vanilline a été mélangé avec 8% (v/v) de HCl. Le réactif a été maintenu à une température de 30°C. 1ml de ce dernier a été ajouté à 200µl d'extrait. Le mélange a ensuite été incubé pendant 15 min à 30° C. L'absorbance a été mesurée à 500 nm. Les résultats ont été calculés comme étant la moyenne (n = 3) et ont été obtenus en mg d'équivalent en catéchine par g de matière sèche.

7-3-5-Activité anti-oxydante

7-3-5-1-Test DPPH• (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

Le test DPPH• a été réalisé selon la méthode décrite par **Du et al. (2013)** [24] avec des modifications mineures. 1ml de solution méthanolique de DPPH• (250µM) a été mélangé avec 1 ml de chaque extrait. La préparation a été mélangée à l'aide d'un vortex et laissée pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La diminution de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm. La capacité antioxydante (CA) a été exprimée en mg d'équivalents en acide ascorbique (vitamine C) par g matière sèche. L'expérience a été répétée 3 fois pour calculer la moyenne. Le calcul de CA a été réalisé en utilisant l'équation suivante :

$$CA = \frac{(Abs_C - Abs_E)}{\alpha} \cdot D \cdot V$$

Abs_C : Absorbance du contrôle (sans l'ajout de l'extrait) ;

Abs_E : Absorbance en présence de l'extrait (DPPH• restant après la réaction avec l'extrait) ;

α : La pente de la courbe d'étalonnage De l'acide ascorbique (vitamine C) ;

D : Nombre de dilution de l'extrait ;

V : Le volume total de l'extrait (10ml) ;

7-3-5-2-Test de chélation de fer

L'activité chélatante du fer est également une mesure de l'activité antioxydante. La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-phénanthroline selon la méthode **Qureshi et al. (2009)** [25] avec quelques modifications. 500µl d'extrait a été mélangé avec 500µl d'une solution phénanthroline (0,4% dans l'éthanol). En suite, 250µl d'une solution de chlorure ferrique (FeCl₃) (0,12% dans l'éthanol) a été ajouté au milieu réactionnel à température ambiante. Le mélange a été laissé incuber pendant 3 à 4 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du Fer résiduelle qui forme un chromophore rouge-orangé ayant un maximum d'absorption à 510nm. La capacité antioxydante a été exprimée en mg d'équivalents en tocophérol (vitamine E) par g matière sèche. L'expérience a été répétée 3 fois pour calculer la moyenne.

7-3-6-Matrice d'expériences

Le modelé expérimental est basé sur le plan **Box-Behnken** pour 3 facteurs temps (X₁), température (X₂) et le rapport (solide/liquide) (X₃) et à trois niveaux (-1, 0 et 1) dont les résultats permettent de construire une surface de réponse. Le plan expérimental est constitué de 45 essais répartis en 15 points factoriels dont 3 répétitions au centre afin de déterminer l'erreur pure (**tableau 03**).

Sur la base des données expérimentales, un modèle polynomial de second ordre correspondant au modèle **Box-Behnken** a été appliqué pour corréler la relation entre les variables indépendantes et la réponse pour prédire les conditions optimisées. Le modèle quadratique a été construit selon l'équation suivante [17]:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (05)$$

Y : représente la réponse ;

b_0 : représente la valeur moyenne théorique de la réponse (interception) ;

$b_1b_2b_3$: sont les coefficients des termes linéaire ;

$b_{11}b_{22}b_{33}$: sont les coefficients des termes quadratiques ;

$b_{12}b_{13}b_{23}$: sont les coefficients des termes d'interaction.

7-3-7-Analyse statistique

Les résultats expérimentaux de l'analyse préliminaire à un seul facteur ont été évalués par le logiciel Excel 2013. Toutes les données ont été répétées trois fois afin de calculer la moyenne. Le logiciel JMP (Version 10. SAS, USA) a été utilisé pour déterminer les coefficients des polynômes pour chaque réponse. L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour la vérification de la signification des coefficients du modèle ($p < 0,05$). Le test F et la valeur-p ont été utilisés pour vérifier l'importance du coefficient de régression. L'adéquation du modèle a été déterminée en évaluant le manque d'ajustement.

8-Résultats et Discussion

8-1- Résultats de l'étude préliminaire sur les conditions d'extraction des composés phénoliques

Dans un test préliminaire, Trois facteurs (temps, le rapport solide/liquide et température) qui influencent sur la teneur des composés phénoliques des galles de *Pistacia atlantica*, ont été étudiés afin de sélectionner la valeur de chaque facteur la plus importante qui correspond à la teneur des composés phénoliques la plus élevée et de choisir par la suite le domaine expérimental des facteurs incluant dans le MSR.

8-1-1- Temps d'extraction

Le temps d'extraction est un paramètre très important car il a une influence sur le contact entre le solvant et la matière solide [2]. L'effet du temps d'extraction sur la teneur des composés phénoliques est représenté sur la **figure 08**. Le temps d'extraction a été varié de 5 à 60 min. Tandis que les autres conditions d'extraction ont été fixées comme suit : température (25 ° C) et le rapport (S/L) (1:25 g/ml).

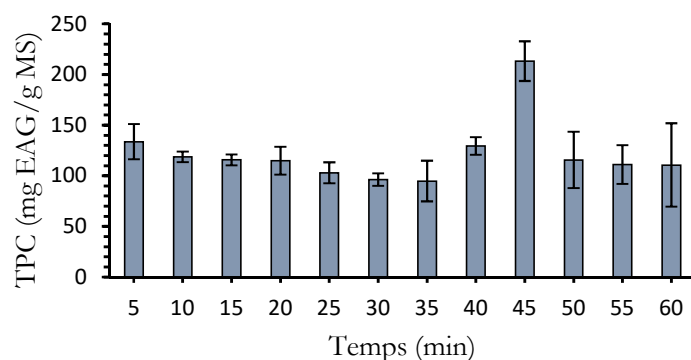


Figure 08 : Effet du temps d'extraction sur la teneur des composés phénoliques totaux des galls de *Pistacia atlantica* (G09).

La teneur des composés phénoliques des galls de *Pistacia atlantica* atteint une valeur maximale de 213,21 (mg EAG / g MS) à un temps d'extraction de 45min. De 50 min à 60 min, les teneurs des CPT n'augmentent plus, ce qui veut dire que le temps d'extraction prolongé n'est pas utile pour extraire plus de composés phénoliques. D'après la deuxième loi de diffusion de Fick, il y a un équilibre final entre les concentrations de soluté dans la matrice solide et le solvant après une durée particulière [5]. Par conséquent, le point central du temps d'extraction choisi pour MSR est de 45min.

8-1-2-Température d'extraction

La **figure 09** montre l'effet de la température d'extraction (de 20 à 65°C) sur la teneur des composés phénoliques totaux des galls de *Pistacia atlantica* (G09). Les autres conditions d'extraction ont été fixées comme suit : temps (45 min) et le rapport (S/L) (1 :25 g/ml).

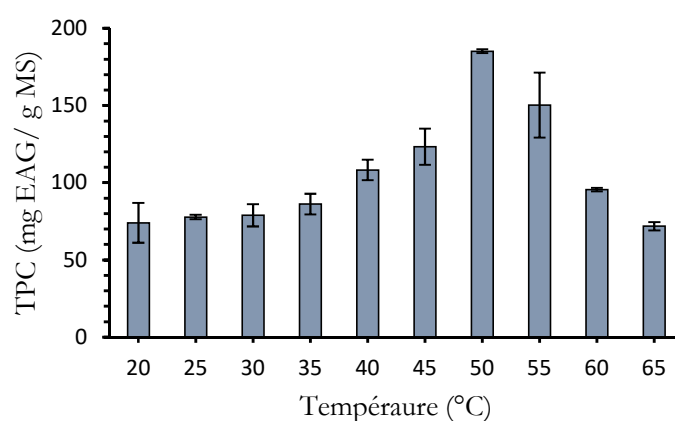


Figure 09 : Effet de température d'extraction sur la teneur des composés phénoliques totaux des galls de *Pistacia atlantica* (G09).

la teneur totale en composés phénoliques a atteint son maximum à une température d'extraction de 50°C. D'après les études réalisées par **Prasad et al. (2011)** [3] sur l'écorce du fruit *Mangifera pajang Kosterm* et **Pompeu et al. (2009)** [26] sur les fruits d'*Euterpe oleracea* ont rapporté que la plus grande teneur en composés phénoliques a été obtenu en voisinage de 58°C. L'élévation de la température améliore la solubilité des composés phénoliques, augmente la rapidité du taux de diffusion et réduit la viscosité des solvants [3]. Selon les études de **Gan et Latiff (2011)** [27], ils ont obtenu à partir des gousses d'haricots une valeur maximale à une température de 35°C. Cependant, le temps d'extraction utilisé est de 1h et 40 min, Contre 45 min de temps d'extraction dans la présente étude. L'augmentation de la température d'extraction est utile pour augmenter le taux d'extraction, mais éventuellement réduire le temps d'extraction [3]. Néanmoins, une certaine limite de température doit être considérée pour éviter la dégradation des polyphénols thermosensibles [5].

8-1-3-Rapport solide-liquide

L'effet du rapport solide-liquide sur l'extraction des composés phénoliques des galles *P. atlantica* a été évalué à l'aide de onze rapports (1 :10, 1 :15, 1 :20, 1 :25, 1 :30, 1 :40, 1 :50, 1 :60, 1 :70, 1 :80, 1 :90 g/ml) sur une période d'extraction de 45 min, à 50 ° C (**figure 10**).

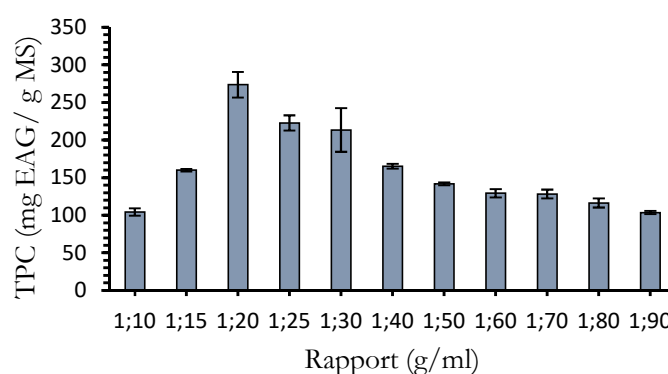


Figure 10 : Effet du rapport (S/L) sur la teneur des composés phénoliques totaux des galles de *Pistacia atlantica* (G09).

D'après la **figure 10**, le rapport (S/L) qui permet d'avoir un taux élevé de composés phénoliques est de 1 :20 (g/ml). Ce résultat est similaire avec les études réalisées par **Tabaraki et Nateghi (2011)** [28] sur le son du riz, **Prasad et al. (2011)** sur l'écorce du fruit *Mangifera pajang Kosterm* et **Jennan et al. (2014)** [16] sur *T. hyemalis*. Ce qui est probablement dû à la solubilité accrue des composés phénoliques [3]. Or, une augmentation supplémentaire du rapport (S/L) de 1:20 (g/ml) a entraîné une diminution de la teneur en composés phénoliques.

8-2-Domains expérimentaux des facteurs

Les trois facteurs (temps, température et rapport solide/liquide) influant sur l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques sont des facteurs continus et quantitatifs, c'est-à-dire qu'on peut maîtriser le réglage, et qui peuvent adopter toutes les valeurs numériques réelles dans un intervalle choisi. Ainsi, le **tableau 02** présente les facteurs et leurs domaines de variation.

Tableau 02 : Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des galles (G09) du *Pistacia atlantica*.

Variables		Niveaux		
		-1	0	1
Temps (min)	X ₁	40	45	50
Rapport (solide/liquide) (g/ml)	X ₂	1:10	1:20	1:30
Température (°C)	X ₃	40	50	60

8-3-Optimisation des conditions d'extraction

La méthode des surfaces de réponse a permis de déterminer une relation d'approximation entre les variables d'entrée (temps, rapport solide-liquide et température) et les réponses de sortie. Cette relation est formulée par un polynôme de second degré. Ce dernier permettra d'optimiser les paramètres de la réaction d'extraction afin d'atteindre des réponses souhaitables. Pour optimiser le processus d'extraction des composés phénoliques totaux à partir des galles de *Pistacia atlantica*, un temps d'extraction de 45 min, un rapport solide-liquide de 1 :20 (g/ml) et une température d'extraction de 50 ° C ont été choisis comme condition centrale de la matrice expérimentale de **Box-Behnken**. Cette dernière et les réponses (CPT, Flavonoïdes, Tanins, DPPH[•] et test phénanthroline) sont présentées dans le **tableau 03**. Les valeurs de CPT, Flavonoïdes, Tanins, DPPH[•] et test phénanthroline varient de 52,48 à 139,88 mg EAG/ g MS, de 1,08 à 2,43 mg EQ/g MS, de 45,90 à 121,32 mg EC/g MS, de 32,12 à 65,94 mg EAA/ g MS et de 240,35 à 501,38 mg ET/ g MS respectivement. La teneur maximale en (TPC, Flavonoïdes et Tanins) et la meilleure activité anti-oxydante (DPPH[•] et test phénanthroline) ont été enregistrées pour un temps d'extraction de 40 min, rapport solide-liquide de 1 :20 (g/ml) et une température d'extraction de 60°C.

Tableau 03 : La matrice expérimentale de **Box-Behnken** pour trois facteurs (X_1 , X_2 et X_3) et leurs réponses (la moyenne des composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes, tanins, DPPH et le test phénanthroline (TPT) exprimé en (mg/g matière sèche).

Exp.	Facteurs			Réponse				
	X_1 (min)	X_2 (g/ml)	X_3 (T°C)	CPT	Flav.	Tanin	DPPH	TPT
1	0 (45)	0 (20)	0 (50)	127,30 (123,10)	2,24 (2,26)	109,00 (106,83)	60,50 (60,48)	427,42 (441,13)
2	-1 (40)	0 (20)	1 (60)	139,90 (140,30)	2,43 (2,60)	121,32 (125,75)	65,94 (67,60)	501,38 (457,20)
3	1 (50)	-1 (10)	0 (50)	68,31 (70,00)	1,30 (1,45)	53,22 (56,45)	32,12 (33,85)	282,95 (279,73)
4	0 (45)	-1 (10)	-1 (40)	52,50 (52,10)	1,08 (1,10)	45,90 (47,11)	32,93 (32,85)	351,28 (310,31)
5	-1 (40)	-1 (10)	0 (50)	102,02 (100,32)	1,90 (1,85)	93,13 (89,65)	56,30 (56,10)	404,41 (409,65)
6	1 (50)	0 (20)	1 (60)	117,00 (114,87)	2,22 (2,25)	109,00 (106,71)	50,31 (50,04)	400,43 (364,70)
7	0 (45)	1 (30)	-1 (40)	66,41 (65,10)	1,16 (1,35)	55,91 (56,86)	35,72 (37,18)	315,01 (276,06)
8	0 (45)	0 (20)	0 (50)	121,71 (123,10)	2,18 (2,26)	105,42 (106,83)	61,42 (60,50)	472,90 (441,13)
9	1 (50)	1 (30)	0 (50)	101,24 (102,94)	1,74 (1,72)	84,47 (87,95)	54,67 (54,90)	386,23 (381,00)
10	1 (50)	0 (20)	-1 (40)	86,02 (85,62)	1,50 (1,32)	71,17 (66,73)	47,50 (45,83)	315,94 (360,14)
11	-1 (40)	1 (30)	0 (50)	89,24 (88,45)	2,07 (1,92)	83,06 (79,83)	47,91 (46,20)	256,27 (259,50)
12	0 (45)	-1 (10)	1 (60)	99,10 (100,41)	2,35 (2,16)	93,46 (92,51)	48,07 (46,61)	354,40 (393,35)
13	-1 (40)	0 (20)	-1 (40)	74,84 (76,94)	1,61 (1,57)	70,50 (72,75)	41,57 (41,84)	240,35 (276,10)
14	0 (45)	1 (30)	1 (60)	109,00 (109,36)	2,26 (2,24)	105,65 (104,44)	53,30 (53,40)	337,71 (378,70)
15	0 (45)	0 (20)	0 (50)	120,29 (123,10)	2,35 (2,26)	106,07 (106,83)	59,53 (60,50)	423,05 (441,13)

Les valeurs entre parenthèse ont été obtenues à l'aide du logiciel JMP, calculées à partir de l'équation de régression multiple (**Eq. 05**). Ces valeurs prévisibles sont plus proches des valeurs expérimentales indiquant la pertinence du modèle.

Des équations de régression multiple suivantes ont été obtenues à partir de modèle (**Eq. 05**) en intégrant les variables indépendantes (X_1 , X_2 et X_3) et leurs coefficients indiqués dans le tableau :

$$\text{CPT} = 123.1 - 4.2 X_1 + 5.5 X_2 + 23.1 X_3 + 11.4 X_1 X_2 - 8.5 X_1 X_3 - 1.0 X_2 X_3 - 5.1 X_1^2 - 27.8 X_2^2 - 13.6 X_3^2 \quad (\text{Eq. (06)})$$

$$\text{Flavonoïde} = 2.3 - 0.14 X_1 + 0.08 X_2 + 0.48 X_3 + 0.05 X_1 X_2 - 0.03 X_1 X_3 - 0.04 X_2 X_3 - 0.15 X_1^2 - 0.37 X_2^2 - 0.17 X_3^2 \quad (\text{Eq. (07)})$$

$$\text{Tanin} = 106.8 - 6.3 X_1 + 5.4 X_2 + 23.2 X_3 + 10.3 X_1 X_2 - 3.3 X_1 X_3 + 0.5 X_2 X_3 - 5.3 X_1^2 - 23.1 X_2^2 - 8.5 X_3^2 \quad (\text{Eq.(08)})$$

$$\text{DPPH} = 60.5 - 3.4 X_1 + 2.8 X_2 + 7.5 X_3 + 7.7 X_1 X_2 - 5.4 X_1 X_3 + 0.6 X_2 X_3 - 1.9 X_1^2 - 10.8 X_2^2 - 7.2 X_3^2 \quad (\text{Eq.(09)})$$

$$\text{PT} = 441.1 - 2.1 X_1 - 12.2 X_2 + 46.4 X_3 + 62.9 X_1 X_2 - 44.1 X_1 X_3 + 4.9 X_2 X_3 - 41.9 X_1^2 - 66.8 X_2^2 - 34.7 X_3^2 \quad (\text{Eq.(10)})$$

La manière la plus fiable d'évaluer la qualité du modèle adapté est l'application de l'analyse de variance (ANOVA). L'ANOVA consiste à connaître les effets de plusieurs facteurs sur une réponse et décide de prendre ou non en compte cet effet [14]. L'analyse de la variance des modèles polynomiaux du second ordre pour la teneur en (CPT, Flavonoïdes, Tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline) des galles *P. atlantica* (G09) est résumée dans le **tableau 04**.

Le coefficient de détermination (R^2) mesure l'adéquation entre le modèle issu d'une régression multiple et les données expérimentales observées [2]. Il est de l'ordre de 0.99, 0.93, 0.98, 0.98 et 0.82, signifiant que uniquement 1%, 7%, 2%, 2% et 18% des variations n'ont pas été expliquées par les modèles pour CPT, Flavonoïdes, Tanins, DPPH[•] et test phénanthroline, respectivement. Plus le R^2 est proche de 1, plus le modèle expérimental correspond aux données réelles. Cependant, si la valeur de R^2 est faible, indique que certaines variables importantes n'ont pas été prises en compte dans le modèle [5]. Le R^2 ajusté est une version modifiée du R^2 , il est ajusté pour tenir compte du nombre de variable dans le modèle [29]. L'analyse de la variance des CPT, Flavonoïdes, Tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline a donné une valeur de R^2 (ajusté) de 0.98, 0.81, 0.96, 0.96 et 0.49 respectivement. Ainsi, le R^2 ajusté n'augmente que si les variables améliorent le modèle plus que prévu par le hasard ou bien diminue lorsque les variables améliorent le modèle moins que prévu par le simple hasard. Le R^2 ajusté est toujours inférieur au R^2 [29].

Tableau 04 : L'analyse de la variance des modèles polynomiaux du second ordre.

Régression	R^2	R^2 (ajusté)	Rapport F du modèle	Valeur-p	Défaut d'ajustement	Défaut d'ajust. (valeur-p)
Y_{CPT}	0.99	0.98	103.81	<.0001*	0.48	0.72
$Y_{\text{Flavonoïde}}$	0.93	0.81	7.90	0.0174*	8.14	0.11
Y_{Tanin}	0.98	0.96	39.04	0.0004*	9.12	0.10
$Y_{\text{DPPH}^{\bullet}}$	0.98	0.96	48.19	0.0003*	5.96	0.14
$Y_{\text{Pht.}}$	0.82	0.49	2.55	0.1574	5.65	0.15

La valeur-p a été utilisée pour vérifier la signification de chaque coefficient, elle est inférieure à 0,05 ce qui indique que ces modèles sont significatifs et que l'équation de régression s'adapte très bien à la situation réelle reflétant la relation entre l'extraction des composés phénoliques des galles (G09) et les conditions d'extraction (temps, rapport solide-liquide et température) [2]. A l'exception de celui du test phenanthroline qui est de 0.1574. En pratique, cette valeur est toujours significative sinon le modèle est absolument inutile [17]. En outre, le défaut d'ajustement ($p > 0,05$) renforce également la fiabilité et l'adéquation des modèles [28]. Les valeurs-p du défaut d'ajustement sont de 0.72, 0.11, 0.10, 0.14 et 0.15 pour CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline, respectivement, ce qui implique que l'ajustement de ces modèles est adéquat pour décrire les données expérimentales.

La signification de chaque coefficient a également été déterminée en utilisant le tes-t et la valeur-p. Les résultats ont été donnés dans le **tableau 05**. D'après les valeurs p de chaque terme de modèle, les coefficients ayant le plus d'influence significative sur les réponses sont : le coefficient linéaire de la température d'extraction (b_3) et quadratique du rapport solide/liquide (b_{22}). En outre, l'interaction entre le temps d'extraction et le rapport solide-liquide (b_{12}), le terme quadratique de la température d'extraction (b_{33}) et le terme linéaire du temps d'extraction (b_1) ont tendance à être significatifs pour la plupart des réponses.

Tableau 05 : Coefficients de régression et leurs significations statistiques.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Valeur-p
CPT				
b_0	123,1	1,8	69,3	< .0001*
b_1	-4,2	1,1	-3,8	0,012*
b_2	5,5	1,1	5,1	0,004*
b_3	23,1	1,1	21,3	<.0001*
b_{12}	11,4	1,5	7,4	0,0007*
b_{13}	-8,5	1,5	-5,5	0,003*
b_{23}	-1,0	1,5	-0,7	0,54
b_{11}	-5,1	1,6	-3,2	0,024*
b_{22}	-27,8	1,6	-17,4	<.0001*
b_{33}	-13,6	1,6	-8,5	0,0004*
Flavonoïdes				
b_0	2,3	0,11	19,71	<.0001*
b_1	-0,14	0,07	-2,12	0,09
b_2	0,08	0,07	1,18	0,29
b_3	0,48	0,07	6,97	0,0009*
b_{12}	0,05	0,09	0,53	0,62
b_{13}	-0,03	0,09	-0,25	0,81
b_{23}	-0,04	0,09	-0,43	0,69
b_{11}	-0,15	0,10	-1,41	0,22
b_{22}	-0,37	0,10	-3,62	0,015*
b_{33}	-0,17	0,10	-1,66	0,16
Tanins				
b_0	106,8	2,7	40,0	<.0001*
b_1	-6,3	1,6	-3,8	0,01*
b_2	5,4	1,6	3,3	0,02*
b_3	23,2	1,6	14,2	<.0001*
b_{12}	10,3	2,3	4,5	0,007*
b_{13}	-3,3	2,3	-1,4	0,22
b_{23}	0,5	2,3	0,2	0,82
b_{11}	-5,3	2,4	-2,2	0,08
b_{22}	-23,1	2,4	-9,6	0,0002*
b_{33}	-8,5	2,4	-3,6	0,02*
Test DPPH*				
b_0	60,5	1,0	55,0	<.0001*
b_1	-3,4	0,6	-5,0	0,004*
b_2	2,8	0,6	4,1	0,009*
b_3	7,5	0,6	11,2	<.0001*
b_{12}	7,7	0,9	8,2	0,0004*
b_{13}	-5,4	0,9	-5,7	0,002*
b_{23}	0,6	0,9	0,6	0,55
b_{11}	-1,9	0,9	-1,9	0,10
b_{22}	-10,8	0,9	-10,9	0,0001*
b_{33}	-7,2	0,9	-7,3	0,0007*
Test PT				
b_0	441,1	31,0	14,2	<.0001*
b_1	-2,1	19,0	-0,1	0,92
b_2	-12,2	19,0	-0,6	0,55
b_3	46,4	19,0	2,4	0,06
b_{12}	62,9	26,9	2,3	0,07
b_{13}	-44,1	26,9	-1,6	0,16
b_{23}	4,9	26,9	0,2	0,86
b_{11}	-41,9	27,9	-1,5	0,19
b_{22}	-66,8	27,9	-2,4	0,06
b_{33}	-34,7	27,9	-1,2	0,27

Significatif avec $p < 0.05$. (*) valeur-p inférieur à 0.01.

8-4-Analyse des diagrammes des surfaces de réponse

Les diagrammes de surface des modèles quadratiques sont obtenus en maintenant une variable constante au niveau central et en faisant varier les deux autres dans les limites expérimentales qui sont : 40 à 50 min de temps d'extraction, 1 :10 à 1 :30 (g/ml) de rapport solide-liquide et 40 à 60°C de température d'extraction. Ils permettent d'illustrer les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur chaque variable de sortie [13].

Les diagrammes de surface de réponse tridimensionnelle (a, b, c, d et e de la **figure 11**) illustrent la relation entre la teneur (des CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline) des galles (G09) de *P. atlantica* et les deux variables expérimentales (temps d'extraction et le rapport solide-liquide) à une température fixe de 50°C. Le rapport solide-liquide a démontré une influence prononcée sur la teneur (des CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline) de manière quadratique (**tableau 05**), le temps d'extraction a eu un effet positif un peu plus long sur les TPC, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline. Une quantité plus élevée a été produite à un rapport solide-liquide entre 1 :20 à 1 :25 (g/ml) et un temps d'extraction compris entre 43-47 min. Ce comportement est en accord avec l'étude réalisée par **Jennan et al. (2014)** [16] qui ont expliqué que lorsque le rapport solide-liquide augmente, le solvant s'introduit dans les cellules permettant aux composés phénoliques de se libérer dans l'extrait. Par contre, l'influence du temps d'extraction est limitée, ce qui confirme également les résultats obtenus par **Ben-Ahmed (2016)** [17].

Les effets du temps et de la température d'extraction sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et test phénanthroline des galles de *P. atlantica* à un rapport solide-liquide constant de 1 :20 (g/ml) ont été montrés dans la **figure 12** (diagrammes a, b, c, d et e, respectivement). Les deux variables ont une influence indépendante sur les réponses (CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline). La température d'extraction a un effet beaucoup plus important que le temps d'extraction, cela est dû majoritairement au terme linéaire de la température (b_3), l'effet quadratique de la température d'extraction (b_{33}) et secondairement le terme linéaire du temps d'extraction (**tableau 05**). Les teneurs les plus élevées ont été observées à des intervalles de temps d'extraction entre 43 à 45 min et à des températures situées entre 50 à 60°C.

Cela a également été observé par **Bachir bey et al. (2014)**, qui ont constaté que l'extraction des composés phénoliques était liée au temps et à la température de telle sorte que le transfert de masse augmente avec le temps jusqu'à ce que le maximum d'extraction soit atteint et la température accélère la diffusion [30]. Ou encore l'étude réalisée par **Tabaraki et Nateghi (2011)** [28] sur les

extraits phénoliques du son de riz, indiquant que la teneur phénolique totale des extraits de son de riz a augmenté avec une température croissante jusqu'à 54 ° C puis suivie d'une légère diminution.

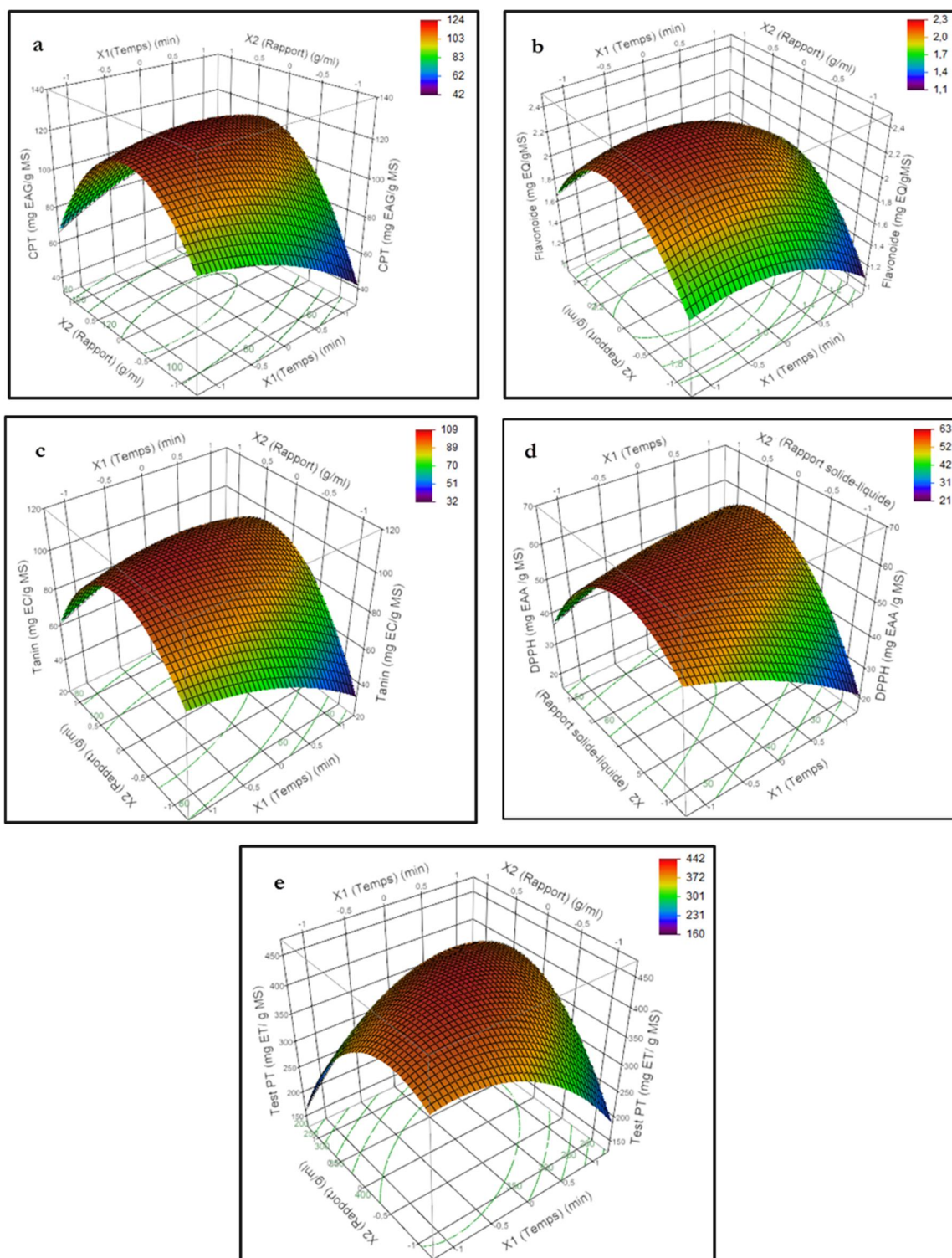


Figure 11 : Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et le rapport solide-liquide sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline (PT).

Le chauffage de l'extrait adoucit les tissus végétaux, provoquant l'affaiblissement des parois cellulaires, l'hydrolyse des liaisons des composés phénoliques liés aux d'autres composés (phénolprotéine ou phénol-polysaccharide) et l'amélioration de la solubilité des composés phénoliques permettant par la suite une meilleur distribution dans le solvant [28].

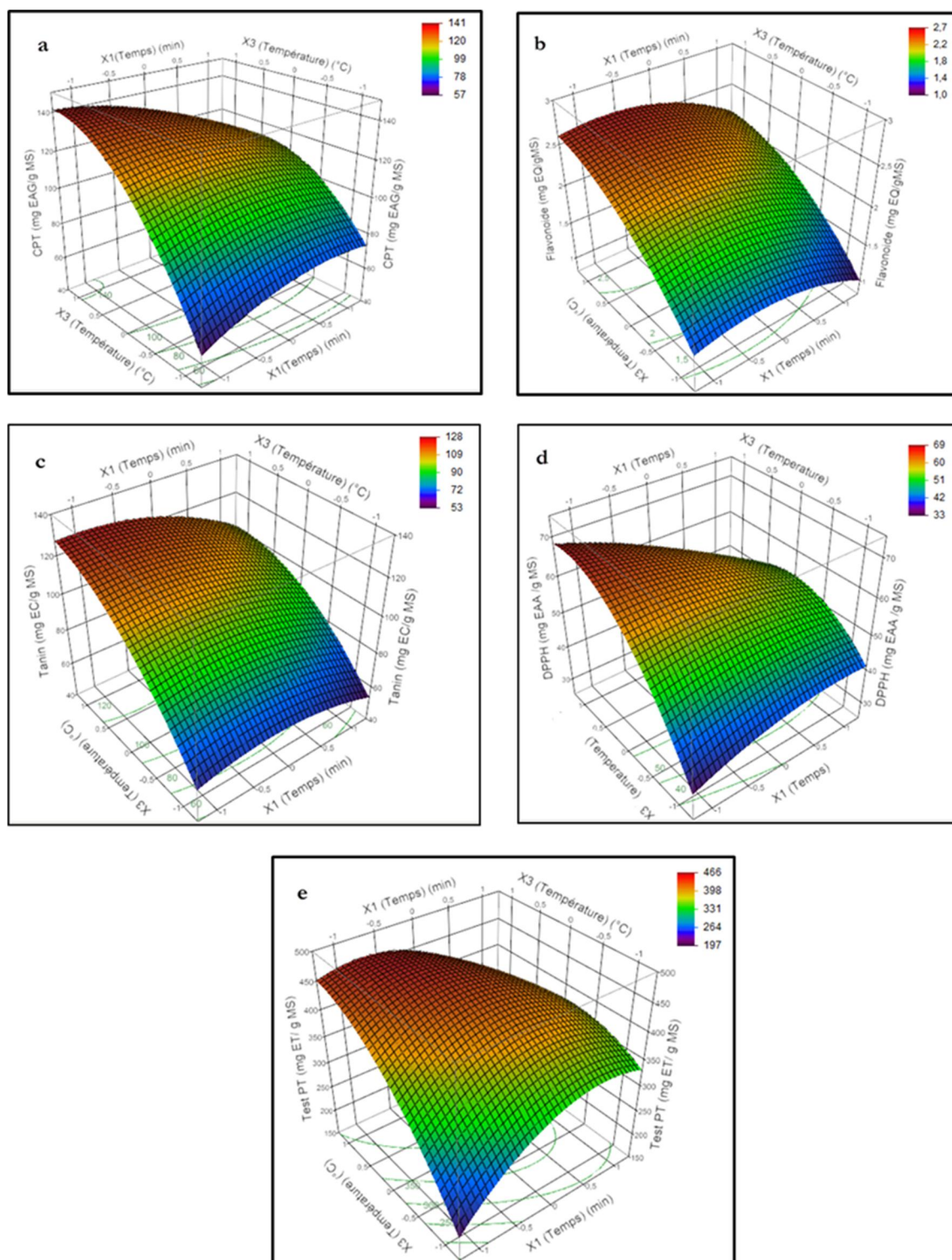


Figure 12 : Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du temps et la température d'extraction sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline (PT).

L'influence du rapport solide-liquide (X_2) et de la température d'extraction (X_3) sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et test phénanthroline des galls (G09) de *P. atlantica* à un temps d'extraction fixé à 45 min, a été présentée dans la **figure 13** diagrammes a, b, c, d et e, respectivement.

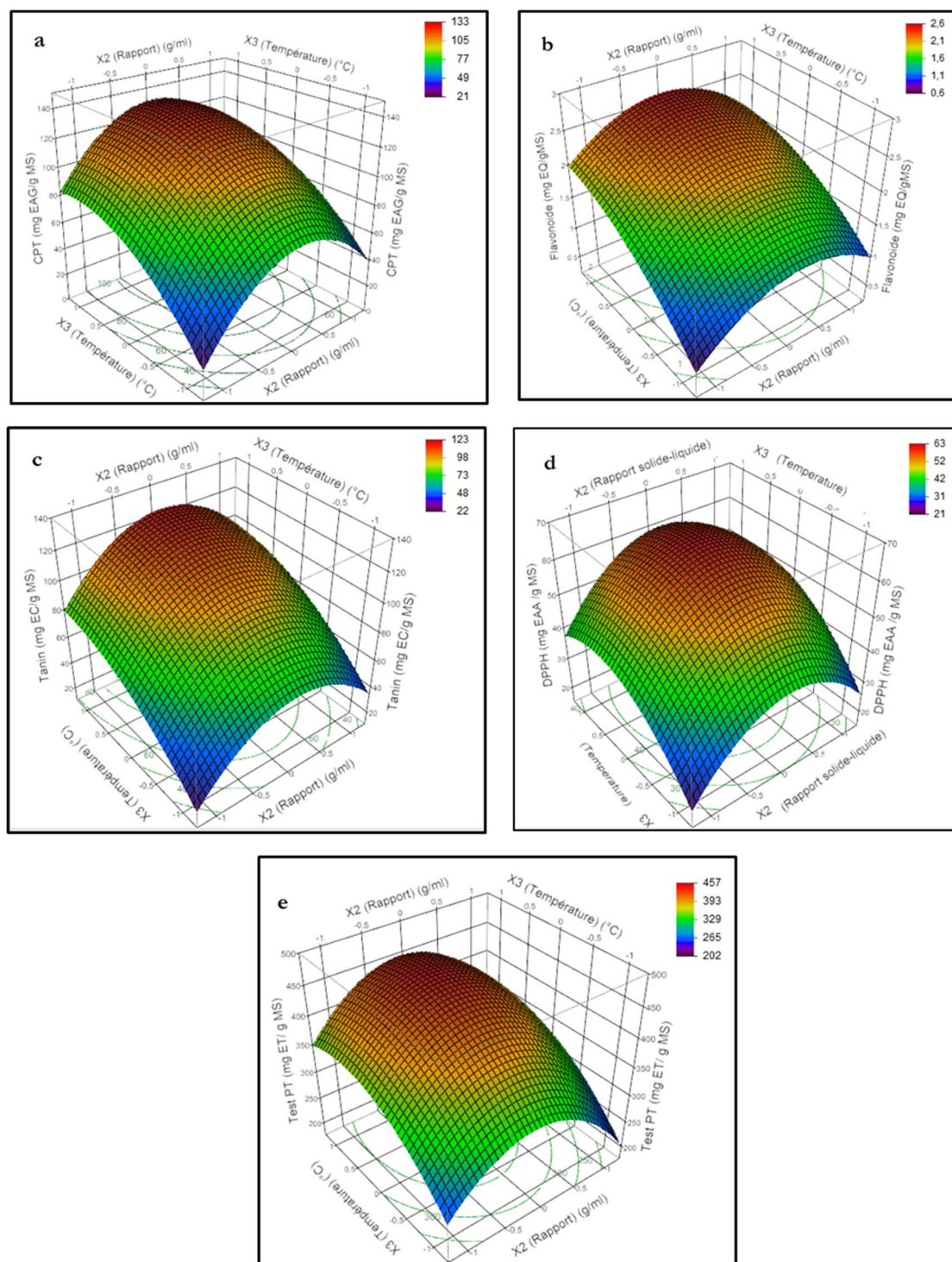


Figure 13 : Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solide-liquide et la température d'extraction sur les CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline (PT).

Ainsi, les deux variables affectent fortement les polyphénols et les deux activités étudiées, ce qui explique les formes des surfaces de réponse qui sont principalement dues aux termes linéaires et quadratiques (b_3 , b_{33}) de la température d'extraction et le terme quadratique (b_{22}) du rapport solide-liquide. Les teneurs des CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline les plus élevées ont été observés à des rapports solide-liquide intermédiaires et à des températures d'extraction de 50 à 60°C.

De ce qui précède, le rapport solide-liquide a joué un rôle le plus important dans l'extraction des composés phénoliques (CPT, flavonoïdes et tanins) et l'activité antioxydante (DPPH[•] et le test phénanthroline), suivi de la température et faiblement le temps d'extraction.

8-4-Validation des conditions optimales d'extraction selon le profileur de prévision

Dans cette partie, l'objectif était de vérifier la capacité prédictive du modèle et de déterminer la meilleure combinaison des conditions d'extraction des galles (G09) de *Pistacia atlantica*. Le logiciel JMP a permis d'estimer les valeurs prédites par la valeur de désirabilité variant de 0 à 1 avec des valeurs parfaites lorsque $d = 1$, et des valeurs acceptables lorsque $d > 0,7$ [13]. Dans notre cas, le but était de maximiser la valeur de CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline. Les résultats de l'optimisation sont présentés dans les deux **figures 14** et **15**.

Les conditions optimales pour les CPT, flavonoïdes et tanins (**figure 14**) sont les suivantes, un temps d'extraction de [40-49] min, un rapport solide-liquide de 1 :20(g/ml) et une température d'extraction de 60°C. Les réponses prévues pour la combinaison optimale sont CPT= 140.71 (mg EAG/g MS), flavonoïdes= 2.26 (mg EQ/g MS) et tanins =125.96 (mg EC/g MS) avec une désirabilité de 0.89, 0.99 et 0.93, respectivement.

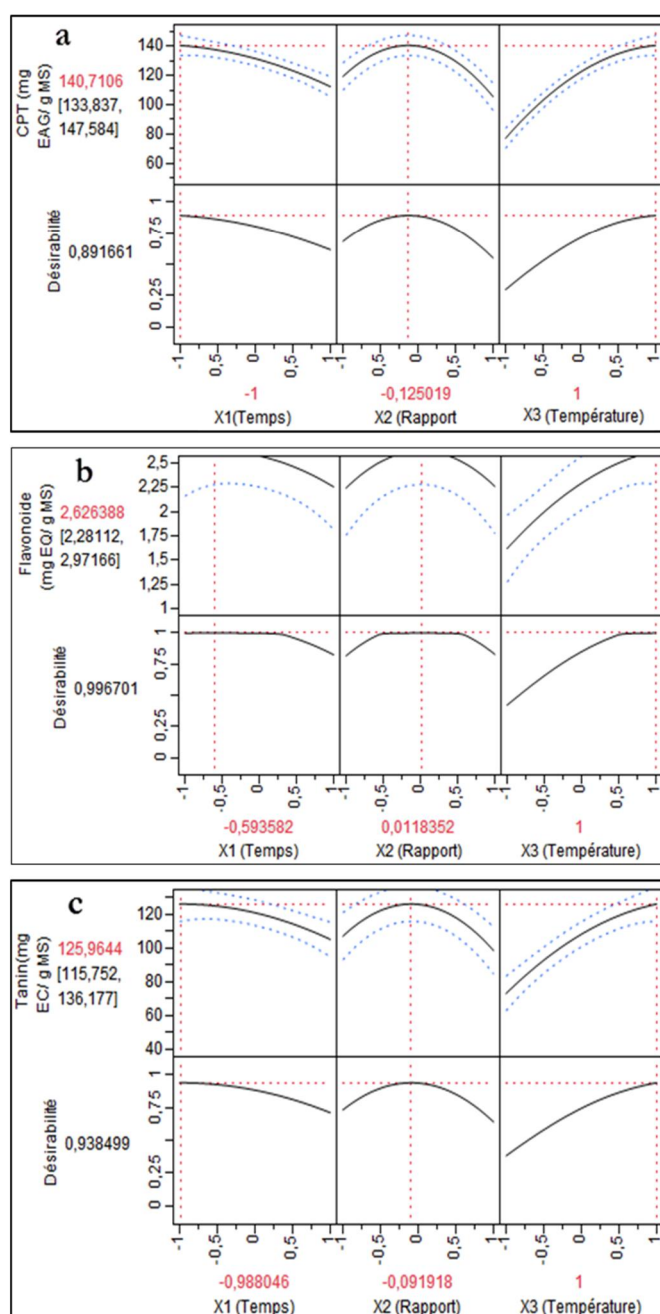


Figure 14 : Combinaison optimale pour une meilleure extraction des CPT, flavonoïdes et tanins et les réponses prévues.

La **figure 15** illustre les conditions optimales pour le test DPPH[•] et le test phénanthroline qui sont les suivantes, un temps d'extraction de 40 min, un rapport solide-liquide de 1 :20(g/ml) et une température d'extraction de 60°C. Les réponses prévues pour la combinaison optimale sont DPPH[•]= 68.12 (mg EAA/g MS) et le test phénanthroline= 475.80 (mg ET/g MS) avec une désirabilité de 0.93 et 0.77, respectivement. Dans des conditions optimales, les valeurs expérimentales des CPT, flavonoïdes, tanins, DPPH[•] et le test phénanthroline qui sont

respectivement de 139.88 (mg EAG/g MS), 2.43 (mg EQ/g MS), 121.32 (mg EC/g MS), 65.94 (mg EAA/g MS) et 501.38 (mg ET/g MS) sont proches des valeurs prédites citées au-dessus.

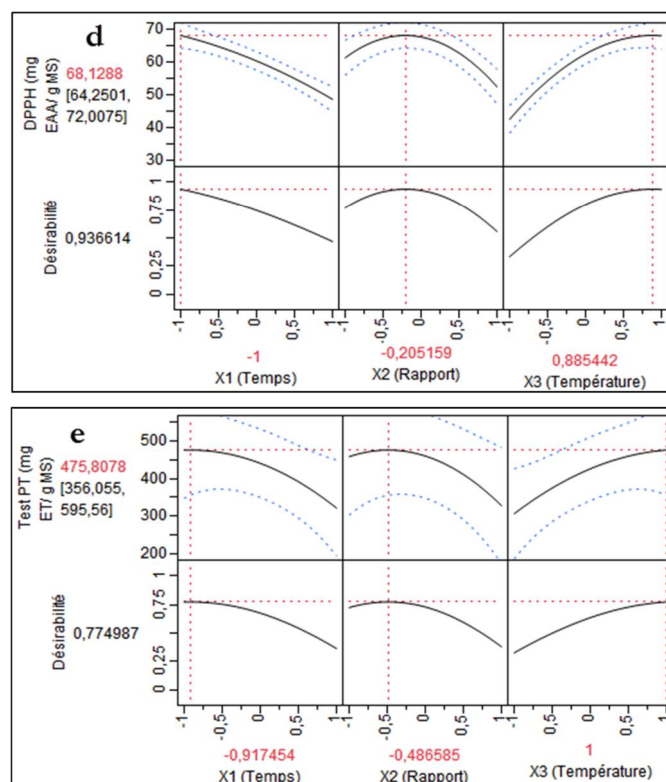


Figure 15 : Combinaison optimale pour une meilleure activité antioxydante (DPPH[•] et le test phénanthroline) et les réponses prévues.

9-Conclusion

Une technique d'extraction par ultrason a été appliquée pour l'extraction des composés phénoliques à partir des galles (G09) de *P. atlantica* collectés dans la région de Laghouat et optimisée par la méthode des surfaces de réponse. Un modèle du second ordre a été employé pour calculer la teneur des CPT, flavonoïdes, tanins et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits par les deux tests (DPPH[•] et phénanthroline). Afin d'atteindre les performances d'extraction maximales et une meilleure activité antioxydante, un temps d'extraction de 40 min, un rapport solide-liquide de 1 :20 (g/ml) et une température d'extraction de 60°C ont été prédits comme conditions opératoires optimales. Le rapport solide-liquide s'est révélé être le paramètre le plus significatif de tous les paramètres utilisés, influençant la performance d'extraction obtenue par les galles de *P. atlantica*.

Références

- [1] Chirinos, R., Rogez, H. Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y.(2006). «Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers,» *Separation and Purification Technology* ,55(2007):217–225.
- [2] Yang, L., Cao, Y. L., Jiang, J. G., Lin, Q. S., Chen, J., Zhu, L.(2010). «Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl,» *J. Sep. Sci.*, vol. 33:1349–1355.
- [3] Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A. and Ismail, A.(2011). «Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels,» *Food Chemistry* ,128 (2011):1121–1127.
- [4] Nassiri, H., Arabi, H., Hakim, S. and Bolandi, S. (2011).«Polymerization of propylene with Ziegler–Natta catalyst: optimization of operating conditions by response surface methodology (RSM),» *Polym. Bull*, 67:(7) 1393–1411.
- [5] Majd, M. H., Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavif, S. A. and Bolourian, S. (2014).«Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology,» *Industrial Crops and Products* , vol. 57 :195–202.
- [6] Akalın, M. K., Tekin, K., Akyüz, M. and Karagöz, S. (2015).«Sage oil extraction and optimization by response surface methodology,» *Industrial Crops and Products* , vol. 76 :829–835.
- [7] Wu, J., Yu, D., Sun, H., Zhang, Y., Zhang, X. and Meng, F. (2015).«Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology,» *Industrial Crops and Products*, vol. 69: 68–75.
- [8] Vivier, S. (2002).«Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électroniques modélisés par éléments finis».Thèse de doctorat, spécialité: Génie électrique , Lille (France).
- [9] Goupy, J. and Creighton, L. (2006).«Introduction aux plans d'expériences». Dunod, Paris, 324p.
- [10] Kimouche, K. (2008).«Etude de quelques plans d'expériences associées aux surfaces de réponse». Mémoire de Magister, Constantine (Algérie).
- [11] Goupy, J. (2006).«Les plans d'expériences». *Revue MODULAD*, pp. 74-116.
- [12] Faucher, J. (2006).«Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue», Thèse de doctorat, spécialité: Génie électrique et automatique.Toulouse (France),198p.
- [13] Zaddem, M. (2014).«Application de la méthode des surfaces de réponse pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain». Mémoire de maître ès sciences en génie agroalimentaire.Québec (Canada), 110p.
- [14] Ducauze, C. (2014).«Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie concepts, démarche et méthodes». *Lavoisier Tec and Doc*, Paris, 366p.
- [15] Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A. and Mafra, L. I. (2013). «Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology,» *Food Chemistry* , 149 (2014):151–158.

- [16] Jennan, S., Farah, A. and Mahjoubi, F. (2014). «Optimisation of ultrasound assisted extraction of T.hyemalis using the response surface methodology», *J. Mater. Environ. Sci.*, 6(13): 773-778.
- [17] Ben Ahmed, Z. (2016). «Antioxidant activity of phenolic extracts of *Pistacia atlantica* leaves.», Doctoral thesis in sciences, Specialty: Chemistry. University Amar Telidji. Laghouat (Algeria), p. 218p.
- [18] Wijekoon, M., Bhat, R., and Karim, A. A. (2011). «Effet of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of Bunga Kantan (*Etilingera elatior Jack*) inflorescence», *Journal of food composition and analysis*, vol. 24: 615-619.
- [19] Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., and Chemat, F. (2010). «Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.),» *Food chemistry*, vol. 119: 851-858.
- [20] Wang, L., Li, D., Bao, C., You, J., Wang, Z., Shi, Y. and Zhang, H. (2008). «Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum*,» *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 15: 738-746.
- [21] Boizot, N. and Charpentier, J. (2006). «Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.», *Cah. Tech. INRA*, vol. 1: 9-82.
- [22] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W. (2012). «Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method», *Industrial Crops and Products*, 44 (2013): 566– 571.
- [23] Chupin, L., Motillon, C., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A. and 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 (2013): 897– 903.
- [24] Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. (2013). «Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts», *Food Chemistry*, 153 (2014) : 279–284.
- [25] Qureshi, M. N., Kuchekar, B. S., Logade, N. A. and Haleem, M. A. (2009). «Antioxidant and hepatoprotective activity of *Cordia macleodii* leaves», *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 17: 299–302.
- [26] Pompeu, D. R., Silva, E. M. and Rogez, H. (2009). «Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology», *Bioresource Technology*, vol. 100 : 6076–6082.
- [27] Gan, C., and Latiff, A. A. (2010). «Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology», *Food Chemistry*, 124 (2011): 1277–1283.
- [28] Tabaraki, R. and Nateghi, A. (2011). «Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology», *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18: 1279–1286.
- [29] Frost, J. (2013). «Multiple regression analysis: Use adjusted R-squared and predicted R-squared to include the correct number of variables. The Minitab Blog». Available at <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics/multiple-regression-analysis-use-adjusted-r-squared-and-predicted-r-squared-to-include-the-correct-number-of-variables> Accessed: 05.09.14.
- [30] Bachir bey, M., Meziant, L., Benchikh, Y. and Louaileche, H. (2014). «Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity», *Food Chemistry*, vol. 162 : 277–282.

Chapitre 03

*Effets des variations mensuelles et du genre sur
les composés phénoliques et les activités
antioxydantes des galls de *P. atlantica**

1-Introduction

Le métabolisme secondaire des plantes constitue un grand réservoir de composés phytochimiques [1]. Contrairement au métabolisme primaire, qui est nécessaire à la croissance de la plante, le métabolisme secondaire est lié aux conditions même de vie de la plante : celle-ci doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, virus ...etc. [2].

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs groupes selon leurs origines biosynthétiques et leurs caractéristiques structurales [1]. Parmi eux, les polyphénols qui sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal [3], présents dans les vacuoles des tissus [2]. Ces composés phénoliques sont d'actualité en raison de multiples propriétés biologiques et pharmacologiques (les antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens, anti-allergènes, anti-cancérogènes ...etc.) qui ont des effets bénéfiques sur la santé [4].

Les espèces réactives d'oxygène (ERO) qui sont hautement actives, entraînent des risques aggravés liés à l'aboutissement des chaînes réactionnelles radicalaires et dégradent les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides [5]. Leur implication dans plusieurs maladies métaboliques telles que les maladies cardiaques, le syndrome d'immunodéficience acquise, le diabète sucré, l'arthrite, le cancer, troubles du foie, etc. [6] ainsi que la remise en question de l'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse à cause des risques toxicologiques potentiels [3] ont conduit à la recherche des antioxydants naturels tels que les polyphénols [3].

Plusieurs études ont découverts la présence de divers métabolites secondaires à partir du genre *Pistacia* [7]. De plus, différentes parties de l'espèce *Pistacia atlantica* ont révélé avoir des grandes activités pharmacologiques telles que les activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-hyperglycémiques [8].

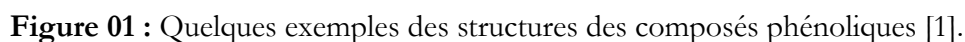
2-Composés phénoliques

2-1-Généralités

Les termes « phénol » et « polyphénol » ont eu plusieurs définitions qui ont subis au cours des années des améliorations. Les polyphénols ont été définis comme étant de substances possédant un cycle aromatique portant un (phénol) ou plusieurs (polyphénols) ayant des hydroxyles substituants, cependant cette définition n'est pas complète, puisque, il inclurait des composés tels que les caroténoïdes qui sont des terpénoïdes [9, 1]. Une autre définition fondée sur la proposition

de White, Bate-Smith et Swain et qui a été mentionné par **Haslam** en **1998** déclarant que le terme « polyphénol » en se référant aux tanins, sont des composés hydrosolubles ayant une masse moléculaire entre 500 à 4 000 Da, possédant environ 12 à 16 groupements phénoliques et 5-7 anneaux aromatiques pour une masse moléculaire relative à 1000 Da [10, 1]. Ensuite, cette définition a été plus élargie, intégrant des composés phénoliques avec des structures plus simples. Donc, les polyphénols naturels peuvent être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins [11], ayant tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées, avec ou non d'autre fonctions (alcoolique (OH)), carboxylique (COOH) [12].

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure [12]. Ils ont été classés à partir de leur squelette de base (**figure 01**) [1]: C_6 (Phénols simples, benzoquinones), $C_6 - C_1$ (Acides phénoliques), $C_6 - C_2$ (Acétophénone, acides phénylacétiques), $C_6 - C_3$ (Acides hydroxycinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromones), $C_6 - C_4$ (Naphthoquinones), $C_6 - C_1 - C_6$ (Xanthonés), $C_6 - C_2 - C_6$ (Stilbènes, anthraquinones), $C_6 - C_3 - C_6$ (Flavonoïdes, isoflavonoïdes), $(C_6 - C_1)_2$ (Tanins hydrolysables), $(C_6 - C_3)_2$ (Lignanes, néolignanes), $(C_6 - C_3 - C_6)_2$ (Biflavonoïdes), $(C_6 - C_3)_N$ (lignines), $(C_6)_N$ (Catéchol mélanines), $(C_6 - C_3 - C_6)_N$ [1].



En plus de leur participation aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV....) [12], les composés phénoliques ont également des rôles importants en tant que pigments (rouges, bleus et violets), comme antioxydants, chélateurs

de métaux, agents de signalisation, des écrans d'éclairage UV [1] ou également dans l'amélioration de la qualité organoleptiques des aliments [5].

3- La biosynthèse des composés phénoliques

L'origine de la biosynthèse des composés phénoliques provient de deux voies différentes. La première, la voie acétate/malonate qui est liée au métabolisme des acides gras, les noyaux aromatiques sont formés à partir de l'union de 3 unités acétate ou malonate activées par le coenzyme A [12]. La seconde, la voie de l'acide shikimique qui est liée au métabolisme des glucides et des acides aminés aromatiques. La condensation du phosphoénolpyruvate (produit de la glycolyse) et l'erythrose-4-phosphate (produit du cycle du pentose phosphate) conduit à la formation d'un intermédiaire : l'acide shikimique [12]. Ce dernier, soit se transforme en acide hydroxybenzoïque (exemple acide gallique) [12], soit conduit à la formation des acides aminés aromatiques : phénylalanine et tyrosine. La phénylalanine est le substrat de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), qui catalyse la première réaction de la voie phénylpropanoïde conduisant à la formation de la plupart des composés phénoliques [13]. La désamination de phénylalanine par PAL conduit à la formation de l'acide cinnamique qui est ensuite hydroxylé à l'acide para-coumarique (origine de nombreuses molécules) par l'action de cinnamate 4-hydroxylase (C4H) [12]. Au final ces acides subissent une estérification [13] en se combinant avec des composés organiques, car ils sont rarement à l'état libre [12]. Par exemple, Les liaisons avec différentes molécules organiques (Coenzyme A ou acide quinique) entraînent la formation du *p*-coumaroyl CoA. Ce dernier avec 3 molécules de malonyl-CoA par le biais de la chalcone synthase (CHS) et avec une succession d'étapes conduisent à la formation des flavonoïdes (C6-C3-C6) [12, 13]. Des modifications peuvent survenir telles que l'hydroxylation, la méthylation ou encore la glycosylation permettant l'élaboration d'une diversité vis-à-vis des structures phénoliques [13].

4-Classifications des composés phénoliques

Il existe plusieurs classifications des composés phénoliques [14]. L'une d'elle est selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones [5].

4-1- Les formes simples

Les formes phénoliques les plus simples regroupent des structures à nombre de carbone qui varie de C6 à C15 [12]. Citons parmi eux :

4-1-1- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (**figure 02**) [15].

Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque sont des acides phénoliques ayant une structure de base en C6-C1, très communs, aussi bien à l'état libre qu'à l'état lié par ester ou hétéroside [5].

Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique : sont divisés en deux catégories, ceux en C6-C3 (exemples : acides *o*-coumarique, caféique, férulique, sinapique) sont les plus distribués et les autres sont peu fréquents (acides *o*-coumarique, *o*-férulique) [5].

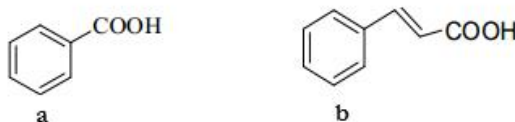


Figure 02 : Structure de l'acide hydroxybenzoïque (a) et de l'acide hydroxycinnamique (b) [11].

4-1-2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [14]. Par conséquent, C'est le groupe le plus représentatif [5]. Ils comprennent à eux seuls plus de 6000 molécules [12]. Ces molécules ont des structures chimiques et des caractéristiques propres. Ils sont réputés pour être des pigments quasi universels des végétaux [5]. Aussi, le monde animal est concerné par les flavonoïdes, par exemple, la présence de la chrysine, de la quercétine ou encore de la galangine dans la propolis des abeilles [16].

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone (**figure 03, a**). Ils ont tous en commun un squelette de base à quinze atomes de carbones, arrangés en trois cycles A, B et C, selon la configuration C6-C3-C6 (**figure 03, b**) [14].

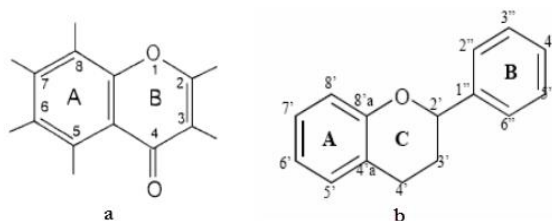


Figure 03 : Structure du 2- Phényle chromane (a) et structure générale des flavonoïdes (b) [5].

La diversité des flavonoïdes est due aux degrés d'hydroxylation, de méthylation, de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C. En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; flavones ; Dihydroflavonols ; flavanones ; flavanols ; isoflavonoïdes ; aurones (**Figure 04**) [5].

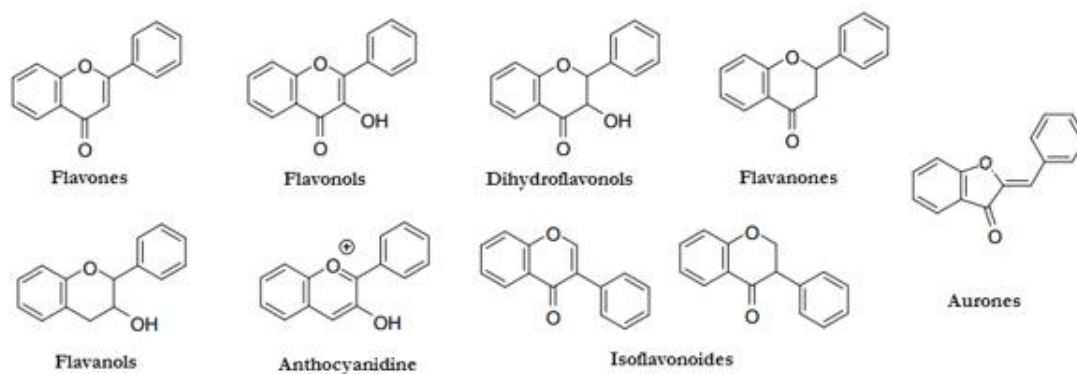


Figure 04 : Structures des principaux flavonoïdes [11].

4-2-Les formes condensés

4-2-1-Les tanins

Les tanins sont des substances phénoliques polymériques, de masse molaire compris entre 500 et 3000 [5]. Ils ont été découverts pour la première fois en tant que composés antinutritionnels, en raison de leur capacité à former des complexes avec des protéines et des polysaccharides, due à la présence d'un nombre élevé de fonctions hydroxyles et empêchant par la suite l'absorption de ces derniers par l'organisme [13]. Parmi les propriétés des tanins ; ils ont la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [5]; ils sont caractérisés par une saveur astringente [5] et sont solubles dans l'eau et les solvants polaires [14].

Ils sont subdivisés en deux groupes différents : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [14].

4-2-1-1- Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et d'acide phénoliques qui 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 (**Figure 05**) [5, 14]. Ils sont appelés hydrolysables, car ils sont facilement hydrolysables par des acides dilués ou à l'aide des enzymes [13].

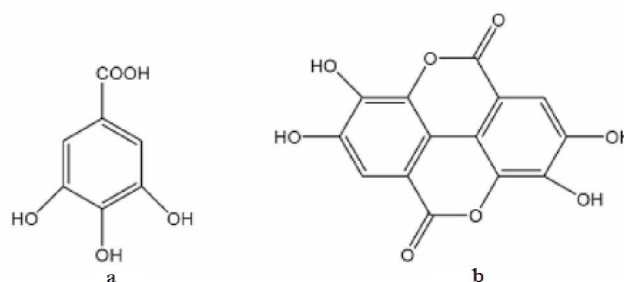
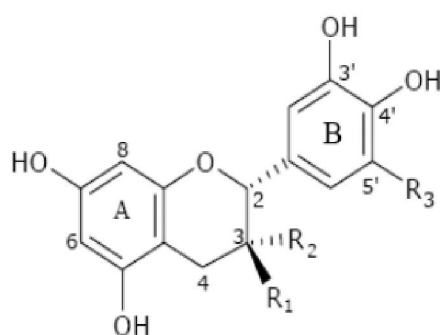


Figure 05 : Structure chimique des acides gallique (a) et ellagique (b) [5].

4-2-1-2- Les tanins condensés

Les tanins condensés ont eu plusieurs appellations dans la littérature pour les décrire, parmi elles, il y a : proanthocyanidines, flavanes, polyflavanes, catéchines ...etc. [14]. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils ne possèdent pas de sucre et leur structure est proche de celle des flavonoïdes [5]. Ce sont des polymères constitués des unités monomériques de flavan-3-ol, liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (**figure 06**) [5, 13].



Flavanols	R ₁	R ₂	R ₃
(+)-catéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine	H	H	OH
(+)-gallocatéchine	OH	OH	H
(-)-épigallicatéchine	OH	H	OH

Figure 06 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés [17].

5-Rôle antioxydant des composés phénoliques

Le stress oxydant est un phénomène déclenché par l'apparition d'un nombre incontrôlable de formes hautement réactives, ce sont des radicaux libres possédant une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire soit sur un atome d'oxygène, appelé espèce réactive de l'oxygène (ERO), soit sur un atome d'azote, appelé espèce réactive de l'azote (ERA) [2].

Ces espèces réactives telles que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le radical superoxyde O₂[•], Les peroxydes alkyles ROOH, les radicaux hydroxyles HO[•], peroxydes ROO[•], alkoxydes RO[•] et d'autres proviennent de plusieurs sources essentiellement d'origine enzymatique [14] (exemple : Les oxydases (NADPH oxydase) produisent des anions superoxydes (O₂^{•-}), les déshydrogénases,

oxygénases, cyclo- et les lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase ...etc. [2]. Cependant, d'autres facteurs exogènes liés à l'environnement (exemples : l'exposition prolongée au soleil et les rayonnements UV) ou au mode de vie (exemples : le tabagisme, les polluants industriels ou encore des habitudes alimentaires) sont également responsables d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme [2].

Ces radicaux s'attaquent à une série de substrats biologiques : glucides, lipides, protéines et acide désoxyribonucléique [16]. Ils agissent selon trois modes d'actions : en arrachant soit un électron, soit un atome d'hydrogène ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons [2].

Bien évidemment, l'organisme possède des moyens de défense contre ces radicaux libres, au premier lieu par le biais des enzymes comme les superoxydes dismutases, les glutathions peroxydases et les catalases ou encore des antioxydants produits par les cellules. Cependant, lorsque la quantité de radicaux libres est trop importante, les cellules n'arrivent pas à les neutraliser. Il semble ainsi que les formes réactives de l'O₂ soient en partie à l'origine de nombreuses maladies comme Alzheimer, Parkinson, l'athérosclérose, la polyarthrite chronique, le mongolisme ou encore le cancer [14].

Un antioxydant est un produit naturel ou synthétique qui selon **Halliwell (1996)** [18] peut neutraliser les radicaux libres soit par le piégeage direct des ERO ou bien l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production des espèces réactives.

Les composés phénoliques sont, sans aucun doute, connus pour être des antioxydants puissants [13], en particulier, les flavonoïdes [11]. Effectivement de nombreuses recherches leur ont attribué le rôle d'excellents piégeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène [11] et se sont révélés être des antioxydants plus puissants que la vitamine C et E et les caroténoïdes [19].

L'aptitude des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, à chélater les ions métaux est directement raccordée aux nombres de groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques et aussi à la proximité des groupes alkyls [11]. Ainsi que, les dommages oxydatifs cellulaires qui contribuent à la carcinogenèse et à l'évolution du cancer, ont été empêchés par des polyphénols par divers façons, soit par balayage des espèces radicalaires ; soit par la suppression de la formation des ERO / ERA en inhibant certaines enzymes ou des métaux impliquant leur production ; ou bien réglage et protection du système de défense de l'organisme [19]. Par exemple, l'utilisation de l'acide ellagique a rétabli efficacement l'ADN endommagé dans les lymphocytes et réduit la peroxydation lipidique [19]. Egalement, les polyphénols tels que le resvératrol, la quercétine ont également le pouvoir de réduire les dommages oxydatifs cellulaires.

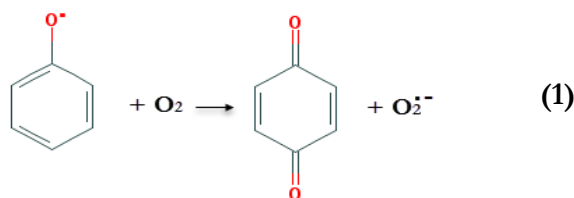
Ou encore des extraits phénoliques extirpés des grenades ou du thé ont montré leur efficacité à réduire les dommages oxydatifs causés par l'exposition de la lumière UV sur la peau [19].

Comme acide phénolique, l'exemple de l'acide férulique (FA) qui est un antioxydant trouvé dans de nombreux fruits, légumes, céréales, café et diverses plantes, a le potentiel de protéger l'organisme contre la cytotoxicité provoqué par des rayonnement UV, les dommages de l'ADN et la peroxydation lipidique, y compris, il a un effet préventif contre le cancer de la peau [20].

Concernant, le pouvoir antioxydant des tanins a été conféré grâce aux noyaux phénols, la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A des tanins. D'après **Rahman et al. (2006)**, Les tanins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres, ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* [5]. Les tanins condensés inhibent le stress oxydatif induit par les rayons UV et les lésions cellulaires chez les kératinocytes humains [19].

De plus, certaines études ont révélé des effets synergiques entre différents composés phénoliques ou avec d'autres antioxydants non phénoliques, permettant d'avoir un meilleur effet antioxydant que le composé phénolique à lui seul [19].

D'autre part, il convient de noter, sous certaines conditions (par exemple, à un pH élevé avec des concentrations élevées d'ions de métaux de transition et de molécules d'oxygène présentes), les composés phénoliques peuvent déclencher un processus d'auto-oxydation et par conséquent se comporter comme des prooxydants. Au cours, d'une réaction, le radical phénoxy peut interagir avec l'oxygène, produisant des quinones ($\text{P} = \text{O}$) et des anions superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) au lieu de se lier à un radical libre pour le neutraliser [19]. Comme indiqué ci-dessous :



Ces composés phénoliques qui se comportent comme des prooxydants sont plus des composés facilement oxydés, tels que la quercétine, l'acide gallique. Tandis que, ceux qui ont une masse moléculaire élevée, tels que les tanins condensés et hydrolysables, ont peu ou pas d'activité prooxydante [19].

Il a été démontré que une grande partie de l'activité antioxydante de *Pistacia atlantica* été due aux composés phénoliques et cela dans différentes parties de la plante telles que les feuilles [13]. D'autres études ont même prouvé, que les concentrations en composés phénoliques pouvaient varier selon de nombreux facteurs, tels que le génotype, le stade de croissance et le temps de la récolte ...etc. [13].

Par conséquent, l'objectif de cette étude a été d'évaluer les variations de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes et tanins et l'activité antioxydante (test DPPH[•], test phénanthroline et test oxyde nitrique NO[•]) dans les extraits méthanoliques à partir des galls de *P. atlantica* mâle et femelle, prélevés pendant les cinq mois (juillet, aout, septembre, octobre et novembre) dans la région de Laghouat.

6-Matériel et Méthodes

6-1-Réactifs chimiques

Nitroprussiate de sodium (NPS), naphthylamine et acide sulfanilique sont de marque Sigma- Aldrich.

6-2-Matériel végétal

Les galls des arbres du *Pistacia atlantica* ont été récoltées durant la période allant du mois Juillet au mois de Novembre 2010 de la région du sud de la wilaya de Laghouat. Les échantillons des galls ont été divisés en deux groupes selon le genre (mâle et femelle), un code a été attribué pour chaque échantillon (**Tableau 01**).

Tableau 01 : code adapté pour chaque échantillon

Abréviations	Echantillons
GM07	Galle male collectée au cours du mois Juillet
GM08	Galle male collectée au cours du mois Aout
GM09	Galle male collectée au cours du mois Septembre
GM10	Galle male collectée au cours du mois Octobre
GM11	Galle male collectée au cours du mois Novembre
GF07	Galle femelle collectée au cours du mois Juillet
GF08	Galle femelle collectée au cours du mois Aout
GF09	Galle femelle collectée au cours du mois Septembre
GF10	Galle femelle collectée au cours du mois Octobre
GF11	Galle femelle collectée au cours du mois Novembre

6-3-Méthodes

6-3-1-Choix de la méthode d'extraction et solvant utilisé

La méthode d'extraction utilisée au laboratoire est la sonication, cette méthode a été employée en raison de sa simplicité d'exécution : un gain de temps, des faibles quantités de solvant utilisé et une grande reproductibilité [11].

Les polyphénols sont des molécules pour la plupart hydrosolubles, c'est pour cette raison qu'ils sont extraits par des solvants de polarité moyenne à forte [11]. De plus, le méthanol pur est recommandé comme solvant d'extraction dans l'analyse de routine des composés phénoliques [21]. Ainsi le solvant choisi pour cette étude a été le méthanol qui présente une polarité moyenne [11].

De plus, les conditions d'extraction (temps d'extraction à 45 min, rapport solide-liquide de 1 :20 (g/ml) et température d'extraction de 50°C) ont été choisies car ces derniers ont donné un maximum de rendement des composés phénoliques totaux pendant des analyses préliminaires réalisées pour la partie optimisation des conditions d'extraction décrite dans le chapitre 02.

6-3-2-Préparation des échantillons

1 g de chaque échantillon a été mélangé avec 20 ml de méthanol pur et placée dans un appareil ultrasonique (Joident Ultrasonic- Cleaner, METO 5, Ningbo, Chine), à une température fixée à 50°C pour un temps d'extraction de 45 min. L'extrait a été filtré et le méthanol a été éliminé

à l'aide du rota-vapeur à 45°C. Le résidu final a été récupéré dans 10 ml de méthanol pur. Vu que les polyphénols sont sensibles à l'oxydation et à la température [11], tous les échantillons ont été conservés à basse température, et à l'abri de la lumière avant chaque analyse. L'opération a été reproduite trois fois pour chaque échantillon.

Les méthodes utilisées pour le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins ainsi que l'évaluation de l'activité anti-oxydantes telle que (DPPH•, chélation de fer) sont les mêmes employées dans le chapitre 02.

6-3-3-Activité anti-oxydante

6-3-3-1- Test d'oxyde nitrique (NO•)

L'oxyde nitrique a été déterminé en utilisant la réaction de Griess Ilosvay décrite par [27]. Dans cette étude, la méthode a subi quelques modifications mineures. Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 1 ml de nitroprussiate de sodium (NPS) (10 mM), et 1ml d'extrait dilué. Ensuite, le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Après incubation, 0,5 ml de l'acide sulfanilique (0,5g dans 30% d'acide acétique) et 0,5 ml naphthylamine (0,1g dans 30% d'acide acétique) ont été ajoutés puis la préparation a été agitée et laissée reposer pendant 30 minutes à température ambiante. Un chromophore de couleur rose a été formé. Enfin, l'absorbance de la solution a été enregistrée à 528 nm. L'expérience a été répétée 3 fois pour calculer la moyenne. Le pourcentage d'inhibition des radicaux d'oxyde nitrique (PI) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$PI (\%) = \frac{(A_t - A_E)}{A_t} \cdot 100$$

A_t : Absorbance du témoin (sans l'ajout de l'extrait) ;

A_E : Absorbance en présence de l'extrait.

6-3-4-Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage des CPT, flavonoïdes et tannins ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimées par une moyenne, plus ou moins l'écart type et calculées par le programme Excel 2013.

7-Résultats et Discussion

7-1-Teneurs en CPT, Flavonoïdes et Tanins

Afin d'évaluer l'influence du temps de récolte et le genre sur les polyphénols, une analyse quantitative a été réalisée à partir des galls mâles et femelles de *Pistacia atlantica* récoltés de mois de Juillet jusqu'au mois de Novembre dans la région de Laghouat.

La détermination des teneurs en composés phénoliques totaux (CPT), en flavonoïdes et en tanins dans les extraits méthanoliques a été faite en utilisant séparément les méthodes colorimétriques (Folin-Ciocalteu, trichlorure d'aluminium et vanilline). Les teneurs ont été estimées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique, en mg équivalent de quercétine et en mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche (**Annexe 01**).

Le **tableau 02** récapitule les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits bruts méthanoliques des galls mâles et femelles de *P. atlantica* de la région de Laghouat.

Tableau 02 : Teneurs en phénols totaux, tanins et flavonoïdes des galls de *P. atlantica* de la région de Laghouat, exprimées en mg équivalent par g matière sèche.

Mois	GM			GF		
	CPT	Flav.	Tan.	CPT	Flav.	Tan.
Juillet	109,36±4,76	1,17±0,02	104,18±4,24	94,08±0,51	2,78±0,05	69,84±1,25
Aout	94,36±4,51	1,40±0,00	85,74±10,28	103,92±0,60	1,61±0,07	82,09±0,59
Septembre	124,60±0,62	2,04±0,09	120,70±2,29	118,42±1,20	2,09±0,03	105,94±2,00
Octobre	126,71±1,29	1,23±0,02	124,10±1,44	102,86±1,56	1,70±0,07	83,11±1,12
Novembre	112,96±1,30	1,12±0,01	90,87±2,00	86,31±1,36	1,50±0,01	73,80±11,06

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions± écart type. (GM-GF) : galls mâles et femelles.

Comme l'indique le tableau 02 et les graphs a, b et c de la **figure 07**, les teneurs en CPT, flavonoïdes et en tanins des extraits des galls mâles et femelles sont plus élevées en automne (Septembre en particulier). A l'exception des flavonoïdes des galls femelles, qui sont plus élevés de l'ordre de 2,78 (mg EQ/g MS) en mois de Juillet.

D'après les graphs a et c de la **figure 07**, les résultats obtenus montrent clairement que la quantité en CPT et tanins des galls mâles de *P. atlantica* sont plus élevés par rapport aux galls femelles. Inversement, pour les flavonoïdes (graph b, **figure 07**). Ces constatations sont en accords

avec celles des études réalisées par **Ben-Ahmed (2016)** [13] sur les feuilles de *P. atlantica* collectés dans la même région et temps de récolte (juillet jusqu'à octobre).

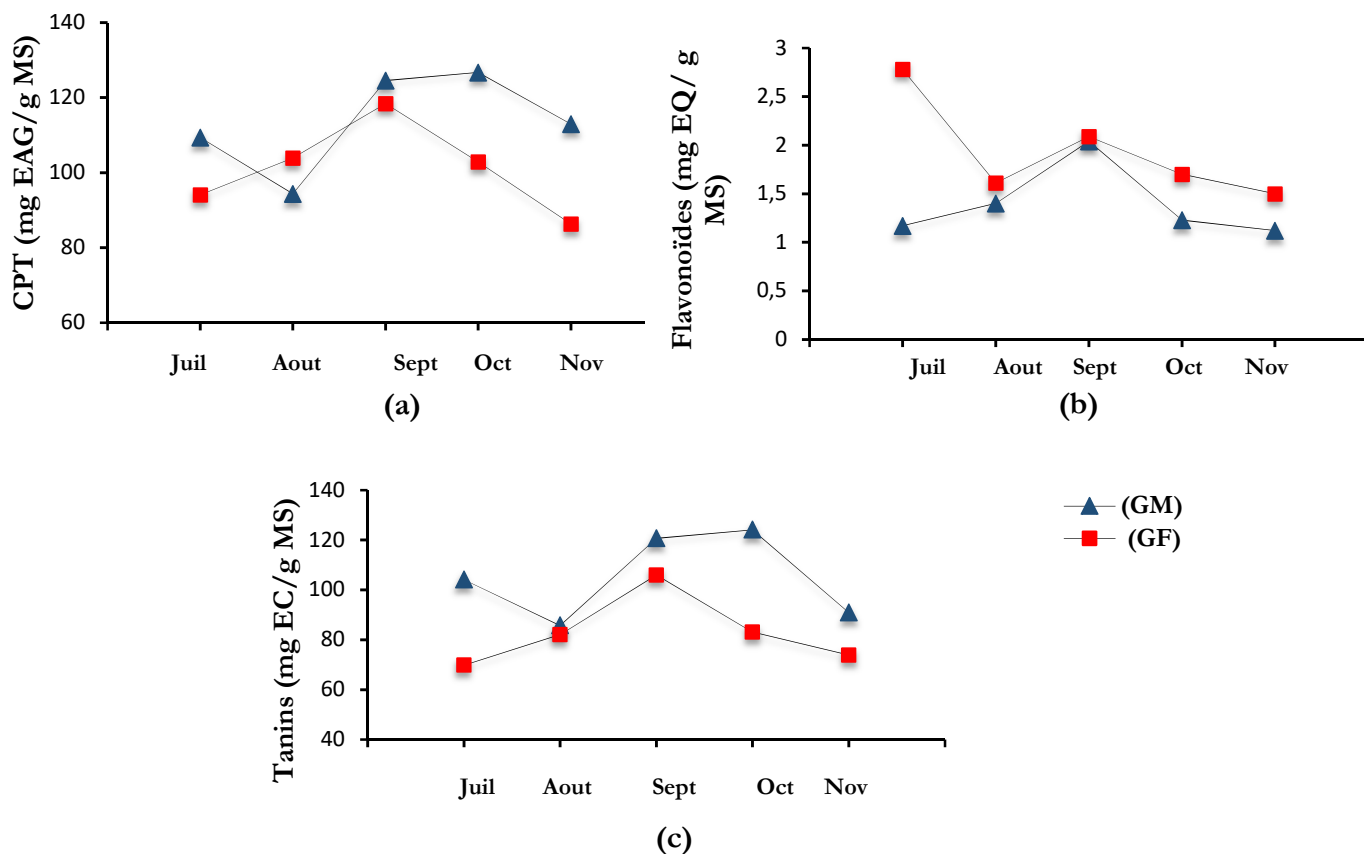


Figure 07 : Variation mensuelle des composés phénoliques totaux (CPT), flavonoïdes et tanins des galls mâles et femelles de *P. atlantica* dans la région de Laghouat.

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 régresser sa croissance. C'est pour ces raisons qu'elles ont développées des stratégies efficaces pour l'accumulation des ressources et des moyens de défense assurant leur survie dans l'écosystème [28]. Par exemple, l'impact des galls sur le fonctionnement de la plante-hôte, qui 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, dans l'espace et dans le temps [29]. En outre, les plantes doivent optimiser la répartition de ces ressources pour la satisfaction des besoins entre le métabolisme primaire (impliqué surtout dans la croissance) et le métabolisme secondaire (plus orienté vers la défense) [30].

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la distribution et les variations de concentration des composés secondaires carbonés tels que les composés phénoliques dans les tissus végétaux. Parmi-elles, l'hypothèse d'une balance entre croissance et différenciation (GDB pour Growth-Differentiation Balance) et le modèle de compétition protéique [PCM pour Protein Competition Model] [30]. L'hypothèse GDB suggère que les variations en composés phénoliques proviennent des échanges de ressources dépendant de l'environnement, selon lequel, tout facteur de l'environnement qui réduirait la croissance plus que l'activité photosynthétique pourrait augmenter les ressources disponibles pour le métabolisme secondaire. Le modèle de compétition protéique est fondé sur les mécanismes biochimiques de régulation des synthèses de protéines et de phénylpropanoïdes, lesquelles sont en compétition pour la phénylalanine [30].

Selon nos résultats l'accumulation des composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins des galls mâles et femelles de *P. atlantica* est pour la plupart active pendant les deux mois septembre et octobre. Ces résultats peuvent être expliqués en s'appuyant sur plusieurs paramètres. Citons, la période de la formation des galls de *P. atlantica*, qui selon **Mansour (2011)** débute en printemps, suivie des processus de croissance et maturation avec changement de couleur au fil du temps jusqu'à l'obtention d'un marron en mois d'octobre [31]. De plus, L'effet mensuel sur la variation de la concentration des composés phénoliques qui a été signalée dans de nombreuses études [32]. D'après l'étude réalisée par **Espirito-Santo et al. (1999)** sur la concentration des tanins évaluée dans les feuilles de *Baccharis dracunculifolia*, lorsque la plante est exposée à une sécheresse sévère (de mai à juin) la production des tanins est fortement réduite. Cette sécheresse empêche la production de carbone ou la biosynthèse des composés phénoliques, en raison d'une limitation de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse phénolique [32]. Ce qui expliquerait la diminution des composés phénoliques des galls de *P. atlantica*, en été pour la plupart.

Nos constatations concernant les teneurs élevées des tanins (**tableau 02**) des galls mâles et femelles peuvent coïncider avec l'analyse effectuée par **Fenny (1970)** [33], sur les changements de la teneur en composés phénoliques des feuilles de chêne qui révèle la présence des tanins condensés augmentant de 0,66% en avril jusqu'à 5,55% en septembre du poids sec des feuilles. Cette observation peut être expliquée par l'hypothèse GDB.

Néanmoins, les résultats décèlent une valeur maximale en flavonoïdes en mois de juillet chez les galls femelles. Cette observation est en accord avec celle de **Zhang et al. (2015)** [34] qui ont trouvé que les changements de contenu de ces substances considérées comme des régulateurs de la croissance et du développement des plantes étaient bien associés aux trois périodes de

croissance rapide de *Pistacia chinensis*. Au stade naissant des plantes, ces composés, en particulier la quercétine et le kaempferol, ont atteint des valeurs maximales en avril et en juillet.

Certains mécanismes pourraient également interférer avec les niveaux des composés phénoliques, tels que l'exposition à la lumière visible, qui varie en fonction de la saison [13]. Selon **Espirito-Santo et al. (1999)** [32], l'importance des tanins comme étant des barrières permettent la protection des plantes contre plusieurs effets morphogénétiques néfastes produits par une exposition excessive à ces rayonnements. Ces substances sont élevées en été et fortement réduites en hiver. En l'occurrence, nos résultats du mois de novembre peuvent concorder avec ces observations.

De plus, le genre peut également influencer sur la teneur des composés phénoliques, en raison d'une répartition différentielle des ressources végétales [35]. En effet, Les plantes femelles canalisent plus de carbone dans les tissus végétatifs par rapport aux mâles car elles ont un taux de reproduction plus élevé [36]. Cet excès va être investi pour la production des métabolites secondaires, comme les composés phénoliques [36]. Toutefois, ces observations s'accordent que pour les teneurs des flavonoïdes des galls femelles de *P. atlantica* qui sont plus élevées que celles des galls mâles. Quoi qu'il en soit nos constatations sont en accords avec les travaux de **Zhang et al. (2015)** [34] qui montrent que la teneur totale en flavonoïdes des feuilles femelles de *P. chinensis* est demeurée relativement plus élevée par rapport aux feuilles des arbres mâles, et expliquent cette analyse par le fait que les flavonoïdes sont très importants dans le processus de croissance complète des arbres de *P. chinensis*, de la reproduction des plantes à la maturation des graines.

7-2- Evaluation de l'activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, une méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante [11]. Pour évaluer l'effet général des antioxydants dans un extrait végétatif, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire [11].

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des galls mâles et femelles de *P. atlantica* de la région de Laghouat a été réalisée par trois méthodes. Deux méthodes sont destinées à mesurer la capacité de piéger les radicaux libres DPPH[•] et oxyde nitrique (NO[•]) et un autre a évalué l'activité de chélation du fer. Le DPPH[•] est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [2]. Il est relativement stable, se lie avec les donneurs de protons tels que des antioxydants, ce qui entraîne la diminution de l'absorbance [26]. L'oxyde nitrique est un radical libre produit dans les cellules de mammifères est impliqué dans la régulation de divers processus physiologiques. Cependant, un

excès d'oxyde nitrique peut être associé à plusieurs maladies comme l'arthrite, le cancer, etc. [26]. La méthode de chélation du fer évalue le pouvoir réducteur des extraits, l'utilisation de phenanthroline permet de déterminer la réduction des ions ferriques aux ions ferreux par des antioxydants. En sachant que l'augmentation de l'absorbance indique la capacité de l'antioxydant à donner les atomes d'hydrogène [26].

Le choix de l'expression des résultats est comme tel : pour le DPPH[•], en mg d'équivalent d'un antioxydant de référence (acide ascorbique) par g de matière sèche. La valeur la plus élevée correspond à l'activité la plus forte. Autrement dit, la valeur obtenue est la quantité de DPPH[•] neutralisé. Concernant la chélation du fer est exprimé en mg d'équivalent de tocophérol (vitamine E) par g de matière sèche, à ce titre, c'est la quantité de fer ferrique réduit en fer ferreux qui forme un complexe avec l'o-phenanthroline. En fin, le piégeage des radicaux d'oxyde nitrique (NO[•]) est exprimé par leur IC₅₀ (mg/ml) qui est la concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical NO[•]. IL est déterminé à partir des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations croissantes représentant la moyenne de trois tests séparés (**Annexe 02**). En effet, la faible valeur d'IC₅₀ correspond à une forte activité antioxydante.

Les variations mensuelles de l'activité antioxydante DPPH[•], oxyde nitrique (NO[•]) et test phenanthroline (TPT) des galls mâles et femelles de *P. atlantica* de la région de Laghouat sont illustrées sur les graphs a, b et c de la **figure 08**. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **tableau 03**.

Tableau 03 : Valeurs des activités antioxydantes, DPPH[•] (mg EAA/g MS), NO[•] (IC₅₀ en mg/ml) et TPT (mg ET/g MS) des galls de *P. atlantica* de la région de Laghouat.

Mois	GM			GF		
	DPPH [•]	TPT	NO [•]	DPPH [•]	TPT	NO [•]
Juillet	72,23±1,44	577,44±14,90	0,24±0,03	71,28±3,14	556,76±18,86	0,37±0,04
Aout	66,56±2,41	528±27,50	0,28±0,4	69,71±1,54	589,70±8,86	0,32±0,02
Septembre	71,18±1,70	634,39±21,32	0,27±0,08	56,84±1,76	492,48±2,12	0,38±0,06
Octobre	64,70±1,60	389,04±4,40	0,23±0,1	72,24±0,71	682,21±31,82	0,41±0,03
Novembre	67,66±1,46	472,75±13,91	0,29±0,06	55,39±3,00	420,48±5,35	0,22±0,03

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions± écart type. (GM-GF) : galls mâles et femelles.

D'après nos résultats (**tableau 03**), les extraits des galls mâles et femelles de *P. atlantica* ont une meilleure activité antioxydante pendant les mois juillet et septembre, à l'exception du DPPH[•]

et TPT des galls femelles qui sont plus élevés durant le mois d'octobre. De plus, le $\text{NO}^\bullet$ des galls femelles qui a un IC_{50} le plus élevé de l'ordre de 0,22 (mg/ml) au mois de novembre. Les deux graphes a et b, de la **figure 08** permettent de constater qu'il y a une fluctuation entre les galls mâles et femelles. En l'occurrence, lorsque l'activité antioxydante ($\text{DPPH}^\bullet$ ou TPT) des galls mâles a une valeur élevée, la valeur de la capacité antioxydante des galls femelles est faible et vice versa. En fin, les galls mâles semblent avoir une capacité de balayage du radical $\text{NO}^\bullet$ pour la plupart plus élevée que chez les galls femelles (graph c, **figure 08**).

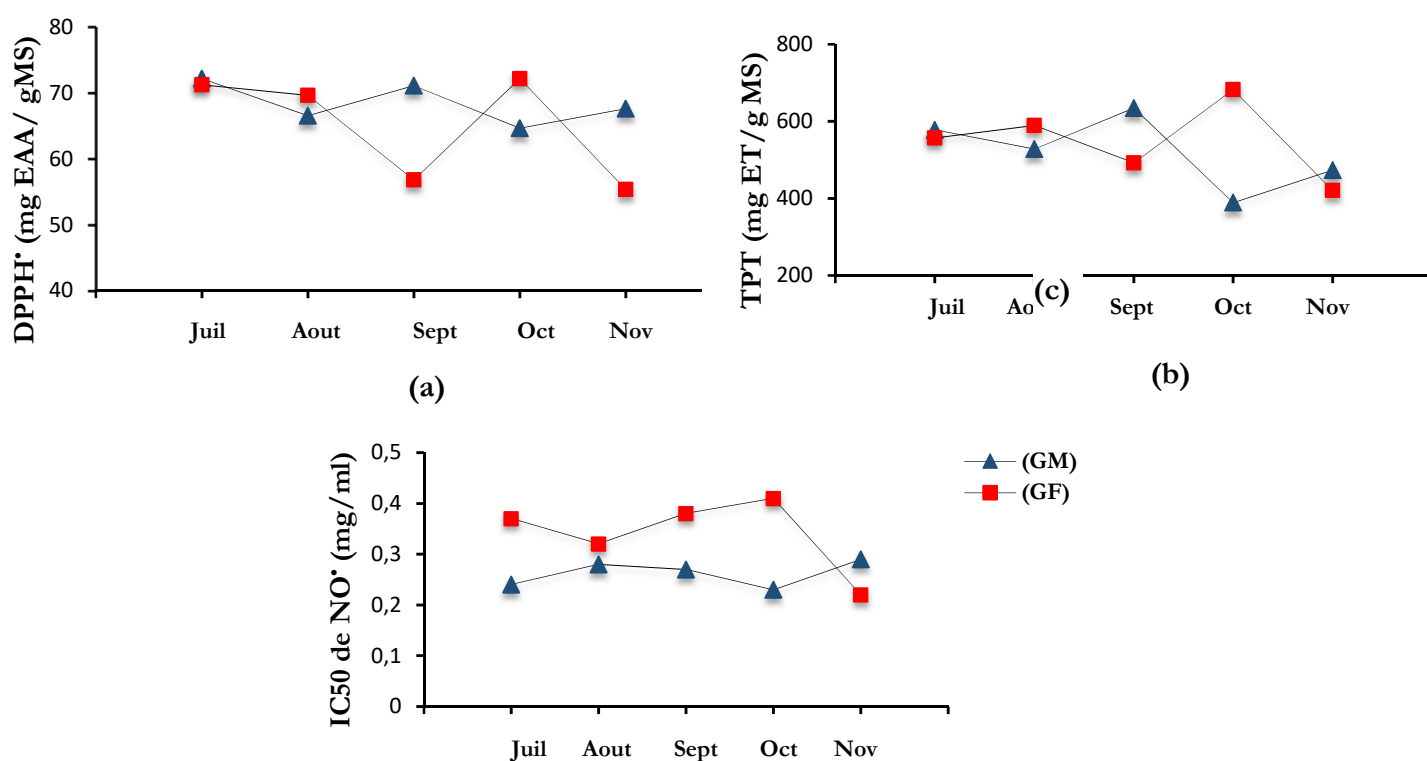


Figure 08 : Variation mensuelle des activités antioxydantes ($\text{DPPH}^\bullet$, TPT et $\text{NO}^\bullet$) des galls mâles et femelles de *P. atlantica* dans la région de Laghouat.

L'activité antioxydante a pris une place très importante dans le traitement de plusieurs troubles métaboliques, où les radicaux libres sont impliqués [6]. Ces antioxydants du à leur propriétés redox et à leur structure chimique, jouent un rôle important dans la chélation des métaux de transition et le balayage des radicaux libres [6].

Plusieurs hypothèses peuvent interpréter la variation de nos résultats. En premier lieu, l'augmentation de l'activité antioxydante des galls de *P. atlantica* de la région de Laghouat qui a été enregistrée durant les deux mois juillet et septembre, cette observation pourrait être en rapport avec la teneur élevée en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins en moins de septembre et les

flavonoïdes des galls femelles au mois de juillet. Cette constatation est en accord avec les travaux de **Zhang et al. (2015)** qui ont trouvé que les feuilles femelles de *P. chinensis* présente une activité antioxydante élevée, l'expliquant comme étant dû à l'augmentation de composés phénoliques et flavonoïdes [34]. En revanche, pour **Beart et al. (1984)** [37] pensent qu'il n'y a aucune corrélation claire entre la quantité des composés phénoliques et l'activité anti-oxydante. Néanmoins, cette dernière dépend des structures phénoliques, par exemple, les acides hydroxycinnamiques sont plus efficaces que les acides hydroxybenzoïques. Ainsi, les aspects structurels sont importants dans la détermination de l'activité antioxydante, ce qui rend le sujet de l'activité antioxydante trop complexe pour l'expliquer juste en termes de quantité de composés phénoliques. D'autant plus, les composés tels que les flavonoïdes, qui contiennent des groupes fonctionnels hydroxyles, sont responsables de l'activité antioxydante des plantes [6].

En second lieu, les résultats de l'activité antioxydante DPPH[•] et TPT enregistrés entre les galls mâles et femelles oscillent. Ces observations peuvent être causées par les fluctuations des facteurs environnementaux, tels que les températures des jours et des nuits, les pluies, la sécheresse et la durée et l'intensité lumineuse [38]. Ces fluctuations peuvent varier d'une année à l'autre et peuvent expliquer l'irrégularité des teneurs des activités antioxydantes étudiées [38]. D'après **Siatka et Kasparova (2010)** [38], Les variations des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et la capacité de piéger les radicaux libres DPPH[•] des fleurs marguerites s'expliquent par des changements environnementaux au cours de l'année. Il est donc difficile de déterminer lequel des facteurs environnementaux est principalement responsable des variations observées car les changements sont faibles et irréguliers.

7-3-Corrélation entre les teneurs (CPT, flavonoïdes et tanins) et les activités antioxydantes (DPPH[•], TPT et NO[•])

7-3-1-Correlation entre les teneurs CPT, flavonoïdes et tanins

La corrélation entre les teneurs en CPT, flavonoïdes et tanins des galls mâles et femelles de *P. atlantica* nous permet de vérifier si elles varient simultanément au cours des mois (juillet, aout, septembre, octobre et novembre). La **figure 09** montre qu'il y a une corrélation entre les teneurs CPT et tanins et cela pour les galls (GM et GF), avec R^2 de l'ordre de 0,8065 et 0,8551, respectivement.

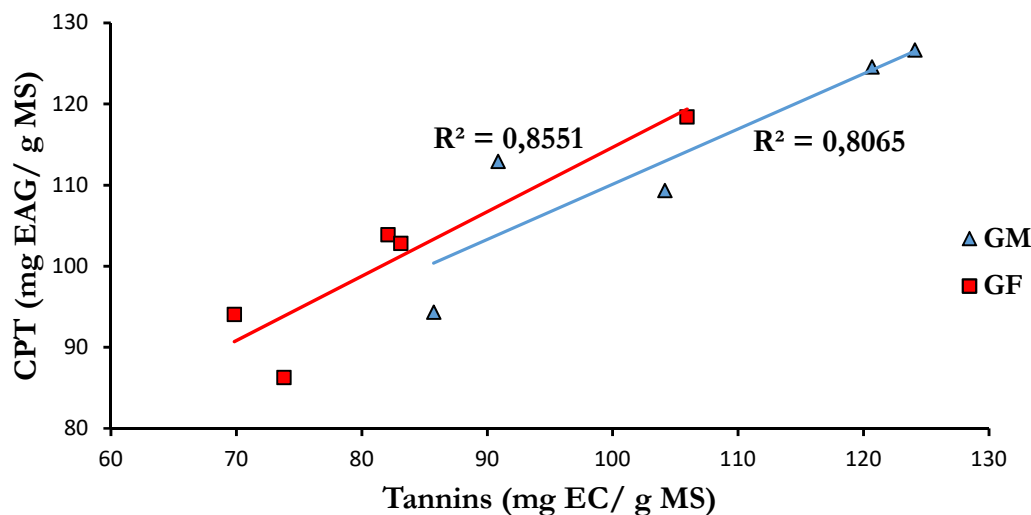


Figure 09 : Relation entre les CPT et Tanins des galls mâles (GM) et femelles (GF) de *P. atlantica*.

7-3-2- Corrélation entre les activités antioxydantes (DPPH•, TPT et NO•)

En établissant la relation entre les fluctuations mensuelles des activités antioxydantes des galls mâles et femelles étudiées, la **figure 10** révèle l'existence d'une corrélation entre la capacité de balayage des radicaux DPPH• et la chélation du fer avec $R^2 = 0,7586$ (GM) et $R^2 = 0,7874$ (GF). En plus, la présence d'une faible corrélation enregistrée entre la chélation de fer et l'inhibition de 50% des radicaux NO• chez les galls femelles ($R^2 = 0,5518$) (**figure 11**).

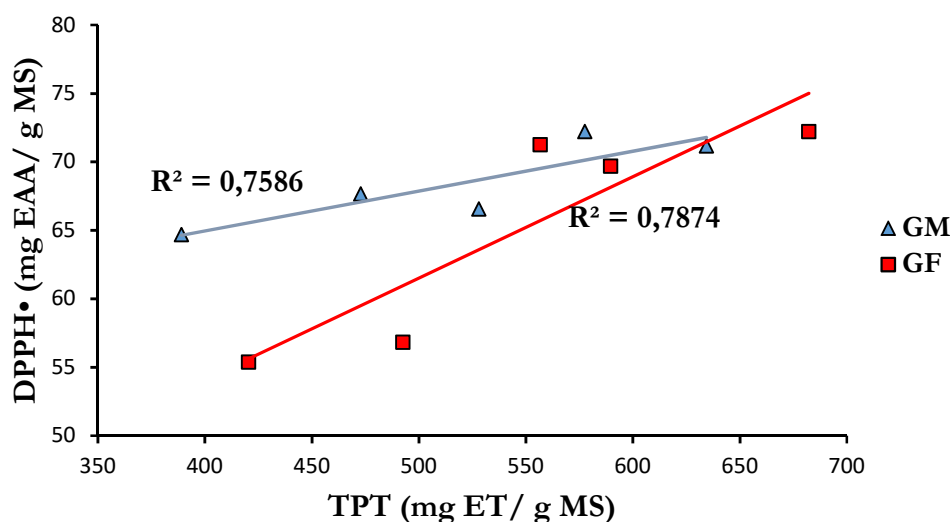


Figure 10 : Corrélation entre DPPH• et le test phénanthroline (TPT) des galls mâles (GM) et galls femelles (GF) de *P. atlantica*.

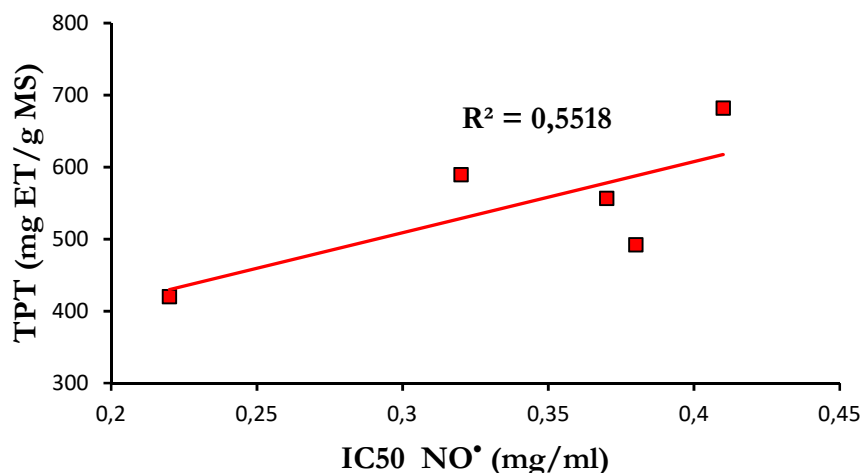


Figure 11 : Corrélation entre le test phénanthroline (TPT) et le IC50 du test NO• des galles femelles (GF).

7-3-3- Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes

Après toutes les combinaisons effectuées, entre les trois techniques du pouvoir antioxydant et les teneurs en polyphénols, il y a deux faibles corrélations enregistrées. La première illustrée dans la **figure 12** qui est la variation de chélation de fer (TPT) en fonction de la teneur en flavonoïdes chez les GM avec un $R^2 = 0,447$ et la seconde illustre, la variation d'IC₅₀ des radicaux NO• en fonction de la teneur en CPT avec un $R^2=0,4201$ (**figure 13**). Ces résultats démontrent que 44,7% et 42,01 % de la capacité antioxydante des galles mâles et femelles, respectivement sont dues à la contribution des flavonoïdes et CPT.

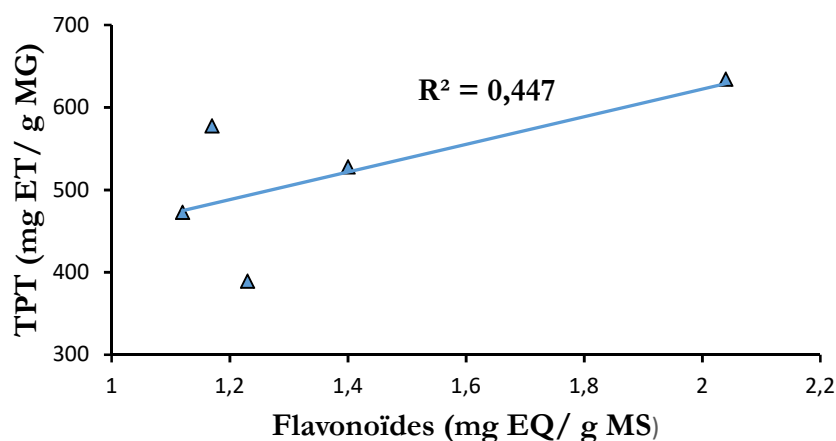


Figure 12 : Corrélation entre le test phénanthroline (TPT) et la teneur en flavonoïdes des galles mâles (GM).

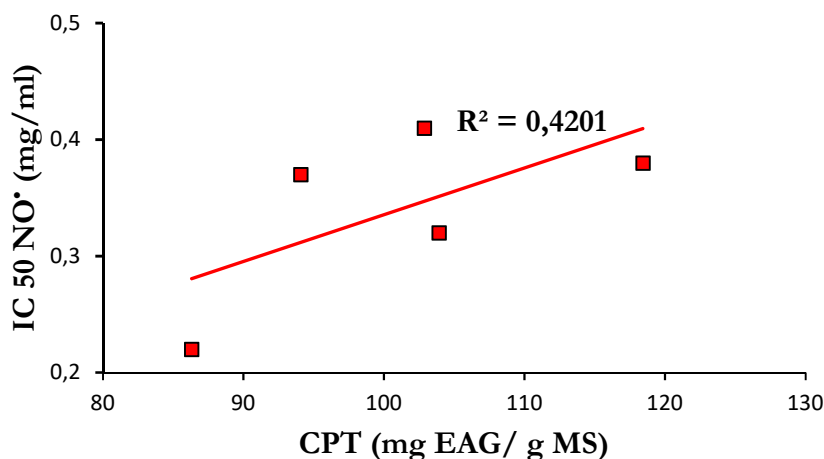


Figure 13 : Corrélation entre le IC₅₀ du test NO• et la teneur en CPT des galls femelles (GF).

Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols qui exhibe une activité antioxydante puissante [5]. Ce qui explique le manque de corrélation dans cette étude. Nos résultats peuvent rejoindre ceux de **Ben-Ahmed (2016)** [13] qui a expliqué que le manque de corrélation entre les CPT et la neutralisation des radicaux DPPH• pouvait être due à la présence de tannins condensés dans les feuilles de *P. atlantica* qui sont des polymères de poids moléculaire élevé, par conséquent peuvent être inefficace en tant que décanteurs de DPPH• et en ajoutant que les antioxydants de bas poids moléculaire étaient plus efficaces. **Rached (2008)** [39] qui également n'a pas trouvé de corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les activités antioxydantes chez *P. lentiscus*, a interprété ses résultats par le fait que des composés phénoliques bioactifs autres que les flavonoïdes sont responsables de l'activité antioxydante.

Néanmoins, **Belyagoubi (2010)** [5] démontre une corrélation positive entre les activités antioxydantes et la présence des flavonoïdes, en justifiant leurs résultats par la structure des flavonoïdes qui leur confère une forte activité. D'autre part **Hatamnia et al. (2015)** [27] ont trouvé une forte corrélation entre la capacité antioxydante et certains composés phénoliques tels que l'acide ascorbique, acide gallique, la rutine, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide sinapique, cependant, le reste des composés phénoliques du fruit de *P. khinjuk* ne contribuent pas à une grande activité antioxydante. En outre, ce dernier dépend principalement du nombre et de la position des groupes hydroxylés sur les cycles aromatiques des molécules phénoliques [40].

8-Conclusion

Les extraits de galles de *Pistacia atlantica* collectés dans la région de Laghouat ont révélé des changements du contenu phénolique et des activités antioxydantes en fonction du mois de la récolte et le genre. La plupart des composés ont atteint leurs valeurs maximales en Septembre. Bien qu'aucune relation directe n'ait été trouvée entre les métabolites et le genre des galles, les composés étaient présents en quantités plus élevées chez les mâles de *P. atlantica* que chez les femelles dans la plupart des cas. Les extraits ont montré des activités antioxydantes efficaces durant les deux mois juillet et septembre. De plus, la capacité à neutraliser les radicaux NO[•] pour les échantillons recueillis au cours des différents mois de récolte semble plus élevée chez les galles mâles de *P. atlantica*. En outre, la corrélation observée indique que ces composés font parties des sources potentielles d'activité antioxydante dans les galles de *P. atlantica*.

Références

- [1] Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S. and Treutter D. (2009). «Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions,» *ResearchGate*, vol.1:1-35, 2009.
- [2] Zerargui, F. (2015). Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Doctorat en Sciences, Spécialité: Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif (Algérie) 169p.
- [3] Bougandoura, N. and Bendimerad, N.(2012). «Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq.» *Nature & Technologie* , (109):14-19.
- [4] Generalic, I., Skroza, D., Sonja J., Mozina, S., Ljubenkov, I., Katalinic, A., Simat, V. and Katalinic, V. (2012). «Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.),» *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* , vol. 9: 441-457.
- [5] 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 Belkaid-Tlemcen (Algérie) 174p.
- [6] Eshwarappa, R. S. B., Lakshmikantha, R. Y., Subaramaihha, S. R., Subbaiah, S. G. P., Surendranath, A. R. and Dhananjaya, B. L. (2015). «Antioxidant activity of insect gall extracts of *Pistacia integerrima*,» *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* ,14 (14): 367–374.
- [7] Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M. H. S., Shams-Ardekani, M. R. and Rahimi, R. (2013). «Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology,» *Hindawi Publishing Corporation*, vol. 2013, 33p.
- [8] Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings D. and Heyden, Y. V. (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 (11):1185–1194.
- [9] Harborne, J. (1989). «General procedures and measurement of total phenolics,» In: *Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics* (eds P.M. Dey & J.B. Harborne), *Academic Press, London.*, vol. 1: 1-28.
- [10] Haslam, E. (1998). «Practical Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- [11] Rezaire, A. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus batana* (patana)*. Doctorat en Phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane.
- [12] Kebbab, R. (2014). *Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété chamlal: Evaluation de l'activité avant et après deglycosylation*. Mémoire de Magister en science biologique, spécialité: Biochimie appliquée, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (Algérie), 171p.
- [13] 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.
- [14] Daas Amieur, S. (2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et evaluation in vitro de leur activité biologique. Magister en Biologie, spécialité: Biochimie appliquée, Université El-Hadj Lakhdar - Batna (Algérie).

- [15] Djenidi, H. (2011). Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.): essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. Mémoire de magister en biologie, spécialité: Biotechnologie, Université Mohamed KHEIDER. Biskra (Algérie), 80p.
- [16] 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.
- [17] Perret, C. (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. In These études quantitatives des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et evaluation in vitro de leur activité biologiq. (Daas-Amiour, S. (2009)) Memoire de magister, spécialité:Biochimie appliquée, Université El-Hadj Lakhdar - Batna (Algérie), 160p.
- [18] Halliwell, B.(1996).« Antioxydants in human heath and disease.» *Annu. Res. Nutr.*, vol. 16: 33-50.
- [19] Dai, J. and Mumper, R. J.(2010). «Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties,» *Molecules* , vol. 15: 7313-7352.
- [20] Ambothi, K. and Nagarajan, R. P.(2014). «Ferulic acid prevents ultraviolet-B radiation induced oxidative DNA damage in human dermal fibroblasts,» *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(14):203-213.
- [21] Witzell, J., Gref, R. and Nasholm, T.(2002). «Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants,» *Biochemical Systematics and Ecology* , vol. 31:115–127.
- [22] Boizot, N. and Charpentier, J. (2006).«Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier,» *Cab. Tech. INRA*, vol. 1: 9-82.
- [23] ongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang,Y. and Gritsanapan, W. (2012).«Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method,» *Industrial Crops and Products* , 44 (2013): 566– 571.
- [24] Chupin, L., Motillon, C., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A. and 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 (2013): 897– 903.
- [25] Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. (2013). «Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts,» *Food Chemistry* , 153 (2014) : 279–284.
- [26] Qureshi, M. N., Kuchekar, B. S., Logade, N. A. and Haleem, M. A. (2009).«Antioxidant and hepatoprotective activity of *Cordia macleodi*leaves,» *Saudi Pharmaceutical Journal* , vol. 17: 299–302.
- [27] Hatamnia, A. A., Abbaspour, N. and Darvishzadeh, R.(2013). «Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits,» *Food Chemistry* ,145(2014):306–311.
- [28] Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S. and Robin, C.(2013).«Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?,» *Phytochemistry* , vol. 88: 25–33.
- [29] Dauphin, P. (2012). Guide des galls de France et d'Europe. Editions Belin, Paris: 7-25pp.

- [30] Gayler, S. (2010). Modelisation de l'effet de facteurs de l'environnement sur la répartition des ressources dans un système végétal mixte, Académie d'Agriculture de France.
- [31] Mansour, C.(2011). Contribution à l'étude de la répartition du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) dans la wilaya de Naama- cas de GAALOU. Mémoire en vue d'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en foresterie, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (Algérie).
- [32] Espírito-Santo, M. M., Fernandes, G. W., Allain, L. R. and Reis, T. R. F.(1999). «Tannins in *Baccharis Dracunculifolia* (ASTERACEAE): Effects of seasonality, water availability and plant sex,» *Acta bot. bras.* , 13 (12):167-174.
- [33] Feeny, P.(1970). «Seasonal changes in Oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars,» *Ecology*,51(14):565-581.
- [34] Zhang, L., Yang, M., Gao, J., Jin, S., Wu, Z., Wu, L. and Zhang, X.(2015). «Seasonal variation and gender pattern of phenolic and flavonoid contents in *Pistacia chinensis* Bunge inflorescences and leaves,» *Journal of Plant Physiology*, 1-26pp.
- [35] Krischik, V. A and Denno, R. F.(1990). «Patterns of growth, reproduction, defense, and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis hMimifolia* (Compositae),» *Oecologia* , vol. 83:182-190.
- [36] Herms, D. A. and Mattson, W. J.(1992). «The dilemma of plants: to grow or defend,» *The Quarterly Review of Biology*, 67(13):283-352.
- [37] Beart, J. E., Lilley, T. H. and Haslam, E.(1985). «Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defence: some observations,» *Phytochemistry* , 24(11): 33-38.
- [38] Siatka, T. and Kašparová, M. (2010).«Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers,» *Molecules* , vol. 15: 9450-9461.
- [39] Rached, W.(2008). Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Mémoire de magister en biologie, option: Biochimie végétale appliquée, université Es-Sénia d'Oran (Algérie).
- [40] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. (2015). «Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds,» *Food Chemistry* ,97(1) : 654–660.

Chapitre 04

*Etude de l'effet inhibiteur des extraits
phénoliques des galls de *P. atlantica* sur
l' α -amylase et l' α -glucosidase*

1-Introduction

Le diabète est une maladie endocrinienne [1], caractérisée par une hyperglycémie chronique [2]. A l'origine, le terme "diabète" désignait diverses maladies caractérisées par une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense [3]. L'appellation "diabète sucré" est due à la saveur sucrée retrouvée dans les urines [3].

Le diabète touche environ 2% de la population mondiale [1]. Selon l'OMS (organisation mondiale de santé), le nombre de diabétique est estimé à 135 millions dans le monde [4], pouvant atteindre jusqu'à 438 millions d'ici 2030 [5]. En Algérie, environ 5 millions d'individus sont atteints de tout diabète confondu [3].

Les incidences du diabète sur l'organisme se manifestent sous forme de graves complications [4], touchant particulièrement, les yeux, les nerfs, les reins, le cœur et les vaisseaux [2]. Tous ces effets nocifs de l'hyperglycémie justifient le besoin d'équilibrer aussi parfaitement que possible le taux du glucose dans le sang [2]. Le traitement de l'hyperglycémie nécessite un contrôle permanent à savoir ; un régime alimentaire, des exercices physiques ainsi que l'utilisation des médicaments [6].

Malgré la progression dans la recherche de nouveaux médicaments de synthèse, ces derniers présentent des limites [7] et d'effets indésirables graves [6]. Parmi les solutions préconisées, il y a la phytothérapie antidiabétique qui connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus croissante d'extraits de plantes efficaces dans le traitement du diabète [1]. En effet, Les plantes ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées [3], telles que les polyphénols (tanins, anthocyanes, flavonoïdes, leucoanthocyanes) qui ont montré des résultats intéressants comme effet hypoglycémiant [7]. Ce dernier peut être obtenu, en diminuant l'absorption des sucres ingérés. Cela peut être possible, si les enzymes tels que α -amylases et α -glucosidases responsables de la dégradation des sucres sont inhibés [8]. L'activité inhibitrice des enzymes (α -amylases et α -glucosidases) a été démontrée dans un certain nombre d'extraits de plantes, y compris le genre *Pistacia* [6].

2-Généralités sur le diabète

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps [3]. Il résulte d'un dysfonctionnement du pancréas, qui ne produit plus normalement l'insuline [4] ou d'un défaut de l'action de cette hormone [2]. Cette déficience provoque l'augmentation de la glycémie qui est le taux de glucose dans le sang [2], lorsqu'elle devient supérieure à 1,26 g par litre à jeun, la personne est considérée comme diabétique [3].

Selon son étiologie, il existe différentes formes du diabète sucré, dont les plus répandus sont le diabète de types 1 et 2 [2]. Le diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant) représente 10% des patients diabétiques [9], Concerne surtout les enfants, mais peut se manifester à tout âge [3], résulte d'une destruction jusqu'à 90% [3] et sélective et auto-immune des cellules β du pancréas [5]. Le diabète de type 2 (Diabète non insulino-dépendant) représente 85 à 90% des diabétiques [1], c'est une forme sournoise à développement lent qui apparaît généralement vers la cinquantaine [1], résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline [3] ou un défaut de sécrétion de cette hormone [5].

Cette maladie est incurable, mais peut néanmoins être traitée efficacement [3]. Le diabète insulino-dépendant est traité par l'injection de l'insuline [9]. Par contre, le diabète non insulino-dépendant peut être traité soit par l'administration des antidiabétiques oraux [2] ou par l'injection de l'insuline mais lorsque les médicaments hypoglycémisants oraux ne réduisent pas la glycémie [9].

Différents mécanismes sont exercés par ces antidiabétiques oraux : soit par stimulation des cellules β du pancréas à fin de produire plus d'insuline, exemple : sulfonurées et méglitinides, soit par augmentation de la sensibilité des muscles et autres tissus vis-à-vis de l'insuline (thiazolidinediones), soit par diminution de la gluconéogenèse par le foie en administrant des biguanides [9], ou encore l'inhibition des enzymes (tels que α -amylase, α -glucosidase) pour minimiser l'absorption des glucides (Acarbose, voglibose et miglitol) [10].

3- Enzymes digestives glucidiques

L'un des mécanismes possibles pour obtenir l'effet hypoglycémie est de diminuer l'absorption des sucres ingérés, en inhibant les enzymes responsables tels que α -amylase et α -glucosidase [11].

3-1- α -amylase

α -amylases (EC 3.2.1.1) catalyse l'hydrolyse des liaisons α (1-4) dans l'amidon, est retrouvé habituellement dans les bactéries, les plantes, animaux [12] et les champignons [13]. Chez l'homme, l' α -amylase est constituée d'une longue et unique chaîne polypeptidique composée de 496 acides aminés, qui est codée sur le chromosome 1 [12]. Ces gènes sont régulés afin que différentes isozymes soient synthétisés soit dans les glandes salivaires, soit dans le pancréas [12]. L' α -amylase pancréatique qui est une métalloenzyme de calcium, est la plus importante, responsable de la plupart de la digestion de l'amidon chez l'homme [10]. Une digestion partielle de l'amidon est initiée par l'amylase salivaire [13] qui hydrolyse l'amidon polymère en oligomères plus courts [12]. En

atteignant l'intestin, L' α -amylase pancréatique poursuit le processus d'hydrolyse en formant de maltoses, des maltotrioses et des petits malto-oligosaccharides [13].

3-2- α -glucosidase

α -glucosidase ou maltase (EC 3.2.1.20) [10] est un exo-enzyme distribuée dans les microorganismes, les plantes et les tissus animaux [14]. Il catalyse la libération d' α -glucose à partir de l'extrémité non réductrice du substrat [14], en agissant sur les liaisons α (1-4)-alpha [10]. C'est une enzyme située dans la brosse de l'intestin grêle [13], qui catalyse le clivage hydrolytique des oligosaccharides en monosaccharides [14]. Ce glucose est ensuite absorbé par l'intestin grêle et entre dans le sang à l'aide de moyen d'un système de transport spécifique [12].

3-3- Inhibition des enzymes digestives glucidiques

Les inhibiteurs des enzymes digestives glucidiques ont été considérés comme des cibles potentielles pour contrôler le diabète [8]. Actuellement, il existe des médicaments antidiabétiques qui agissent principalement en inhibant la digestion et l'absorption des glucides [10]. L'acarbose qui est le premier inhibiteur d'origine microbienne [10], résulte d'un long programme de dépistage des inhibiteurs de la glucosidase [8]. Il s'est avéré être un inhibiteur efficace de plusieurs carbohydases: α -glucosidase, α -amylase, glucoamylase, cyclomaltodextrine glucanyletransférase, et dextranase. C'est un pseudo-tetrasaccharide [15]. En plus, il est utilisé fréquemment comme un inhibiteur standard, dont le but de faire une comparaison avec l'efficacité des nouveaux inhibiteurs [13]. Etant donné que l' α -amylase pancréatique est un métalloenzyme, les chélateurs métalliques tels que (éthylènediaminetétracétique (EDTA), l'acide éthylèneglycol tétraacétique (EGTA)), les acides organiques (exemples l'acide citrique et l'acide oxalique) ou encore les métaux lourds tels que Al^{+3} , Fe^{+2} et Hg^{+2} sont considérés comme des inhibiteurs efficaces [13].

Outre l'acarbose, il y a le miglitol et le voglibose [13], ce dernier est un inhibiteur d' α -glucosidase plus récent d'origine bactérienne qui inhibe les activités de l'isomaltase, de la sucrase et de la maltase, tandis que le miglitol qui est un dérivé de 1-désoxynojirimycine retrouvé dans les plantes [14], inhibe fortement les activités de glucoamylase, de sucrase et d'isomaltase [10]. Cette inhibition diminue la quantité de glucose absorbée par l'intestin et aide à diminuer les concentrations d'insuline postprandiales [16]. Bien évidemment, ces médicaments doivent être administrés au moment du repas qui contient des carbohydrates digestibles et non pas des monosaccharides car ils n'affectent pas l'absorption de glucose [16]. Bien qu'efficace dans le maintien de la glycémie postprandiale, quelques problèmes d'intolérance gastro-intestinale sont

considérés comme des effets indésirables [16] voire même graves [10]. Par conséquent, leur utilisation est considérablement limitée [16].

4- La phytothérapie antidiabétique

En raison des effets secondaires causés par les médicaments : état d'hypoglycémie, coma d'acidocétose, problèmes digestifs [2], développement de la résistance des patients diabétiques envers les médicaments [9], leurs indisponibilités dans certaines régions du monde [2] et des couts prohibitifs pour les populations des pays pauvres accédant difficilement aux médicaments modernes [4], les gens retournent de nouveau vers la médecine traditionnelle, particulièrement vers la thérapie par les plantes, appelée la phytothérapie [2]. Cette dernière a des effets secondaires moins sévères ou sans effet secondaire [10].

Plusieurs plantes ont été utilisées traditionnellement pour traiter le diabète sucré [2]. De nombreuses recherches ont pu prouver l'efficacité de l'utilisation de ces herbes depuis des temps anciens [10]. Citons, en médecine traditionnelle chinoise, l'utilisation de *Polygonatum odoratum*, a été signalée après une étude que la plante précisément les flavonoïdes totaux exercent un effet antidiabétique chez les souris et rats diabétiques en inhibant l'activité α -amylase [10]. Onze plantes antidiabétiques chinoises telles que les racines d'*Aralia taibaiensis* ont été sélectionnées à la base de leur utilisation traditionnelle et leurs activités inhibitrices exercées sur l' α -amylase et α -glucosidase ont été démontrées expérimentalement *in vitro* [17].

De plus, parmi les plantes malaisiennes et indonésiennes traditionnellement employées, l'extrait de *Phyllanthus amarus* hexane a été analysé et confirmé son importance dans le traitement du diabète [10].

En inde, plusieurs groupes de chercheurs ont étudiés des extraits de nombreux plantes de leur région pour confirmer l'efficacité des remèdes utilisés par leur ancêtres dans la lutte contre le diabète, parmi ces plantes, il y a *Linum usitatissimum*, *Morus alba*, *Ocimum tenuiflorum*, *Curcuma longa*, *Cinnamomum verum*, *Ficus bengalensis*, *Syzygium cumini*, *Bixa orellana*, *Murraya koenigii* et *Tribulus terrestris*, les deux derniers ont été identifiés comme les meilleurs inhibiteurs des enzymes pancréatiques et glucosidases [10].

De même, Certaines des plantes exploitées dans la médecine traditionnelle arabe ont fait l'objet de plusieurs études pour soit la confirmation ou l'identification de nouveaux composés intéressant dans le traitement du diabète. Quelques plantes ont démontré qu'elles inhibent les activités d' α -amylase et d' α -glucosidase *in vitro* et *in vivo*, y compris le *Geranium graveolens* et *Varthemia iphionoides*, *Rheum ribesand*, *Sarcopoterium spinosum* et *Pistacia atlantica* [10].

En outre, Plusieurs familles de plantes utilisées couramment en médecine traditionnelle africaine, dont l'activité antidiabétiques a été prouvée. Par exemple, la famille des *Curcubitaceae* avec *Momordica charanti*, ou encore celle des *Liliacées* avec *Allium cepa* [1].

Notamment, les galles ont été utilisées comme remède traditionnel pour le traitement du diabète, par exemple les galles de *Quercus infectoria* [18]. Etant donné que l'évaluation scientifique manque encore à cet égard et que l'activité hypoglycémiques des différentes parties de *Pistacia atlantica* a été démontrée par certains auteurs [6, 8, 13], la présente étude a été réalisée pour évaluer l'activité inhibitrice des galles *P. atlantica* contre l' α -amylase et l' α -glucosidase et déterminer la meilleur période de l'activité inhibitrice.

5-Matériel et Méthodes

5-1-Produits chimiques

L' α -amylase (*Aspergillus oryzae*), α -glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*), amidon, saccharose et DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) sont de la marque Sigma- Aldrich.

5-2-Préparation des échantillons

La préparation des extraits méthanoliques des galles des arbres du *Pistacia atlantica* de la région de Laghouat est la même que celle réalisée pour l'évaluation des teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes montrés dans le chapitre 03. Les échantillons des galles ont été divisés en deux groupes selon le genre (mâle et femelle), un code a été attribué pour chaque échantillon présenté dans le **tableau 01** du **chapitre 03**.

5-3-Méthodes

Plusieurs méthodes sont exploitées pour évaluer l'activité hypoglycémiques des plantes. Par exemple, des techniques *in vivo* qui consistent à utiliser divers animaux de laboratoire (exemples, souris, rats ...etc.), également des essais cliniques sur des patients diabétiques et autres méthodes *in vitro* qui permettent de tester l'activité inhibitrice des plantes sur les enzymes digestives glucidiques tels que d' α -amylase et α -glucosidase [11]. Le choix de la présente étude se porte sur les techniques *in vitro*. Avant l'évaluation de l'activité inhibitrice des deux enzymes, la concentration des deux substrats utilisés pour les deux enzymes ainsi que le temps de l'incubation de la réaction enzymatique ont été d'abords déterminés à partir d'une série de concentrations de substrat et un intervalle de temps d'incubation, respectivement.

5-3-1- Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' α -amylase

L'activité inhibitrice sur l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* a été déterminée par la méthode décrite par **Thilagam et al. (2012)** [19] avec quelques modifications. Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 200 μ l d'un tampon de phosphate de potassium 0,03 M (pH=7), 100 μ l de substrat (solution d'amidon à 10%) et 100 μ l d'extrait (0,5-3 mg/ml). Après une pré-incubation à 37°C pendant 5 min, 100 μ l de la solution α -amylase (13U/ml) a été ajoutée. La réaction enzymatique a été incubée à 37°C pendant 2 min puis arrêtée par addition de 1 ml de DNS (2,5g de 3,5-dinitrosalicylique, 5g de phénol cristallin, 50g double tartrate de Na et K, 0.125g de sulfite de sodium et 5g NaOH sont dissous dans 500 ml d'eau distillée). Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 5 min, puis dilué en ajoutant 2 ml d'eau distillée pour diminuer l'absorbance. L'absorbance de la solution a été mesurée à 530 nm. La solution sans échantillon représente le témoin et la solution sans substrat représente le blanc du test. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$PI (\%) = \frac{(A_t - A_E)}{A_t} \cdot 100 \quad (1)$$

A_t : Absorbance du témoin (sans l'ajout de l'extrait) ;

A_E : 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 (IC₅₀).

5-3-2- Evaluation de l'activité inhibitrice sur l' α -glucosidase

L'activité inhibitrice sur l' α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* a été effectuée selon la méthode décrite par **Thilagam et al. (2012)** [19] avec quelques modifications. Un mélange contenant 100 μ l d'extrait (0,01-0,05 mg/ml) et 1ml de substrat (solution de saccharose à 80 mM) a été pré-incubé à 37°C pendant 5 min. En suite, 100 μ l de la solution α -glucosidase (2,32U/ml) a été ajoutée. La réaction enzymatique a été incubée à 37°C pendant 35 min puis arrêtée par addition de 1 ml de DNS (2,5g de 3,5-dinitrosalicylique, 5g de phénol cristallin, 50g double tartrate de Na et K, 0.125g de sulfite de sodium et 5g NaOH sont dissous dans 500 ml d'eau distillée). Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 5 min, puis dilué en ajoutant 2 ml d'eau distillée. L'absorbance de la solution a été mesurée à 530 nm. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant l'équation (1) en dessus pour déterminer par la suite la valeur d'IC₅₀ de chaque extrait

5-3-3-Traitemant statistique

Toutes les expériences ont été répétées 3 fois. Les données ont été exprimées par une moyenne, plus ou moins écart-type et calculées par le programme Excel 2013.

6-Résultats et discussion

L'une des approches thérapeutiques approuvées pour traiter le diabète sucré est de réduire l'hyperglycémie postprandiale, en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes d'hydrolyse des glucides, telles que α -amylase et α -glucosidase dans le tube digestif [17].

Cette étude a été conçue pour établir les activités inhibitrices de dix extraits méthanoliques des galles de *P. atlantica* de la région de Laghouat (cinq extraits provenant des galles mâles et cinq autres des galles femelles) contre l' α -amylase originaire d'*Aspergillus* et α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*. La représentation des moyennes de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations a été effectuée que pour l' α -amylase, comme le montre la **figure 01**. De plus, le **tableau 01** illustre les valeurs de la concentration des extraits qui inhibe 50% de l'activité enzymatique (IC₅₀) en mg/ml, le IC₅₀ d' α -amylase a été déterminé à partir des droites représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations croissantes allant de 0,5 à 3 mg/ml (**Annexe 03**), par contre le IC₅₀ d' α -glucosidase a été estimé en utilisant deux concentrations donnant des inhibitions entre 33,21 à 68,14%.

Tableau 01 : Valeurs d'IC₅₀ (mg/ml) des α -amylase et α -glucosidase des galles de *P. atlantica* de la région de Laghouat.

Mois	α -amylase		α -glucosidase	
	GM	GF	GM	GF
Juillet	2,59±0,12	2,00±0,22	0,034±0,0006	0,039±0,0004
Aout	2,38±0,03	2,19±0,20	0,035±0,0001	0,019±0,0005
Septembre	2,08±0,29	2,30±0,36	0,022±0,0008	0,042±0,0032
Octobre	2,22±0,05	2,36±0,17	0,024±0,0004	0,037±0,0007
Novembre	3,29±0,07	2,34±0,06	0,022±0,0004	0,022±0,0013

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions± écart type. (GM-GF) : galles mâles et femelles.

Comme l'indique la figure 01, le maximale de la moyenne de pourcentage d'inhibition est de 61,68% (GM) et de 66,78% (GF) pour une concentration de 3 mg/ml. De plus, la valeur moyenne d'IC₅₀ des extraits sont de 2,51± 0,47 mg/ml pour les GM et de 2,24± 0,15 mg/ml pour les GF. Ces résultats révèlent que les extraits de galles (M et F) de *P. atlantica* inhibent l'enzyme α -

amylase. Cependant, les valeurs obtenues sont beaucoup plus faible par rapport à celles trouvées par **Ben-Ahmed (2016)** [13] sur les feuilles de *P. atlantica* de la même région, qui sont de 83.33 % pour une concentration de 0,08 mg/ml et un IC_{50} de $47,79 \pm 8,90 \mu\text{g} / \text{ml}$.

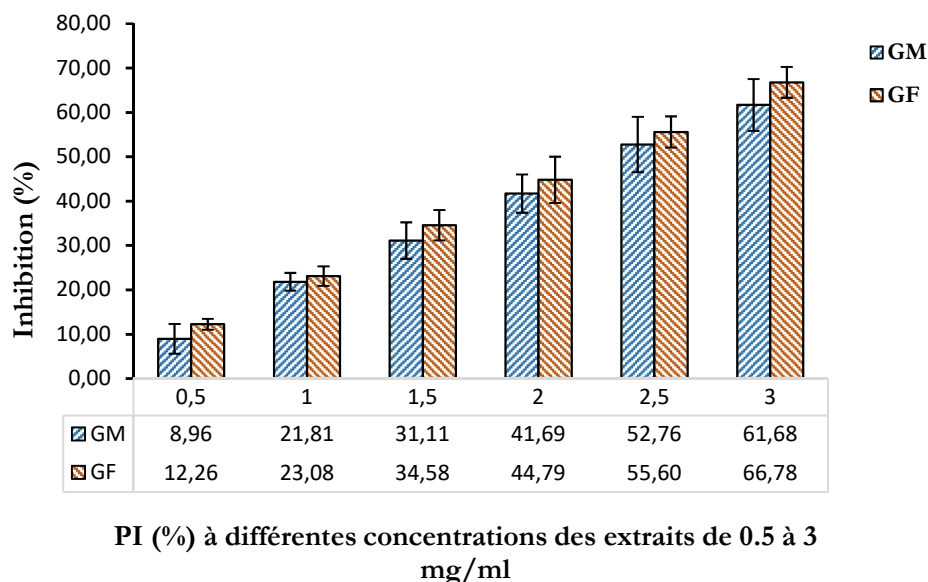


Figure 01 : La moyenne des pourcentages d'inhibition des galles de *P. atlantica* contre α -amylase.

En outre, α -glucosidase est une enzyme qui active l'étape finale du processus digestif, en hydrolysant les disaccharides en monosaccharide absorbable. D'où la prédominance dans la recherche des extraits naturels qui permettent d'inhiber l'enzyme pour la prévention du diabète [13]. Les résultats de la moyenne d' IC_{50} des extraits de *P. atlantica* par rapport à l' α -glucosidase sont de $0,02 \pm 0,006 \text{ mg/ml}$ pour les GM et $0,03 \pm 0,01 \text{ mg/ml}$ pour les GF. Si on compare nos résultats à ceux de **Ben-Ahmed (2016)** [13] qui sont de $14,04 \pm 2,52 \mu\text{g/ml}$, ils sont légèrement faibles. De plus, il est à signaler qu'il faut environ 80 fois plus de galles de *P. atlantica* pour inhiber 50% de l'activité de l' α -amylase par rapport à l' α -glucosidase. Cette constatation est en accord avec les observations de **Dou et al. (2012)** [17] insistant sur le fait qu'il est plus fréquent de trouver des plantes naturelles ayant une activité inhibitrice plus forte contre l' α -glucosidase que contre l' α -amylase.

Plusieurs études récentes sur les polyphénols végétaux ont démontrés leur capacité à inhiber les enzymes digestives glucidiques [19]. Ce qui nous amène à penser que l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase trouvée dans nos expériences pourrait être dû à la présence des composés phénoliques. Selon **Thilagam et al. (2012)** [19], ces composés ont été jugés responsables de la réduction de la glycémie. Par ailleurs, des études ont même trouvé une corrélation directe entre la quantité de composés phénoliques dans les extraits végétaux et leur capacité à inhiber les enzymes

digestives glucidiques [17]. Ce qui peut expliquer les observations de nos résultats ; la meilleure activité inhibitrice des enzymes α -amylase et α -glucosidase (**Tableau 01**) correspond aux teneurs en composés phénoliques totaux des galles les plus élevées (**Tableau 02 chapitre 03**).

De plus, la présence des flavonoïdes et des tanins constituent un indicateur important pour l'activité hypoglycémiant [20]. D'après **Lo Piparo et al. (2008)** [21] qui ont étudié sur les interactions entre les flavonoïdes et l' α -amylase humaine afin de comprendre les besoins moléculaires pour l'inhibition enzymatique, la puissance de l'inhibition est corrélée avec le nombre de groupes hydroxyle sur le cycle B du squelette des flavonoïdes. Les tanins sont également capables d'inhiber l'activité enzymatique de l' α -amylase car ce sont des agents de précipitation des protéines formant des complexes insolubles avec les protéines [22].

D'après le tableau 01, la variation mensuelle influence très peu pas la concentration d'inhibition des deux enzymes (α -amylase et α -glucosidase).

7-Conclusion

En raison de l'augmentation de l'ampleur du diabète, plusieurs efforts ont été employés pour trouver des extraits naturels comme moyen de prévention contre l'hyperglycémie et ses effets néfastes. Les résultats de cette étude démontrent la capacité des extraits de galles mâles et femelles de *Pistacia atlantica* à inhiber les enzymes impliquées dans la digestion et l'assimilation intestinales des glucides. En outre, l'inhibition d' α -glucosidase par les extraits est plus puissante que pour l' α -amylase. Bien qu'il semble que les polyphénols soient responsables des activités d'inhibition de ces extraits, cela doit être confirmé. Ainsi, il faudra identifier et isoler les composés potentiellement responsables de l'activité antidiabétique et faire une étude plus poussée en utilisant des techniques in vivo pour renforcer l'efficacité des galles de *P. atlantica* dans la lutte contre le diabète.

Références

- [1] 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.
- [2] Medjdoub, H. (2012). Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. Thèse doctorale en biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen (Algérie): 127 p.
- [3] 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.
- [4] Apema, R., Mozouloua, D., Abeye, J. and Salamate, F. M. L. (2012). «Les plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète par les tradipraticiens à Bangui,» *CAMES*, vol. 16: 1-7.
- [5] Ndomou, M., Djidjou, P. K., Ayong, M. N., Gouado, I. and Tchiegang, C. (2014). «Evaluation de l'activité antidiabétique des extraits de feuilles de *Gnetum africanum* et *Gnetum bulchozzianum* (Gnétacées),» *Sciences Technologies et Développement*, vol. 15: 60-65.
- [6] Hashemnia, M., Nikousefat, Z. and Yazdani-Rostam, M. (2015). «Antidiabetic effect of *Pistacia atlantica* and *Amygdalus scoparia* in streptozotocin-induced diabetic mice,» *Comp Clin Pathol*, 24(16):1301–1306.
- [7] Masunda, T.A., Mbala, M.B., Kayembre, S.J., Longoma, B.F., Ngbolua, K.N., Tshibangu, D.S.T. and Mpiana, P.T. (2014). «Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild. (Arecaceae),» *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8 (16): 2441-2451.
- [8] Hamdan, I.I. and Afifi, F. U. (2008). «Screening of Jordanian Flora for α -Amylase Inhibitory Activity,» *Pharmaceutical Biology*, 46 (11):746–750.
- [9] Jarald, E., Joshi, S.B. and Jain, D.C.(2008). «Diabetes and Herbal Medicines,» *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 7(11):97-106.
- [10] Etxeberría, U., De la Garza, A. L., Campión, J., Martínez, J. A. and Milagro, F. I. (2012). «Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase,» *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(13): 269-297.
- [11] Al-Aboudi, A. and Afifi, F.U. (2010). «Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: A review of scientific evidence,» *Pharmaceutical Biology*, 49 (13): 221–239.
- [12] Brayer, G.D., Luo, Y. and Withers, S.G. (1995). «The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes,» *Protein Science*, vol. 4 : 1730-1742.
- [13] Ben Ahmed, Z.(2016). Antioxidant activity of phenolic extracts of *Pistacia atlantica* leaves. Doctoral thesis in sciences, Specialty: Chemistry, Université Amar Telidji Laghout (Algérie), 218p.
- [14] Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V. and Prakash, O. (2011). « α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes,» *Pharmacognosy Reviews*, 5(19):19-29.
- [15] Robyt, J.(2005). «Inhibition, activation, and stabilization of α -amylase family enzymes,» *Biologia, Bratislava*, 60/ Suppl., vol.16: 17—26.

- [16] 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: moléculaire, Université Montréal, 170p.
- [17] Dou, F., Xi, M., Wang, J., Tian, X., Hong, L., Tang, H. and Wen, A. (2013). « α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of saponins from traditional Chinese medicines in the treatment of diabetes mellitus» *Pharmazie*, vol. 68: 300–304.
- [18] Basri D., F., Fan S., H. (2005). «The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents», *Indian J Pharmacol*, vol. 37: 26-29.
- [19] Thilagam, E., Parimaladevi, B., Kumarappan, C. and Mandal, S.C. (2012). « α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of *Senna surattensis*», *J Acupunct Meridian Stud*, vol. 6 (11):24-30.
- [20] Mangambu M. J. D., Mushagalusa, K. F. and Kadima, N. J. (2014). «Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R.D.Congo).» *Journal of Applied Biosciences*, vol. 75: 6211– 6220.
- [21] Lo Pipara, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M. and Chou, C.J. (2008). «Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase», *J. Med. Chem.*, vol. 51: 3555-3561.
- [22] Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O. and Silveira, D. (2012). « α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated compounds from Plant Source», *J Pharm Pharmaceut Sci*, vol. 15 (11):141 - 183.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été consacré pour étudier l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, les variations mensuelles de la quantité des composés phénoliques des galls mâles et femelles de *Pistacia atlantica* récoltées dans la région sud algérienne (Laghouat) et évaluer l'activité antioxydante ainsi que l'activité biologique (activité inhibitrice de l' α -amylase et α -glucosidase).

Nous avons cherché à combiner une méthode statistique (méthode de surface de réponse) en utilisant le modèle de Box-Behnken avec des tests expérimentaux réalisés au laboratoire pour trouver les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques. Les régressions polynomiales du modèle Box-Behnken sont en accords avec les résultats expérimentaux avec des coefficients de détermination allant de 0,82 à 0,99. D'après les résultats le rapport solide-liquide a eu le rôle le plus important pour l'extraction des composés phénoliques suivie de la température et du temps d'extraction. Afin d'atteindre les performances d'extraction maximales (teneur en CPT, flavonoïdes et tanins) et une meilleure activité antioxydante, un temps d'extraction de 40 min, un rapport solide-liquide de 1 :20 (g/ml) et une température d'extraction de 60°C ont été enregistrés comme conditions opératoires optimales.

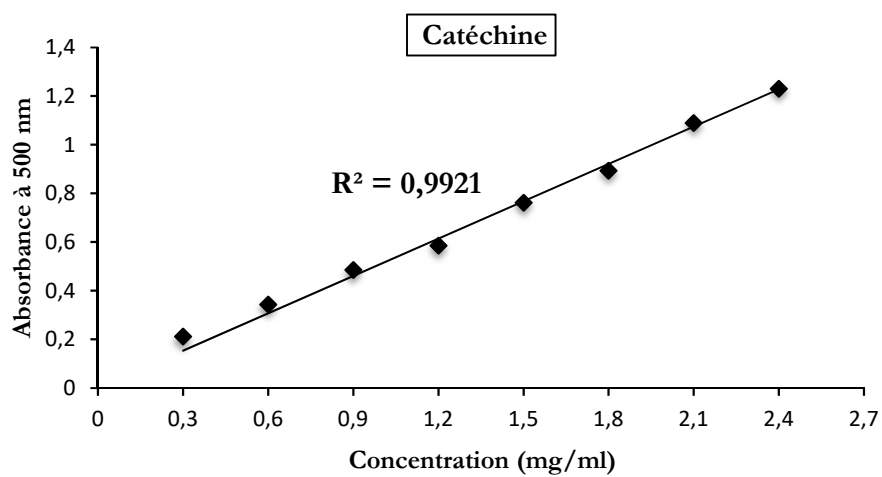
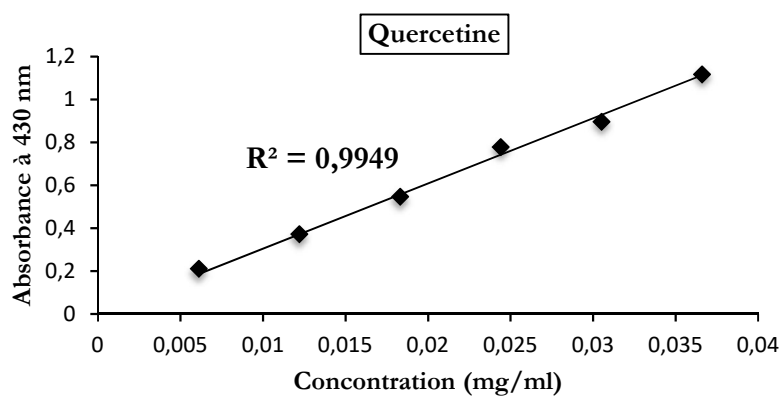
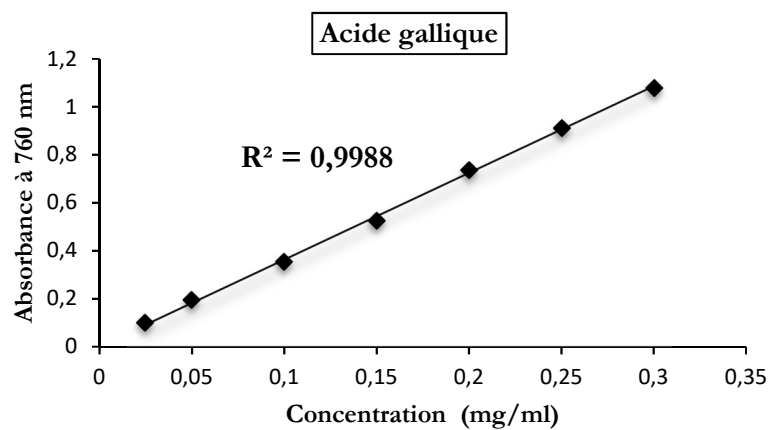
Les résultats obtenus montrent qu'il y a une influence de la période de récolte et le genre sur les quantités des composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et les tanins, ainsi que sur les activités antioxydantes (DPPH[•], NO[•] et chélation de fer) des galls mâles et femelles de *P. atlantica*. La teneur la plus élevée en composés phénoliques et le meilleur pouvoir antioxydant ont été enregistrés en mois de septembre et Juillet. Cependant, le genre ne semble pas avoir une relation directe avec la quantité des composés phénoliques et activité antioxydante des galls de *P. atlantica*.

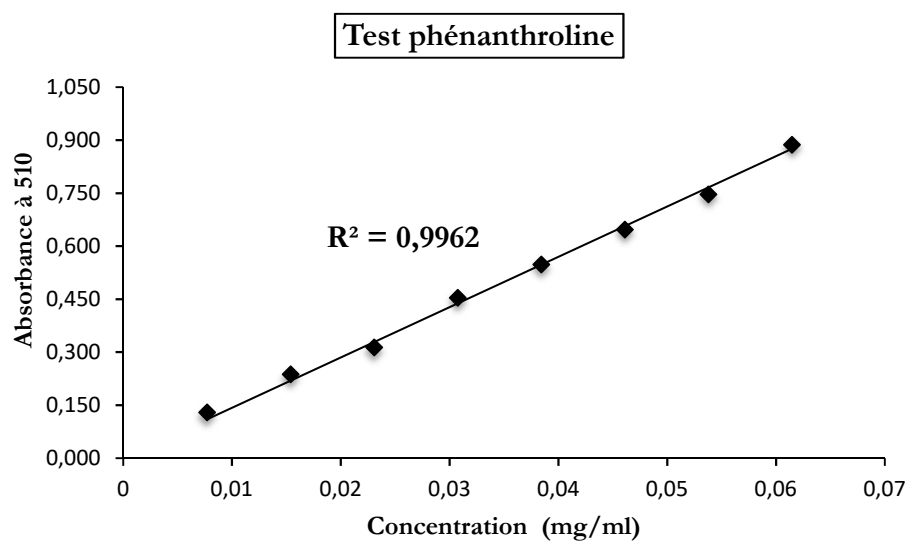
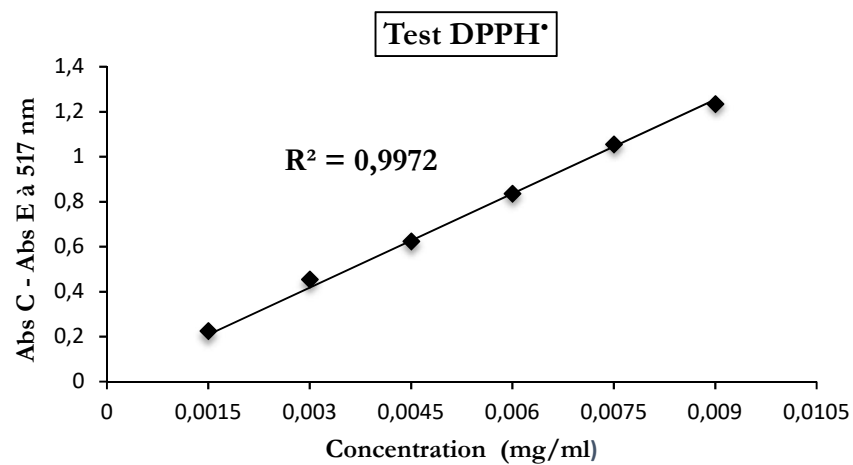
L'étude de l'activité inhibitrice des extraits phénoliques des galls de *P. atlantica* contre les enzymes digestives (α -amylase et α -glucosidase) a révélé que les extraits sont effectivement des inhibiteurs contre les deux enzymes. De plus les extraits ont une activité inhibitrice plus élevée contre α -glucosidase ($IC_{50} = 0,03 \pm 0,01$ mg/ml) contre α -amylase ($IC_{50} = 2,37 \pm 0,36$ mg/ml). Le mois de récolte des galls n'a pas beaucoup d'influence sur le pouvoir inhibiteur des enzymes.

Malgré les résultats obtenus dans cette étude, d'autres études restent nécessaires à savoir l'extension de la période de récolte pour vérifier s'il y a une possibilité d'avoir des teneurs encore plus élevées en composés phénoliques ou encore d'autres facteurs environnementaux pouvant avoir des rôles spécifiques dans la quantité et la qualité des composés phénoliques.

D'autres recherches plus approfondies doivent être effectuées telles que l'étude qualitative des galls de *P. atlantica* et l'identification des composés bioactifs responsables à des activités antioxydantes et biologiques. De même, la confirmation de l'activité biologique telle que l'activité inhibitrice des enzymes de ces extraits est nécessaire par des méthodes *in vivo*.

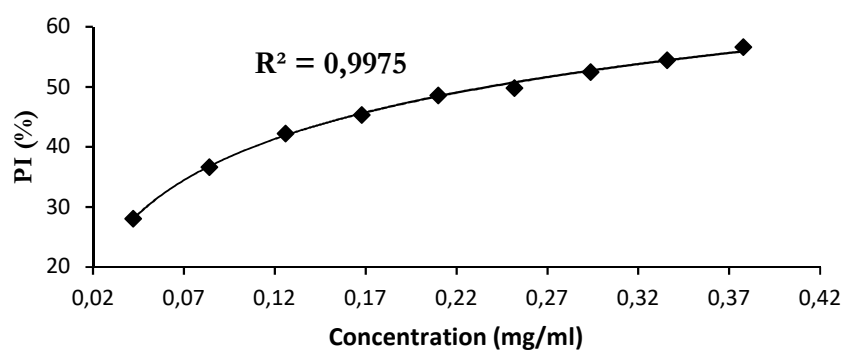
Annexes

Annexe 01 : Les courbes d'étalonnage

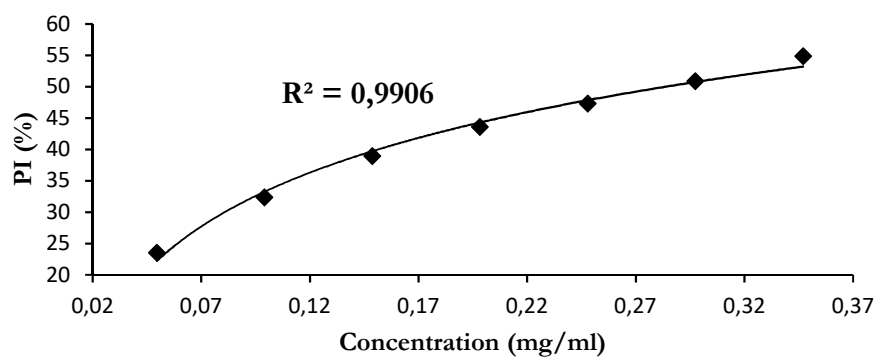


Annexe 02 : Les graphes représentant des pourcentages d'inhibition du radical NO^{*} en fonction des concentrations des extraits.

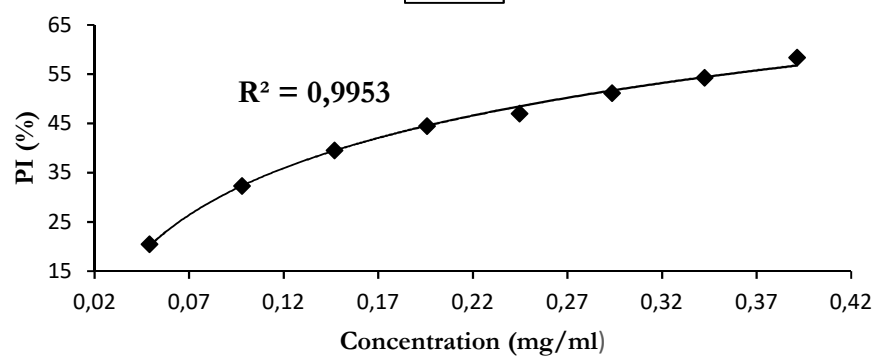
GM 07

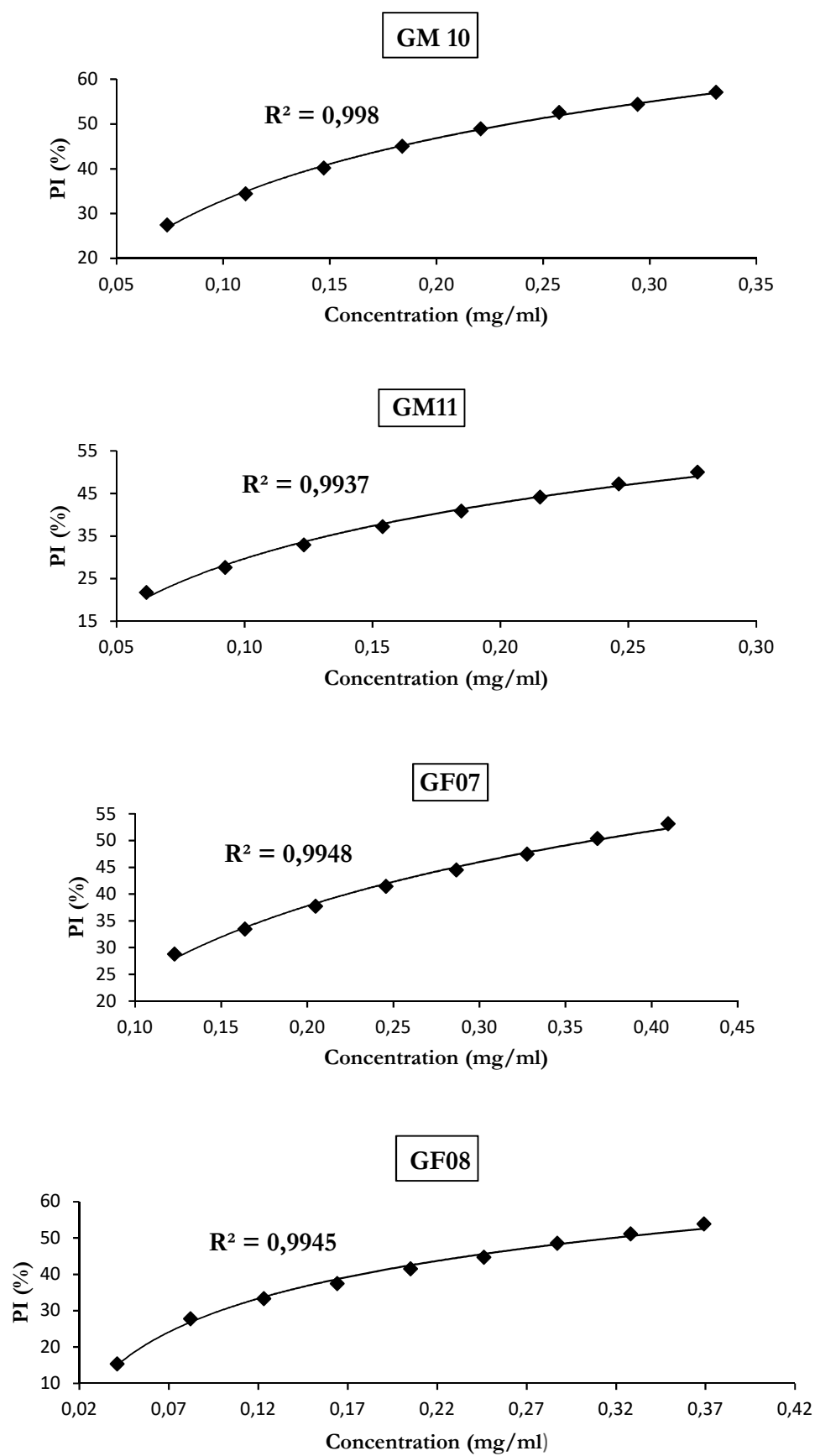


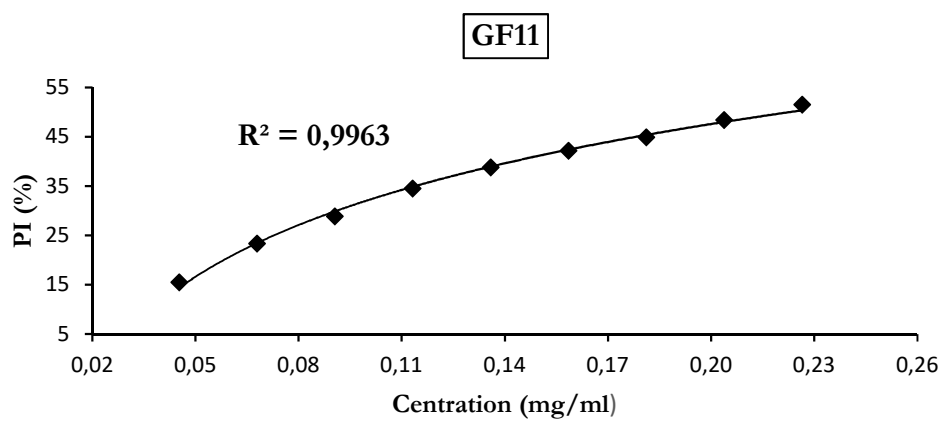
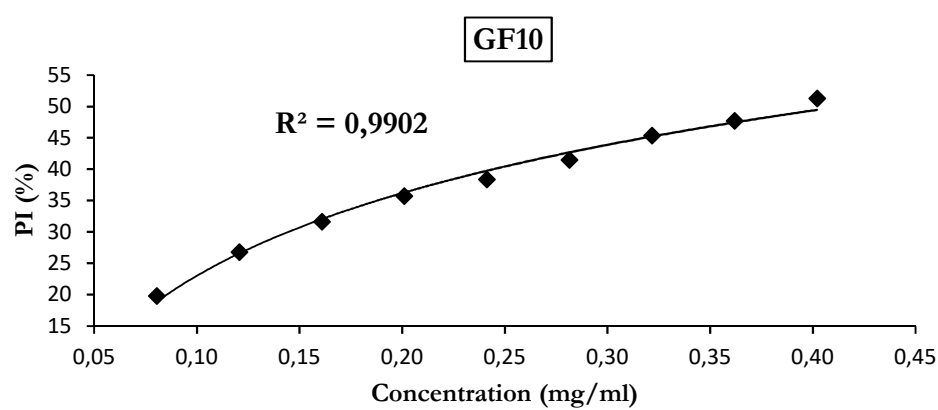
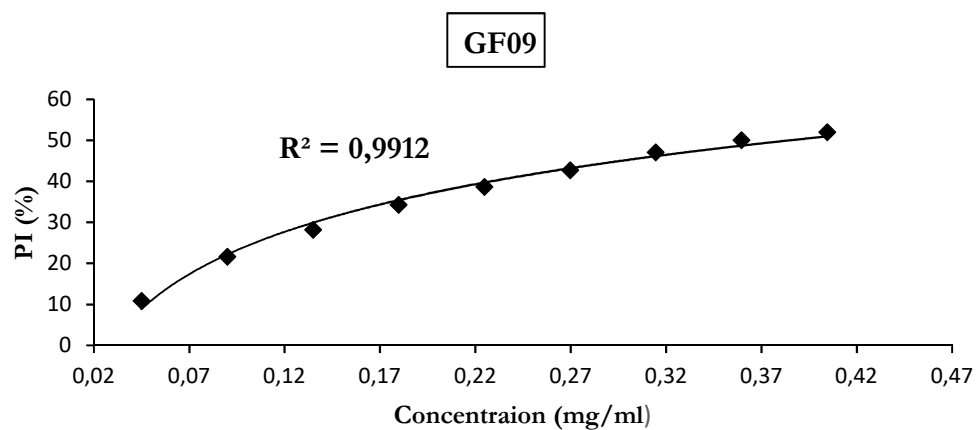
GM08



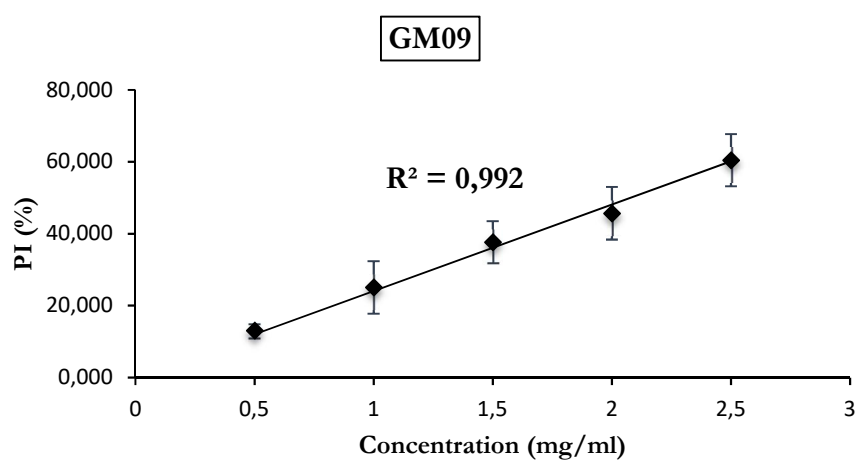
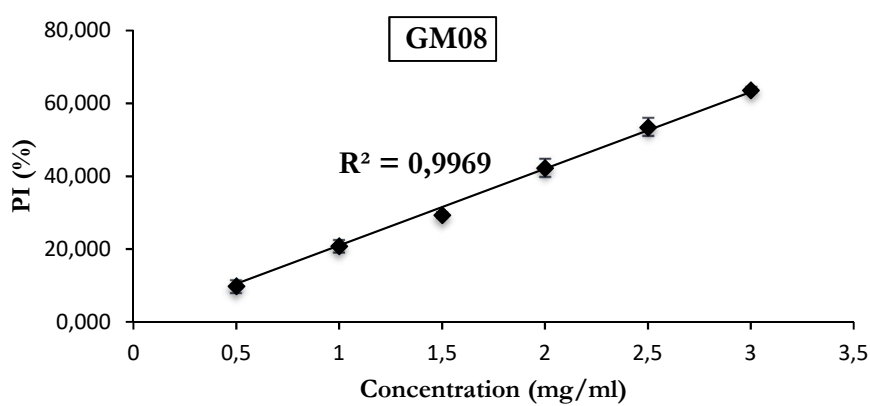
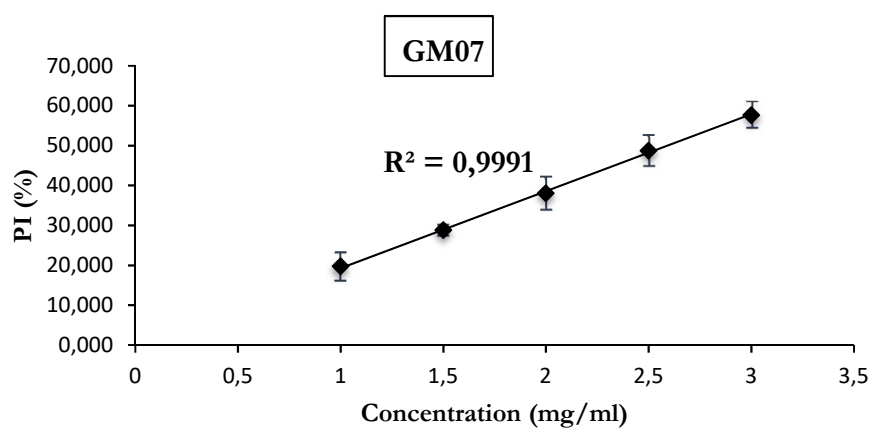
GM09

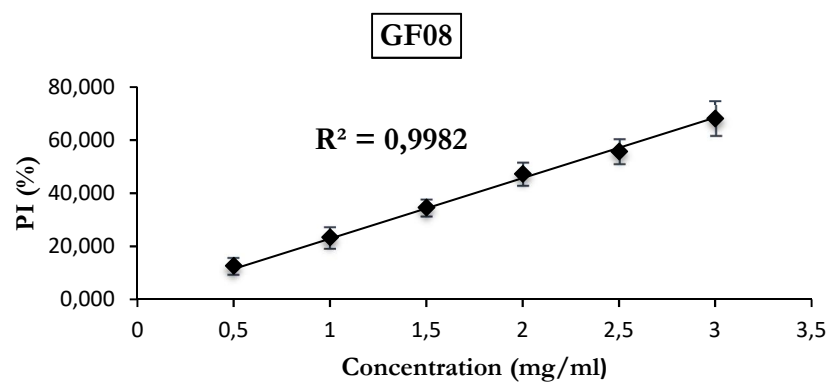
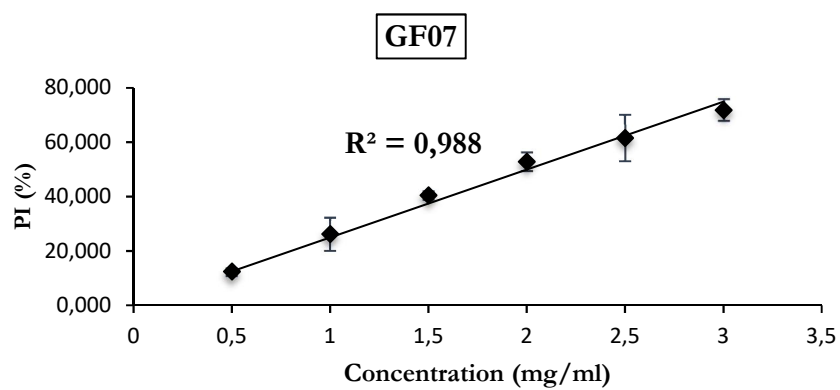
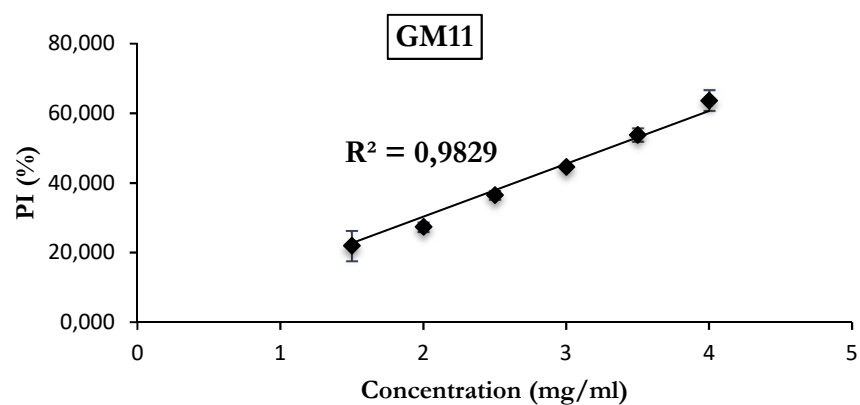
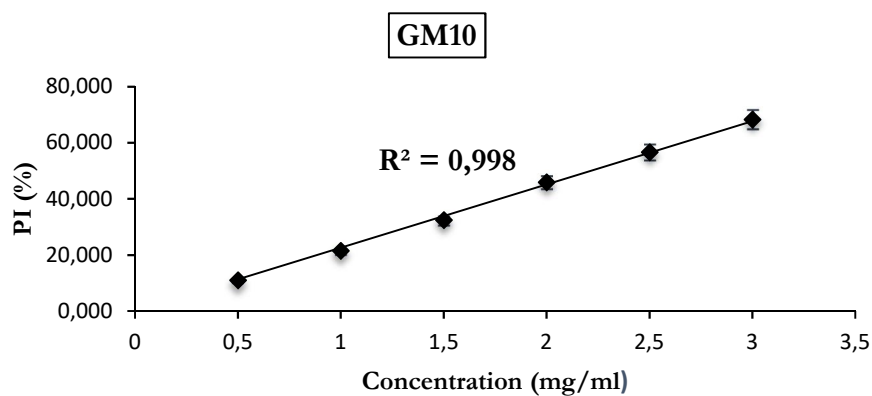


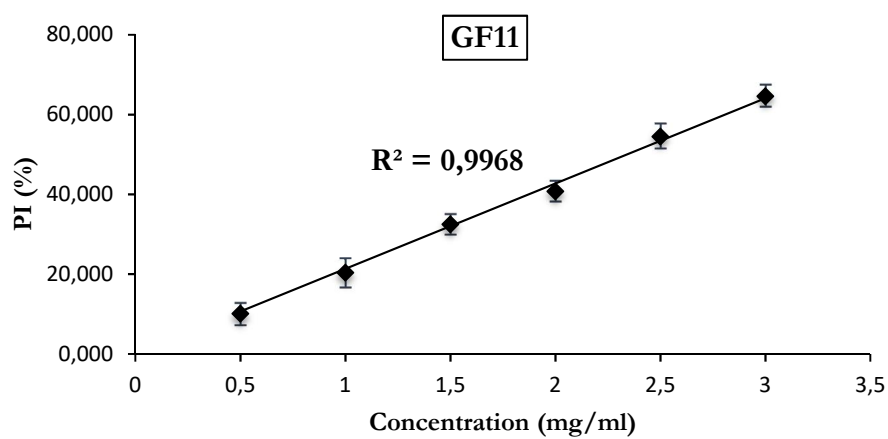
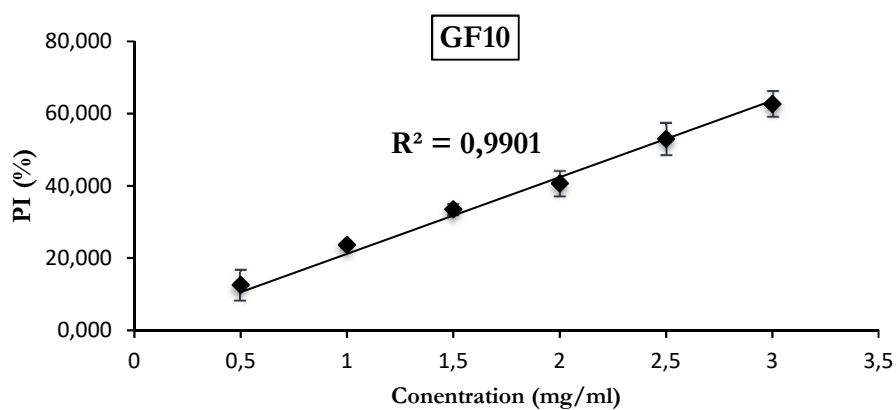
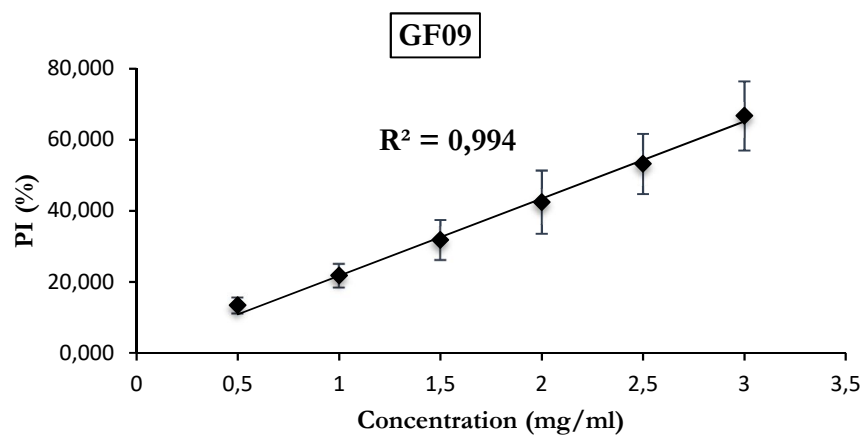




Annexe 03 : Les droites représentant les pourcentages d'inhibition contre α -amylase en fonction des concentrations des extraits







Résumé

Dans le présent travail, la méthode de la surface de réponse (MSR), basée sur le modèle de Box-Behnken a été utilisée pour déterminer les conditions optimales de l'extraction des composés phénoliques issus des galls de *Pistacia atlantica*. Trois variables ont été évaluées : le temps (40 min, 45 min et 50 min), le rapport solide-liquide (1:10 g/ml, 1:20 g/ml et 1:30 g/ml) et la température (40°C, 50°C et 60°C). D'après les trois dimensions de surface de réponse, l'optimum d'extraction en composés phénoliques est atteint dans les conditions particulières de temps (40 min), rapport solide-liquide (1:20 g/ml) et température d'extraction (60°C). Dans ces conditions, les teneurs en CPT, flavonoïdes et tanins étaient 139,88 mg EAG/g MS, 2,43 mg EQ/ g MS, 121,32 mg EC/ g MS respectivement.

L'effet de la variation mensuelle et du genre sur la teneur des composés phénoliques et l'activité antioxydante des galls mâles et femelles de *P. atlantica*. Les galls mâles et femelles présentent des teneurs élevées en CPT, flavonoïdes et tanins en mois de septembre, tandis que, pour la meilleure activité antioxydante (DPPH•, NO• et Chélation de fer) est en mois de juillet et septembre. Les galls males présente des teneurs plus élevées en composés phénolique par rapport aux galls femelles.

L'évaluation de l'activité inhibitrice d' α -amylase et d' α -glucosidase a été aussi étudiée. La valeur moyenne d'IC50 contre α -amylase pour les extraits des galls mâles et femelles est de $2,51 \pm 0,07$ mg/ml et $2,24 \pm 0,15$ mg/ml, respectivement. Par contre, elle est de $0,03 \pm 0,01$ mg/ml pour les GM et $0,02 \pm 0,06$ mg/ml pour les GF. Les extraits ont une activité inhibitrice plus importante contre α -glucosidase.

Mots clés : Galle, *Pistacia atlantica*, composés phénoliques, activité antioxydante, α -amylase et α -glucosidase.

ملخص

من أجل تحديد الشروط المثالية لاستخلاص المركبات الفينولية ناتجة من عفصة *Pistacia atlantica* (بطم الأطلسي) تم استخدام طريقة الاستجابة السطحية (MSR) اعتمادا على نموذج Box-Behnken. تم تقييم ثلاثة متغيرات على ثلاثة مستويات: زمن الاستخلاص (40، 45، 50 دقيقة)، نسبة تركيز المادة/مذيب (1:10، 1:20 و 1:30 غ/مل) ودرجة الحرارة (40، 50 و 60°C). وفقا لسطح الاستجابة ثلاثية الأبعاد، تم العثور على الشروط المثالية لاستخلاص المركبات الفينولية وهي كالتالي: زمن الاستخلاص (40 د)، تركيز (1:20 غ/مل) ودرجة الحرارة (60°C). وفي هذه الشروط، تكون كميات المركبات الفينولية الكلية، الفلافونويد، التانات، 139,88 مغ مكافئ حمض الغاليك / غ الوزن الجاف، 2,43 مغ مكافئ كيرستين / غ الوزن الجاف، 121,32 مغ مكافئ كاتشين / غ الوزن الجاف.

قمنا بتحقيق تأثير التغيرات الشهرية والجنس على محتوى المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة من عفصة الذكور والاناث *P. atlantica*. محتوى المركبات الفينولية الكلية، الفلافونويد و التانات مرتفعة في شهر سبتمبر، اما فيما يخص أنشطة المضادات للأكسدة (DPPH•، PT، NO•) سجلت أحسنها في شهري جويلية و سبتمبر.

وقد بينت الدراسة ان المستخلصات الفينولية لها القدرة على " تثبيط انزيمات الفا-الاميلازوالفا-غلوكوزيداز". القيم المتوسطة ل IC50 ضد الفا-اميلاز لمستخلصات *P. atlantica* ذكورية و انثوية مساوية ل: $2,51 \pm 0,07$ مغ/مل، $2,24 \pm 0,15$ مغ/مل على التوالي و $0,03 \pm 0,01$ مغ/مل و $0,02 \pm 0,06$ مغ/مل على التوالي ضد الفا-غلوكوزيداز. نشاط المثبط لدى المستخلصات أكبر ضد الفا-غلوكوزيداز.

الكلمات المفتاحية: عفصة، *Pistacia atlantica*، المركبات الفينولية، نشاط مضاد للأكسدة، الفا-اميلاز و الفا-غلوكوزيداز.

Abstract

In the present study, the response surface methodology (RSM) using Box-Behnken design (BBD) was employed to optimize conditions for extraction of phenolic compounds from the galls of *Pistacia atlantica*. Three variables were evaluated at three levels (15 experimental runs): the extraction time (40 min, 45 min and 50 min), the solid-liquid ratio (1:10 g/ml, 1:20 g/ml and 1:30 g/ml) and temperature (40°C, 50°C and 60°C). According to the three-dimensional response surface, the optimum extraction phenolic compounds were found at 40 min extraction time, 1:20 g/ml solid-liquid ratio and 60°C extraction temperature. In these conditions, the content of TPC, flavonoids and tannins was 139,88 mg GAE/g DW, 2,43 mg QE/ g DW, 121,32 mg EC/ g DW, respectively.

We investigated to study the effect of monthly variation and gender on phenolic compound content and antioxidant activity of male and female *P. atlantica* galls. High content of TPC, flavonoids and tannins is obtained in the month of September while, a great antioxidant capacity (DPPH•, NO• and Iron Chelation) is observed in July and September. Male galls have higher levels of phenolic compounds than female galls.

The evaluation of α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity *in vitro* was also studied. The average of the values of IC50 for α -amylase for male and female gall extracts is 2.51 ± 0.07 mg/ml and 2.24 ± 0.15 mg/ml, respectively. However, it is 0.03 ± 0.01 mg / ml for MG and 0.02 ± 0.06 mg / ml for FG. The extracts have greater inhibitory activity against α -glucosidase.

Key words: Gall, *Pistacia atlantica*, phenolic compounds, antioxidant activity, α -amylase and α -glucosidase.