

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليدجي
UNIVERSITE AMAR TELIDJI
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
THÈSE DE DOCTORAT LMD

SPÉCIALITÉ : Biologie

OPTION : Biochimie des Produits Naturels.

PAR :

Fatna BENTIRECHE

Effet de la maturité des fruits de pistachier de l'atlas sur la variation de la composition de leurs lipides sur l'activité antioxydante.

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

M. OUINTEN Mohamed	Professeur	Université Amar Telidji de Laghouat	Président
M. NADJEMI Boubekour	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examineur
M. BOUDJENIBA Messaoud	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examineur
M. YOUSFI Mohamed	Professeur	Université Amar Telidji de Laghouat	Encadreur
M.GUENANE Hamid	MCB	Université Amar Telidji de Laghouat	Co- Encadreur

Année Universitaire 2019/2020

Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire "Ya Kayoum".

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère Fatima Zohra Que dieu la garde et la protège.

A mon cher grands-parents maternel BENZOUBIR Ahmed (que Dieu ait son âme), école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. A mon père Amar (que Dieu ait son âme).

A ma chère grand- mère maternel Fatna et mes chers grands-parents paternels.

A mon mari.

A ma chère fille : Djana Rital.

A mon beau-père Abdelkader, et ma belle-mère Amina.

A mon frère Slimane et son conjoint.

A mes beaux-frères et mes belles-sœurs.

A mes chers oncles : Allal, Ali, Mebark, Abderrahmane, Mohamed, Mourad, Fethi et leur conjoint.

A mes adorables tantes : Khadidja, Souad, et leur conjoint que Dieu les bénissent.

A tous mes amis avec qui j'ai passé de meilleurs moments.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Remerciements

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire de recherche des Sciences Fondamentales Université Amar Tèlidji -Laghouat.

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les années de maîtrise je permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Je tiens à la fin de ce travail à remercier ALLAH le tout puissant de j'avoir donné la foi et de j'avoir permis d'en arriver là.

je remercier vais également à mon parents, mes oncles et tantes à de tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour je permettre de suivre mes études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessez de j'encourager tout au long des mes années d'étude.

je remercie infiniment Pr. YOUSFI Mohamed, directeur de ce mémoire.

Mes sincères remerciements iront également à Dr Guenane. Hamid, Co-directeur de ce mémoire.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail : Pr. NADJEMI Boubakeur et Pr. BOUDJENIBA Messaoud pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse et Pr. Ouinten Mohamed pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe administrative et enseignante des départements de Biologie et de chimie de l'Université Amar TÈLIDJI.

J'adresse encore mes remerciements à tous les doctorants et l'ingénieure du laboratoire de recherche qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Mes remerciements vais aussi à tous les amis et tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Enfin, j'adresse nos remerciements aux membres du jury qui ont acceptés d'examiner mon travail.

Résumé

Pistacia atlantica, espèce très répandue dans les régions arides et semi-arides, constitue une source inépuisable de molécules douées d'activités biologiques. Ce travail s'est intéressé à l'influence du degré de maturité et des facteurs environnementaux sur le contenu en lipides et composés phénoliques ainsi que sur l'activité antioxydante de ces composés des fruits de Pistachier de l'atlas. Les résultats obtenus ont montré que les huiles des fruits immatures présentent un faible rendement en huile, qu'ils sont riches en acides insaturés, en stérols, en tocophérols et en fractions insaponifiables. Les huiles des fruits immatures collectés très précocement sont marquées par une proportion assez significative en acide linoléique. L'activité antioxydante des huiles des fruits immatures est la plus importante. Par contre la fraction insaponifiable des huiles des fruits matures s'est distinguée par le pouvoir antioxydant le plus élevée par rapport à celle des huiles des fruits immatures. Les teneurs en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante sont substantiellement prononcés aussi bien au niveau des tourteaux qu'au niveau des huiles des fruits immatures. L'activité antioxydante des huiles de fruits immatures serait due principalement aux composés phénoliques. En revanche, pour les huiles des fruits matures, la fraction insaponifiable aurait le rôle prépondérant dans l'activité antioxydante. En dernier lieu, les facteurs environnementaux en particulier ceux en rapport avec l'altitude auraient un effet marqué sur, notamment la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante dans les fruits.

Mots clés : *Pistacia atlantica*, Fruit, Maturité, Huile, Acide gras, Tocophérol, Tourteaux, Polyphénols, Activité antioxydante, Facteurs environnementaux.

Abstract

Pistacia atlantica, a well-known species in arid and semi-arid regions, it contains a bottomless source of molecules endowed with biological activities. This work interested in the influence of the maturity degree and environmental factors on both lipids and phenolic contents as well as on the antioxidant activity of these compounds of pistachios fruits. The results obtained showed that the oils of immature fruits have low oil yield, that they are rich in unsaturated acids, sterols, tocopherols and unsaponifiable fractions. The immature fruits' oils, which collected very early, are marked with a significant proportion of linolenic acid. The antioxidant activity of immature fruit oils was the most important. On the other hand, the unsaponifiable fraction of oils obtained from mature fruits endowed by the highest antioxidant power in comparison with oils from immature fruits. The phenolic contents as well as the antioxidant activity are substantially marked in both defatted parts and in the immature fruits' oils. The obtained antioxidant activity of immature fruit oils was mainly due to phenolic compounds. On the other hand, the unsaponifiable fraction, taken from oils of mature fruits, would have the predominant role in antioxidant activity. At last, the environmental factors especially those related to altitude have remarkable effect on particularly the phenolic contents and the antioxidant activity in the fruits.

Key words: *Pistacia atlantica*; Fruit; Maturity; Oil; Fatty acid; Tocopherol; defatted fruits; Polyphenols; Antioxidant activity; Environmental factors.

ملخص

يتواجد شجر الفستق الأطلسي بكثرة في المناطق الجافة وشبه الجافة، يمثل مصدرا غنيا بالجزئيئات ذات الفعالية البيولوجية. يهتم هذا العمل بدراسة تأثير درجة النضج والعوامل البيئية على المحتوى من الليبيدات والمركبات الفينولية وكذا الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المركبات من ثمار شجرة الفستق الأطلسي. بينت النتائج أن مردود الثمار غير الناضجة من الزيت قليل، وإنها غنية بالأحماض الدهنية غير المشبعة والستيرولات، التوكوفيرولات والمواد غير قابلة للتصين. تتميز زيوت الثمار غير الناضجة والمقتطفة مبكرا على نسبة غير مهملة من حمض اللينولنيك وعلى أكبر فاعلية مضادة للأكسدة في حين تميزت المواد غير قابلة للتصين لزيوت الثمار الناضجة على الفعالية المضادة للأكسدة الأعلى بالنسبة لزيوت الثمار غير الناضجة. أكبر الكميات من المركبات الفينولية واهم الفعاليات المضادة للأكسدة كانت في زيوت وكسب الثمار الناضجة. تعود الفعالية المضادة للأكسدة في زيوت الثمار غير الناضجة إلى احتوائها على مركبات فنولية. أما بالنسبة لزيوت الثمار الناضجة تعود ارتفاع الفعالية المضادة للأكسدة للجزء غير المتصين. في الأخير تكون للعوامل البيئية وخاصة التي لها علاقة بالارتفاع الأثر الواضح على المحتوى من المركبات الفينولية وكذا الفعالية المضادة للأكسدة في الثمار.

الكلمات المفتاحية: الفستق الأطلسي (*Pistacia atlantica*)، الثمار، النضج، الزيت، أحماض دهنية، توكوفيرولات، كسب، مركبات فنولية، النشاط المضاد للأكسدة، العوامل البيئية.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PARTIE 1 : PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PISTACHIER DE L'ATLAS

I.1 Etymologie.....	3
I.2 Historique	3
I.3 Systématique de l'espèce pistachier de l'Atlas (<i>Pistacia atlantica</i>).....	3
I.4 Aire de distribution du Pistachier de l'Atlas	4
I.4.1 A travers le monde	4
I.4.2 En Algérie	4
I.5 Intérêt du pistachier de l'Atlas.....	6
I.5.1 Valeur médicinale	6
I.5.2 Valeur nutritionnelle	6
I.5.3 Valeur agro-écologique.....	7
I.5.4 Valeur fourragère	7
I.6 Facteurs ayant contribué à la dégradation du pistachier de l'Atlas	7

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES CORPS GRAS

II.1 Définition et origine	8
II.2 Classification des corps gras	8
II.3 Propriétés des corps gras	9
II.3 Propriétés physiques	9
II.3.1.1 Etat naturel et aspect	9
II.3.1.2 Densité.....	9
II.3.1.3 Le point de fusion et le point de solidification.....	9
II.3.1.4 Solubilité	9
II.3.1.5 La viscosité.....	10
II.3.2 Propriétés chimiques.....	10
II.3.2.1 Hydrolyse et saponification.....	10
II.3.2.2 Hydrogénation.....	10
II.3.2.3 Transestérification.....	10
II.4 Composition des corps gras.....	10
II.4.1 Les triglycérides	11
II.4.1.1 Rôles des triglycérides dans l'organisme.....	11
II.4.2 Les Acides gras.....	11
II.4.2.1 Définition	Erreur ! Signet non défini.
II.4.2.2 Principaux constituants	11
II.4.2.2.1 Les acides gras saturés	12
II.4.2.2.2 Les acides gras insaturés	13
II.4.2.3 Besoins et apports recommandés en acides gras.....	15
II.4.3 Les constituants mineurs	15
II.4.3.1 L'insaponifiable	15
II.4.3.1.1 Les tocophérols	16
II.4.3.1.2 Les stérols.....	19
II.4.3.1.3 Les caroténoïdes	21
II.4.3.1.4 Les chlorophylles	24

II.4.3.1.5 Les hydrocarbures	24
II.4.3.1.6 Les alcools Triterpeniques	24
II.4.3.2 Les phospholipides	25
II.4.3.2.1 Rôles des phospholipides	25
II.4.3.3 Les cires	26
CHAPITRE III : GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS	
III.1 Présentation général sur les polyphénols	27
III.2 La biosynthèse des polyphénols.....	28
III.3 Principales classes des polyphénols.....	31
III.3.1 Les acides phénoliques simples.....	31
III.3.2 Les flavonoïdes	32
III.3.2.1 Généralités	32
III.3.2.2 Structure.....	33
III.3.2.3 Classification	34
III.4 Intérêts des polyphénols.....	35
III.4.1 Vis-à-vis des plantes.....	35
III.4.2 Vis-à-vis de l'homme.....	35
CHAPITRE IV : OXYDANTS, STRESS OXYDATIF ET ANTIOXYDANTS	
IV.1 Stress oxydatif	37
IV .1.1 Définition	37
IV.1.2 Origine du stress oxydatif	37
IV.1.3 Les radicaux libres	38
IV.1.3.1 Définition.....	38
IV.1.3.2 Les différents types des ROS.....	39
IV.1.4 Sources de production des radicaux libres	40
IV.1.5 Système de défense antioxydante	40
IV.1.5.1 Système antioxydants enzymatique.....	41
IV.1.5.2 Système antioxydants non enzymatique.....	42
IV.1.6 Conséquences biochimiques du stress oxydant	42
IV.1.6.1 Peroxydation des lipides	42
IV.1.6.2 Peroxydation des protéines	43
IV.1.6.3 L'oxydation de l'ADN.....	43
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	
CHAPITRE V : COLLECTE DES FRUITS DU PISTACHIER DE L'ATLAS 2015,2016	
V.1 Matériel	44
V.1.1 Matériel biologique	44
V.1.1.1 La récolte des échantillons.....	44
V.1.2 Produits chimiques	48
V.1.3 Matériel et équipements	48
V.2 Méthodes	48
V.2.1 Tri et essai de classification des fruits.....	49
V.2.2 Extraction par solvant (Soxhlet).....	49
V.2.2.1 Détermination de la teneur en huile	49
V.2.3 Analyse des acides gras	49

V.2.4 Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles	50
V.2.4.1 Dosage des stérols totaux.....	50
V.2.4.2 Dosage des tocophérols totaux	51
V.2.4.3 Analyse des tocophérols par CLHP	52
V.2.4.4 Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits des fruits de Pistachier de l'Atlas	52
V.2.4.4.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH•.....	52
V.2.5 Extraction, analyse et activité antioxydante de la fraction insaponifiable	53
V.2.5.1 Extraction et analyse de la fraction insaponifiable	53
V.2.5.2 Analyse quantitative des Fractions insaponifiables	54
V.2.6 Traitement des tourteaux	55
V.2.6.1 Extraction et analyse quantitative	55
V.2.6.2 Extraction des polyphénols	55
V.2.6.3 Analyse quantitative des polyphénols.....	55
V.2.6.3.1 Dosage des phénols totaux	56
V.2.6.3.2 Dosage des flavonoïdes.....	56
V.2.6.3.3 Evaluation de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH°	56
V.2.7 Analyse et activité antioxydante des mélanges des huiles et de leurs extraits phénoliques des huiles.....	57
V.2.7.1 Analyse et activité antioxydante des mélanges des huiles.....	57
V.2.7.1.1 Dosage des tocophérols totaux.....	57
V.2.7.1.2 Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles par le test DPPH	58
V.2.7.2 Analyse et activité antioxydante des extraits phénoliques des mélanges des huiles.....	58
V.2.7.2.1 Extraction des composés phénolique à partir des huiles.....	58
V.2.7.2.2 Analyse quantitative.....	59
V.3 Analyse statistique des données	59
V.4 Matériel	60
V.4.1 Matériel biologique	60
V.4.1.1 La récolte des échantillons.....	60
V.4.2 Produits chimiques	64
V.4.3 Matériel et équipements	64
V.5 Méthodes.....	64

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VI : COLLECTE DES FRUITS DU PISTACHIER DE L'ATLAS 2015,2016

VI.1 Teneur en huiles des fruits	65
VI.2 Détermination de la composition en acides gras des huiles par CPG.....	69
VI.3 Teneur des stérols totaux dans des huiles	71
VI.4 Teneur des tocophérols totaux dans des huiles	72
VI.5 Analyse des tocophérols des huiles par CLHP.....	74
VI.6 L'évaluation du pouvoir antioxydant des huiles des fruits des <i>Pistacia atlantica</i> ...	76
VI.6.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH	76
VI.6.2 Relation entre la teneur en tocophérols des huiles et le pouvoir anti-oxydant .	77

VI.7 Analyse de données concernant les paramètres étudiés	78
VI.8 Analyse quantitative des fractions insaponifiables	82
VI.8.1 Taux de la fraction insaponifiable des huiles	82
VI.8.2 Teneur des stérols et tocophérols totaux dans les insaponifiables	83
VI.8.3 Evaluation du pouvoir antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de <i>Pistacia atlantica</i> par le test DPPH.....	84
VI.9 Extraction, analyse et évaluation du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques des tourteaux et des huiles et de mélanges des huiles.....	88
VI.9.1 Extraction, analyse et activité antioxydante des composés phénoliques des tourteaux.....	88
VI.9.2 Extraction, analyse et activité antioxydante des extraits phénoliques des mélanges des huiles.....	91
VI.9.2.1 Extraction des polyphénols et analyse quantitative à partir des mélanges des huiles.....	91
VI.9.3 Résultat d'évaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts des tourteaux contre le radical libre DPPH°	94
VI.9.4 Analyse quantitative et évaluation du pouvoir antioxydant des composés des mélanges des huiles par test de piégeage du radical libre DPPH°.....	96
VI.10 Synthèse des résultats	100
CHAPITRE VII : COLLECTE DES FRUITS DU PISTACHIER DE L'ATLAS 2016	
VII.1 Teneur en huiles des fruits.....	102
VII.2 Détermination de la composition en acides gras des huiles par CPG	107
VII.3 Teneurs en stérols totaux des huiles	109
VII.4 Teneur des tocophérols totaux des huiles.....	110
VII.5 Analyse des tocophérols des huiles par CLHP.....	110
VII.6 L'évaluation du pouvoir antioxydant des huiles des fruits des <i>Pistacia atlantica</i>	111
VII.6.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH.....	111
VII.6.2 Relation entre la teneur en tocophérols et le pouvoir anti-radicalaire	112
VII.7 Analyse de données concernant les paramètres étudiés	113
VII.8 Analyse quantitative des fractions insaponifiables	116
VII.8.1 Taux de la fraction insaponifiable des huiles	116
VII.8.2 Teneur des stérols et tocophérols totaux dans les insaponifiables.....	116
VII.8.3 Evaluation du pouvoir antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de <i>Pistacia atlantica</i> par le test DPPH.....	118
VII.9 Etude des composés phénoliques au niveau des tourteaux et au niveau des mélanges huiles correspondantes	122
VII.9.1 Extraction des polyphénols et analyse quantitative (dosage des phénols totaux, Flavonoïdes) à partir des tourteaux	122
VII.9.2 Extraction des polyphénols et analyse quantitative (dosage des Phénols totaux, Flavonoïdes) à partir des huiles.....	125
VII.9.3 Activités antioxydants au niveau des extraits phénoliques des tourteaux et au niveau des huiles	127
VII.9.3.1 Résultat d'évaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts des tourteaux contre le radical libre DPPH°	127

VII.9.3.2 Analyse quantitative et évaluation du pouvoir antioxydant des composés des mélanges des huiles par test de piégeage du radical libre DPPH°	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133
ANNEXE.....	135
PUBLICATION.....	136

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales classes des huiles et graisses alimentaires (Karleskind,1992).....	8
Tableau 2: Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).	31
Tableau 3: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).	32
Tableau 4: Principaux types de coumarines (Macheix <i>et al</i> , 2005 ;2006).	32
Tableau 5: Principales classes des flavonoïdes (Narayana <i>et al</i> , 2001; W- Erdman <i>et al</i> , 2007).	34
Tableau 6: Composés phénoliques et leurs propriétés.	36
Tableau 7: Les principaux radicaux libres (Haton, 2005).	39
Tableau 8: Description des échantillons 2015.	45
Tableau 9: Compositions des mélanges des huiles.	57
Tableau 10: Description des échantillons 2016.	60
Tableau 11: Les rendements, les couleurs d'huile et les couleurs des fruits correspondants des échantillons (collecte 2015).	66
Tableau 12: Composition en acides gras des huiles brutes des fruits étudiés 2015.	70
Tableau 13: Teneur en stérols totaux dans les huiles de <i>Pistacia atlantica</i> 2015.	71
Tableau 14: Teneur en tocophérols totaux dans les huiles de <i>Pistacia atlantica</i> 2015.	73
Tableau 15: Pourcentage des isomères α et γ tocophérols (%) dans les huiles des fruits de <i>P. atlantica</i> 2015.	75
Tableau 16: Les valeurs de l'EC50 calculé pour les différents extraits lipidiques des fruits de 2015 de maturité différente lors de test DPPH.	76
Tableau 17: Matrice de corrélation de Pearson de 2015.	78
Tableau 18: Teneurs en stérols et en tocophérols totaux dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de <i>Pistacia atlantica</i> 2015.	83
Tableau 19: Pourcentages des stérols et tocophérols dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de <i>Pistacia atlantica</i> 2015.	84
Tableau 20: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les 22 échantillons d'extraits phénoliques des tourteaux.	89
Tableau 21: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les mélanges huileux.	92
Tableau 22: Comparaison entre les teneurs phénoliques de mélanges des huiles et les moyennes en teneurs phénoliques des extraits phénoliques des tourteaux de fruits de chaque mélange d'huile.	93
Tableau 23: Activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux bruts exprimés par EC50.	94
Tableau 24: Corrélation entre les teneurs phénoliques dans les extraits des tourteaux obtenus des fruits de chaque arbre (tous stades de maturation confondus) et l'EC50.	96
Tableau 25: Teneurs en tocophérols totaux et activités antioxydants des mélanges des huiles (exprimée par EC50) avant et après extraction des polyphénols.	97
Tableau 26: Activité antioxydante (exprimé par EC50) des extraits phénoliques des mélanges des huiles.	99
Tableau 27: Les rendements, les couleurs d'huile et les couleurs des fruits correspondants des échantillons des fruits de pistachier de l'Atlas (collecte 2016).	104
Tableau 28: Composition en acides gras des huiles brutes des fruits étudiés 2016.	108
Tableau 29: Teneur en stérols totaux dans les huiles de <i>Pistacia atlantica</i> 2016.	109
Tableau 30: Teneur en tocophérol total dans les huiles de <i>Pistacia atlantica</i> 2016.	110
Tableau 31: Pourcentage des isomères α et γ tocophérols (%) dans les huiles des fruits de <i>P. atlantica</i> 2016.	111
Tableau 32 : Les valeurs de l'EC50 calculé pour les différents extraits lipidiques des fruits de 2016 de maturité différente lors de test DPPH.	112
Tableau 33 : Matrice de corrélation de Pearson de 2016.	113
Tableau 34: Teneurs en stérols et en tocophérols totaux dans la fraction insaponifiable d'huile des fruits de <i>Pistacia atlantica</i> 2016.	117
Tableau 35: Pourcentages des stérols et tocophérols dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de <i>Pistacia atlantica</i> 2016.	118
Tableau 36: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les 21 échantillons d'extrait phénoliques des tourteaux.	123
Tableau 37: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les mélanges huileux.	126
Tableau 38 : Comparaison entre les teneurs phénoliques de mélanges des huiles et les moyennes en teneurs phénoliques des extraits phénoliques des tourteaux de fruits de chaque mélange d'huile.	126

Tableau 39: Activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux brutes exprimé par EC50.	128
Tableau 40: Teneurs en tocophérols totaux et activités antioxydants des huiles (exprimée par EC50) avant et après extraction des polyphénols.	129
Tableau 41: Activité antioxydante (exprimé par EC50) des extraits phénoliques des huiles.	129

Liste des figures

Figure 1: Aire naturelle de <i>Pistacia atlantica</i> (AL-Saghir, 2006).....	4
Figure 2: Distribution de <i>Pistacia atlantica</i> en Algérie (Monjauze, 1968).....	5
Figure 3: <i>Pistacia atlantica</i> est associé avec <i>Ziziphus lotus</i> (photo originale, 2016)	5
Figure 4: Configuration des acides gras saturés et des trois différentes séries d'acides gras insaturés.	12
Figure 5 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés des séries oméga-3 (n-3) et oméga-6 (n-6) (Solinas,1992).	14
Figure 6 : Structure des tocophérols (Soulier <i>et al.</i> , 1992).....	16
Figure 7 : Représentation schématique du lycopène, caroténoïde linéaire. Par cyclisation des extrémités, on obtient la structure du b-carotène.....	22
Figure 8 : Représentation des cycles terminaux qui diffèrent par la position de leur double liaison. Ils sont obtenus par cyclisation du lycopène.	22
Figure 9 : Structure des phospholipides (Stryer <i>et al.</i> , 2003).....	25
Figure 10 : Structure du Palmitate de cétyle (Weil <i>et al.</i> , 2001).....	26
Figure 11 : Structure du noyau phénol.	27
Figure 12 : La voie de Shikimate (Floss, 1997).	28
Figure 13 : La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann <i>et al.</i> , 2004).....	29
Figure 14 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel–Shirley, 2001; Subamanian <i>et al.</i> , 2007).	30
Figure 15: La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).	38
Figure 16 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	38
Figure 17 : Sources de production des radicaux libres.....	40
Figure 18: Réseau des antioxydants (Kohen et Nyska, 2002).....	41
Figure 19: Diagramme représentant les grandes lignes de notre étude.	48
Figure 20: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004).....	52
Figure 21: Schéma d'extraction des fractions insaponifiables.	54
Figure 22: Schéma représentant les étapes d'extraction des polyphénols à partir des huiles.....	59
Figure 23 : Variation du rendement d'extraction des huiles à partir des fruits du <i>Pistacia atlantica</i> selon la couleur de l'enveloppe externe du fruit.	65
Figure 24: Graphe représentant l'activité antioxydant des huiles de l'arbre 2 récolté en juillet 2015, par le test du DPPH.	77
Figure 25: Régression linéaire de la corrélation entre le taux de tocophérols et l'EC50 des extraits huileux.....	78
Figure 26: Représentation graphique de la distribution des échantillons en fonction des 4 variables différente.	80
Figure 27: Taux de la fraction insaponifiable des huiles de fruits de <i>Pistacia atlantica</i>	82
Figure 28: Graphe représentant l'activité antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 1D (même collecte).....	85
Figure 29: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 2D (même collecte).	85
Figure 30: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 3RN de même couleur issus de deux collectes différentes.....	85
Figure 31: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 4V (même collecte).	86
Figure 32: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 5G (même collecte).....	86
Figure 33: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 7RN (même collecte).....	86
Figure 34: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 8G (même collecte).	87
Figure 35: EC50 calculée pour les différentes fractions insaponifiables des huiles de fruits de maturité différente.	87
Figure 36: Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons d'extraits phénoliques des tourteaux.	90

Figure 37: Régression entre l'activité antioxydante (formuler par EC50) et les teneurs en phénols totaux des extraits phénoliques bruts au niveau les tourteaux.....	96
Figure 38: Activité antioxydante de mélange 1 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.....	98
Figure 39: Activité antioxydante de mélange 2 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.....	98
Figure 40: Activité antioxydante de mélange 3 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.....	98
Figure 41: Régression entre l'activité antioxydante (formuler par EC50) des trois mélanges huileux et les teneurs en tocophérols avant l'extraction des composés phénoliques.	100
Figure 42: Régression entre l'activité antioxydante (formuler par EC50) des trois mélanges huileux et les teneurs en tocophérols après l'extraction des composés phénoliques.	100
Figure 43: Variation du rendement d'extraction des huiles à partir des fruits du <i>Pistacia atlantica</i> en fonction de leur stade de maturité.	103
Figure 44: Régression linéaire de la corrélation entre le taux de tocophérols et l'EC50 des extraits huileux.....	113
Figure 45: Représentation graphique de la distribution des échantillons en fonction des 4 variables différentes.....	115
Figure 46: Taux de la fraction insaponifiable des huiles de fruits de <i>Pistacia atlantica</i>	116
Figure 47: Graphe représentant l'activité antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre A de l'ElGhaicha (deux collectes).	119
Figure 48: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre B de l'Elghaicha (deux collectes).....	119
Figure 49: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre C de l'Elghaicha (deux collecte).	119
Figure 50: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre A de Hassi Delaà 4de différents couleurs issus de quatre collectes différentes.	120
Figure 51: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre B de Hassi Delaà de différents couleurs issus de quatre collectes différentes.....	120
Figure 52: EC50 calculée pour les différentes fractions insaponifiables des huiles de fruits de maturité différente.	121
Figure 53: Régression linéaire entre le taux de tocophérols et l'EC50 des différentes fractions insaponifiables.....	121
Figure 54: Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les extraits des composés phénoliques des tourteaux.	125

Liste des abréviations

- AA** : Acide ascorbique.
- Abs** : Absorbance.
- ACP** : Analyse des Composantes Principales.
- AG** : Acide gras.
- AGMI** : Acide gras mono insaturé.
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé.
- AGS** : Acide gras saturé.
- B** : Bou Hanifia.
- C** : Concentration.
- C°** : Degré Celsius.
- C14 :0** : Acide myristique.
- C16 :0** : Acide palmitique.
- C16 :1** : Acide palmitoléique.
- C18 :0** : Acide stéarique.
- C18 :1** : Acide oléique.
- C18 :2** : Acide linoléique.
- C18 :3** : Acide linoléique.
- CAT** : Catalase.
- Chol** : Cholestérol.
- CHS** : Chalcone synthétase.
- CLHP** : Chromatographie Liquide Haut Performance.
- CoA** : Acétyl Coenzyme A.
- CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.
- Cu** : Cuivre.
- DPPH** : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl.
- DPPH.** : diphényl-2-picrylhydrazyl.
- EAG** : Equivalent d'acide gallique.
- EC50** : Efficient Concentration (Concentration inhibitrice 50%).
- EMAG** : Estr Méthylique d'Acide Gras.
- EOA** : Espèces oxygénées activées.
- ERA** : Espèce réactive d'azote.
- ERO** : Espèce réactive d'oxygène.

Fe : Fer.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

FID : Détecteur à ionisation de flamme.

Flav : Flavonoïdes.

FLD : Détecteur à fluorescence (Fluorescence Detecteur).

g : gramme.

GPH : Glutation réduit.

GPX : Glutation peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GSH-Px : Glutathion peroxydase.

GSSG : Glutathion oxydé.

GST : Glutathion transférase.

h : heure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄: acide sulfurique.

HCl : acide chlorhydrique.

HO*: Radical Hydroxyl.

HPLC : Chromatographie liquide à haut performance.

MDA: Malondialdéhyde.

Mél : Mélange.

MeOH : Méthanol.

mg : milligramme.

min : minute.

ml : millilitre.

Mn⁺ : Métal de transition.

MS : Matière sèche.

N: normalité.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite.

nm : nanomètre.

O₂ : oxygène.

O₂· : Oxygène singulet.

O₂⁻ :Superoxyde.

OH[•] :Hydroxyle.

ONOO[•] :Peroxynitrite.

PAL : Phénylalanine-ammoniaque-lyase.

Pht : Phénols totaux.

PK : Point kilométrique.

P_{m.a} : Précipitations moyennes annuelles (mm)

PRxs : Peroxiredoxins.

R2 : Coefficient de détermination.

RL : Radicaux libres.

RN (40) : 40 kilomètres de sud de Laghouat.

ROS: Dérivés réactifs de l'oxygène.

SOD: Superoxyde dismutase.

SUBsp: Sous espèce.

TAG: Triacylglycérols.

TG: Triglycéride.

T_{max,m,a} :Température maximale moyenne annuelle

T_{min,m,a} :Température minimale moyenne annuelle

Toc: Tocophérols.

Tr: Trace

UV : Ultraviolet.

V : Volume.

VIH : Virus de l'Immunodéficiencce Humaine.

Vit E : vitamine.

ω 3 : Oméga 3.

ω 6 : Oméga 6.

Introduction

Introduction

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouvelles molécules. Elles sont considérées comme source pour la découverte de substances actives et nécessaires à la mise au point de futures utilisations.

L'Algérie compte parmi les pays d'Afrique qui recèle une flore très diversifiée. En effet, selon **Quezel et Santa (1963)**, la flore algérienne est composée environ 3139 espèces différentes.

Une des espèces végétales les plus importantes dans l'Algérie est Bétoum ou le Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*). Elle est très répandue notamment dans les régions semi-arides et arides (**Belhadj, 2001,2003**). L'arbre a un intérêt économique et écologique exceptionnel. Il est connu par ses diverses utilisations (**Faouzi, 2015**).

Différents organes de cet arbre, notamment les fruits, les feuilles, les galles et la résine, ont été utilisées en médecine populaire (**Bozorgi et al., 2013**). Et ont été étudiées en vue de mettre en évidence des activités pharmacologiques des extraits ou des molécules purifiées (**Yousfi et al., 2002; Gourine et al., 2010, 2011; Sifi et al., 2015; Tzakou et al., 2007; Mecherara-Idjeri et al., 2008a ,2008b; Guenane et al., 2015; Barrero et al., 2005; Delazar et al., 2003; Benhassaini et al., 2008; Fetati et Lassouani.,2018**).

Ses fruits sont riches en huile qui est utilisée dans des domaines variés (alimentaire, cosmétique et pharmaceutique) (**Manjouze, 1980; Belhadj, 2001**). Il a été rapporté que le degré de maturation des fruits de *Pistacia lentiscus* avait un effet sur la composition et l'activité des extraits lipidiques (**Charef et al., 2008; Trabelsi et al., 2012**). Par ailleurs Beltran avait indiqué que les variations d'une saison à une autre et la date de récolte affectaient la composition en acides gras de l'huile d'olive (**Beltran et al., 2004**).

En ce qui concerne le *Pistacia atlantica*, Guenane a rapporté pour la première fois que les fruits immatures sont caractérisés par une richesse en acides gras insaturés, en composés phénoliques avec une activité antioxydante importante aussi bien pour les extraits lipidiques que phénoliques (**Guenane et al., 2015, 2017**). Il a également montré que les huiles de ces fruits contenaient une fraction insaponifiable assez élevée (9%). Il est maintenant admis que la fraction insaponifiable des huiles végétales est désormais valorisée en raison de ses effets antioxydants et anti-inflammatoires (**De la Puerta et al., 2000; Perona et al., 2004; Govindan et Rajamohan, 2009; Cardeno et al., 2014**).

Sur la base de qui a été exposé, il nous a paru intéressant, d'une part, de confirmer les résultats obtenus par Guenane (**Guenane, 2017**) et d'autre part de mettre en relief l'effet des facteurs environnementaux sur la composition et l'activité antioxydante des extraits de fruits et la valorisation phytochimique de la fraction insaponifiable.

Répondre à cette problématique permettrait de déterminer le moment optimal de collecte des fruits riches en molécules bioactives telles que les acides gras les composés de la fraction insaponifiable et les composés phénoliques. De la même manière il nous serait possible de découvrir les sites où poussent les arbres avec des fruits contenant des molécules à activités biologiques.

La thèse contient trois parties. Une partie bibliographique relative à la description de la plante étudiée, généralités sur les huiles et les composés phénoliques et les antioxydants. Dans la deuxième partie nous présentons les différentes méthodes d'étude et les matériels utilisés. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats et leur discussion. Cette partie est enrichie par l'analyse statistique en utilisant le logiciel XLSTAT et des comparaisons avec des études antérieures dans le sujet.

Partie 1 :

Présentation

bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le pistachier de l'Atlas

I.1 Etymologie

Le mot pistache est apparu dans la langue française au XIII^{ème} siècle et vient de l'italien pistachio, emprunté par l'intermédiaire du latin Pistacium au grec Pistakion, formé lui-même d'après l'ancien nom Persan pistak qui est la nomination originelle du fruit et qui est proche du nom foustok utilisé chez les arabes (**Brosse, 2000**).

En Algérie, le pistachier prend le nom de "El Botma" en Arabe et "Iggh" et « Tissemlal » en Tamazight. Les fruits sont appelés Elkhodiri par les populations locales, appellation due à la prédominance de la couleur verte foncée à maturité.

I.2 Historique

On croit que Pistacia est né dans l'Asie Centrale il y a 80 millions d'années (**AL-Saghir, 2010**). Il a été introduit en Europe dès le début de l'ère chrétienne et en Amérique en 1890 où le premier essai a été effectué au niveau de la station pilote de Californie en 1904(**Debbache, 1998**).

Dans certaines régions d'Algérie, le pistachier de l'Atlas est considéré comme un arbre noble est sacré car la tradition voudrait que le Prophète se soit reposé sous son ombre lors de son voyage d'été de la péninsule arabique vers le Cham, dans ce qui est connu chez les arabes anciens « Rihlatou echita oua essaif ». Le Cham englobe la Syrie, la Palestine et la Jordanie qui sont l'un des terroirs du pistachier de l'Atlas.

I.3 Systématique de l'espèce pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*)

Le pistachier de l'Atlas n'est distingué que depuis 1799 par Desfontaines (**Monjauze, 1980**) comme suit :

- **Division** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous-classe** : core eudicots
- **Superordre** : Rosids
- **Sous-ordre** : Eurosids II
- **Ordre** : Sapindales Dumort
- **Famille** : Anacardiaceae
- **Sous-famille** : Anacardioideae

- Genre : Pistacia
- Espèce : *Pistacia atlantica* Desf
- Subsp : atlantic

I.4 Aire de distribution du Pistachier de l'Atlas

I.4.1 A travers le monde

Pistacia atlantica est largement éparpillé au sud de la Méditerranée et au Moyen Orient, il est répandu depuis les îles Canaries (Gomera, Ténériffe) jusqu'au Pamir (Figure 1) en passant par :

- L'Afrique du nord, le Sahara septentrional et Tripolitaine.
- Chypre, Chio, Rhodes, la Grèce, La Turquie, La Bulgarie, La Crimée, le Caucase, La Transcaucasie et l'Arménie.
- La Palestine, La Syrie, La Transjordanie, L'Iraq et L'Iran.
- L'Arabie Saoudite, Le Béloutchistan, et L'Afghanistan.

Le type de l'espèce (selon Zohary) est d'habitat occidental (Zohary, 1952, 1996). On le rencontre depuis les Atlantide jusqu'à la Syrie en passant par les trois pays d'Afrique du Nord (Monjauze, 1968).

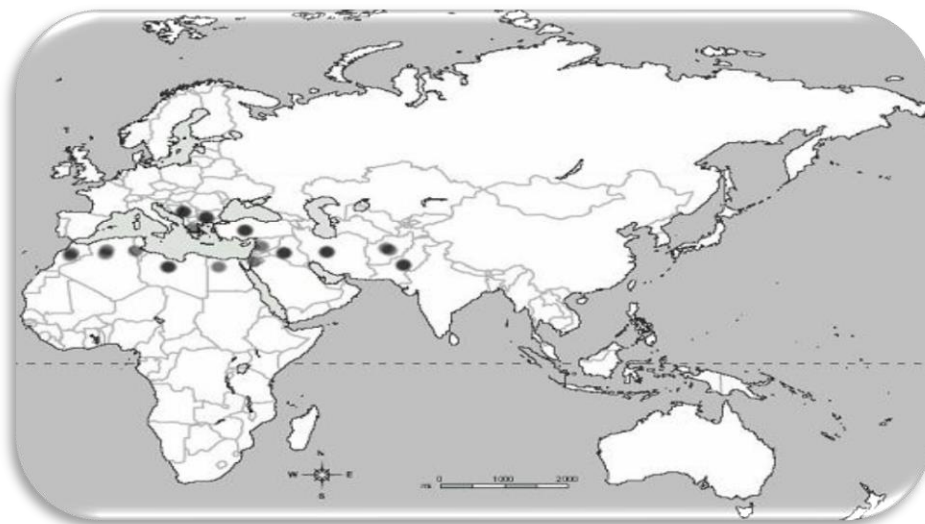


Figure 1: Aire naturelle de *Pistacia atlantica* (AL-Saghir, 2006).

I.4.2 En Algérie

C'est un arbre endémique qui figure parmi les plantes protégées en Algérie (Kaabeche *et al.*, 2005). D'après Boudy (1952), en Algérie on le trouve (Figure 2), c'est le plus

caractéristique de la région semi-aride et Présaharienne. Le Pistachier de l'Atlas est l'une des rares espèces arborescentes encore présentes dans les régions arides, semi-arides et même sahariennes.

Sa limite extrême se trouve en plein coeur du Hoggar ou il existe à l'état de relique (**Manjauze, 1980**). En Algérie il est recensé depuis la plaine de Mitidja jusqu'à la région Saharienne il est présent au nord-est de Tlemcen à Sidi bel Abbes à Saida, Naâma, El Bayadh, Tiaret et Médéa, à Mascara et Biskra, à Bechar, Laghouat et Ghardaïa, à Djelfa et M'sila, Khenchela et Tébessa.

Le Pistachier de l'Atlas peuplait jadis la région entre Laghouat et Biskra et une partie des hauts plateaux et toute la zone qui se trouve entre l'Atlas tellien et l'Atlas Saharien et il occupait même une partie du versant sud de l'Atlas saharien.

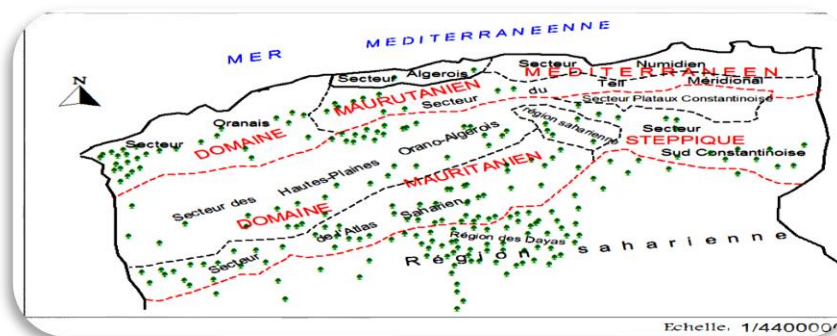


Figure 2: Distribution de *Pistacia atlantica* en Algérie (**Monjauze, 1968**).

En général, *Pistacia atlantica* est trouvée en association avec *Ziziphus lotus* : (cedra en arab local) qui protège ces nouveaux plants contre les animaux et les vents violents (**Belhadj, 2001**) (Figure 3).



Figure 3: *Pistacia atlantica* est associé avec *Ziziphus lotus* (photo originale, 2016)

I.5 Intérêt du pistachier de l'Atlas

D'après plusieurs auteurs, le rôle du pistachier est multiple (Khaldi et Khouja, 1996 ; Belhad, 1999 ; Benhassaini, 2007 ; Lahsissene *et al.*, 2009 ; Yousfi *et al.*, 2002, 2003, 2005 ; Benabderrahmane *et al.*, 2009 ; Maamri, 2008 ; Monjauze, 1968 et Bozorgi *et al.*, 2013).

I.5.1 Valeur médicinale

Les lipides extraits des graines du Pistacia sont des triglycérides riches en acides gras insaturés et en phytostérols qui confèrent aux huiles du pistachier des aptitudes hypocholestérolémiantes qui concurrencent les huiles de soja, de maïs et de tournesol. Les drupes de pistachier donnent un rendement en huile de l'ordre de 40%.

Parmi les acides gras insaturés, l'acide oléique et l'acide linoléique ont un rôle important dans la prévention de certains troubles du métabolisme, des maladies cardio-vasculaires et cancéreuses.

Il y a eu plusieurs publications sur les effets antitumoraux des phytostérols, et tout particulièrement du β -sitostérol et des travaux scientifiques ont prouvé que les phytostérols pouvaient réduire le risque de certains types de cancers notamment celui du poumon, du sein, de l'œsophage, de l'estomac, du colon et de l'ovaire.

Il a été prouvé, par ailleurs, que l'huile essentielle et la résine ont des activités antibactériennes et les extraits phénoliques et lipidiques découvrent des activités antileishmaniennes.

En Algérie, le pistachier est utilisé par les populations de la steppe notamment, à titre empirique, pour ses propriétés pharmaceutiques, pour eux et leurs cheptels. L'écorce produit une résine-mastic à usage médical. Les feuilles et l'écorce sont utilisées en décoction, contre les maux de ventre et les douleurs gastriques en inhalation, les feuilles sont employées comme fébrifuge. Les galls sont utilisées en poudre, seules ou associées au souchet rond comme anti diarrhéique et stomachique.

I.5.2 Valeur nutritionnelle

L'huile extraites des graines et les graines elles-mêmes ont un rôle alimentaire parmi les populations vivant à proximité du pistachier de l'Atlas.

L'huile est souvent mélangée aux dattes écrasées et peut être consommée à toute heure de la journée avec du petit lait. Elle a un goût très proche de celui du beurre ce qui la rend très appréciée. En plus de sa richesse en acides gras insaturés et en stérols, elle apporte aussi les vitamines A et E en particulier.

Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes.

I.5.3 Valeur agro-écologique

Il constitue une essence de reboisement dans les stations les plus sévères pour la lutte contre la désertification. Comme il joue le rôle de conservation des sols et il est utilisé aussi pour la fixation des dunes comme brise-vents. Il constitue un porte-greffe par excellence du pistachier vrai, plus résistant à l'asphyxie radiculaire que les autres espèces du genre *Pistacia*. C'est une source d'énergie par utilisation de son bois pour la cuisine et le chauffage dans les régions où les conditions de vie sont particulièrement pauvres. C'est une source d'ombre : les animaux trouvent dans *P. atlantica* un bon refuge de la chaleur et irradiation solaire. L'arbre est souvent le seul arbre dans la région.

I.5.4 Valeur fourragère

De par ses feuilles, *Pistacia atlantica* présente un intérêt pour les éleveurs nomades puisque l'arbre fournit un aliment apprécié par le bétail en période de disette, il procure jusqu'à 0,35 unités fourragères.

I.6 Facteurs ayant contribué à la dégradation du pistachier de l'Atlas

En Algérie, si la régénération du Bétoum avait été protégée depuis longtemps, elle se serait traduite par la constitution de populations plus homogènes, plus nombreuses (**Monjauze, 1980**) et plus productives. Le déclin du pistachier est dû d'abord à des raisons économiques et à des budgets investis très limités dans la production, la régénération et l'entretien des pistacheraies naturelles des dayas.

Parmi les facteurs ayant contribué à la dégradation des pistacheraies on peut citer :

- L'exploitation anarchique des pistachiers comme fourrage et bois de chauffage par les bergers et les populations locales.
- le pâturage empêchant la régénération naturelle et le développement des jeunes pousses.
- le réseau routier qui traverse les dayas de pistachier (ex: la plaine de Oussera "Djelfa") (destruction de certaines d'individus).
- Mauvais état sanitaire des arbres (attaque par le puceron doré provoquant des cloques ou des galles au niveau des feuilles) (**Belhadji, 1999**).

Chapitre II : Généralités sur les corps gras

II.1 Définition et origine

Les corps gras sont des aliments dont le pourcentage en lipides est très élevé. Ils comprennent les huiles et les graisses d'origine végétale ou animales, les beurres et les margarines ; les premières sont composées uniquement de triglycérides et quelques constituants mineurs, tandis que les beurres et les margarines sont des émulsions d'une phase aqueuse dans une phase grasse douées de propriétés plastiques (Uzzan, 1992a, 1992b ; Vierling, 2003).

La distinction entre huile et graisse repose sur le point de fusion. Les huiles sont fluides à la température de 15°C tandis que les graisses sont solides ou concrètes à la même température (Frenot et Vierling, 2001).

En alimentation, on distingue les corps gras visibles et les corps gras invisibles ou cachés. Les corps gras « visibles », sont des matières grasses isolées du tissu adipeux des animaux (saindoux, suifs), des graines oléagineuses (huile d'arachide, de tournesol et de colza), de germe de graines (maïs), de fruits oléagineux (olive, coprah, palme) ou du lait (beurre). Les corps gras « invisibles », font partie intégrante du tissu que l'on consomme : viandes, poissons, fromages, noix (Tremoleires *et al*, 1980 ; Frenot et Vierling, 2001).

II.2 Classification des corps gras

Les huiles et graisses alimentaires sont habituellement subdivisées en ces principales classes alimentaires.

- **Classification selon leur origine**

Tableau 1: Principales classes des huiles et graisses alimentaires (Karleskind,1992).

Huiles végétales fluides	• Huiles d'arachides, de colza ,de germe de maïs , de tournesol, de soja , d'olive , de noix, de pépins de raisin.
Huiles végétales concrètes(ou graisses)	• Coprah (provoquant de la noix de coco) , huiles de palme et de palmiste.
Huiles et graisses d'origine animale terrestre	• Saindoux (graisse de porc), suif (graisse de bœuf et de mouton), huile de cheval, graisse d'oie.
Huiles et graisses marines	• Baleine, cachalot, poissons(sardine, hareng, morue....).
Corps gras élaborés	• Beurres, margarines.

- **Classification selon leur composition en acides gras**

Alais *et al* (2003), classent les corps gras comme suite :

- ✓ **Huiles saturées**
 - Huile de coprah 90% d'acides gras saturés
- ✓ **Huiles riches en acides gras saturés et en acide oléique**
 - Huile d'arachide 19% saturés – 50% oléique
 - Huile d'olive 14% saturés – 75% oléique
- ✓ **Huiles riches en acides gras poly insaturés**
 - Huile de carthame 75% (saturés 10%)
 - Huile de noix 72% (saturés 10%)
 - Huile de pépins de raisin 69% (saturés 13%)
 - Huile de tournesol 66% (saturés 12%)
 - Huile de soja 63% (saturés 13%)
- ✓ **Huiles intermédiaires**
 - Nouvelle huile de colza (saturés 7%, oléique 60%, poly insaturés 29%).

II.3 Propriétés des corps gras

II.3 Propriétés physiques

II.3.1.1 Etat naturel et aspect

On sait que les corps gras sont liquides ou solides à la température ambiante suivant leur composition chimique.

II.3.1.2 Densité

C'est la masse de l'unité de volume exprimée en grammes par à la température T°.

La densité des huiles végétales varie de 0.915 à 0.964.

La densité des corps gras animaux varie de 0.866 à 0.933.

II.3.1.3 Le point de fusion et le point de solidification

Ils permettent d'apprécier le degré de pureté d'un corps gras.

II.3.1.4 Solubilité

Tous les acides gras dont le nombre de carbone est supérieur à 8 sont insolubles dans l'eau, et sont généralement solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme et le benzène (Frenot et Vierling, 2001).

II.3.1.5 La viscosité

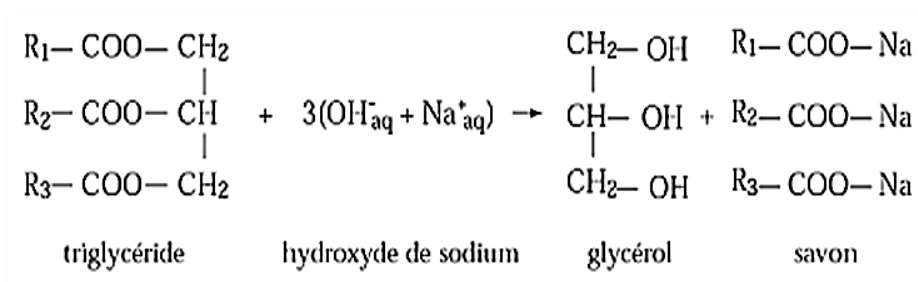
La viscosité des acides gras et des triglycérides est liée à leurs structures à la longueur de la chaîne et à leur saturation. Elle augmente avec le poids moléculaire et diminue avec l'augmentation de l'insaturation. La viscosité des huiles est relativement très élevée. (Alton, 1992).

II.3.2 Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des glycérides dépendent essentiellement de celle des acides gras qui les constituent.

II.3.2.1 Hydrolyse et saponification

L'hydrolyse des triglycérides libère un ou plusieurs AG. La réaction peut se faire par l'acide sulfurique ou par voie enzymatique. La saponification est une hydrolyse alcaline par KOH ou NaOH.



II.3.2.2 Hydrogénation

En présence d'hydrogène et d'un catalyseur (nickel finement divisé), les doubles liaisons des AG insaturés des Triacylglycérols sont saturés. Le point de fusion du produit et les huiles deviennent solides (Chikhi *et al.*, 2006).

II.3.2.3 Transestérification

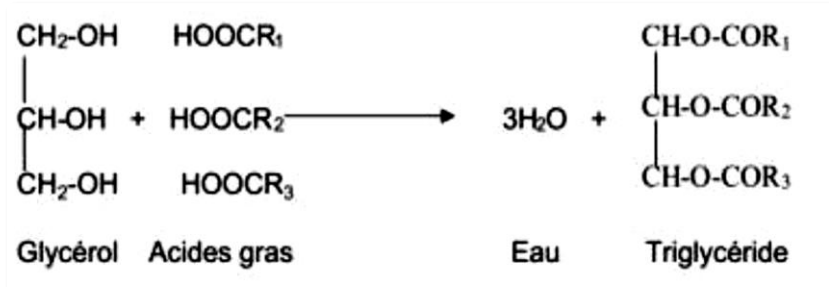
La transestérification vise à modifier la structure glycéridique des matières grasses par réarrangement intra- et intermoléculaire des AG sur le glycérol (Chikhi *et al.*, 2006).

II.4 Composition des corps gras

Les corps gras qu'ils proviennent d'organismes animaux ou végétaux, correspondent à la partie « graisses neutres » de la fraction lipidique totale. Les principaux constituants des corps gras sont :

II.4.1 Les triglycérides

Ces molécules résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol par trois molécules d'acides gras. Si les trois molécules sont identiques, le triglycéride formé est homogène. Les triglycérides hétérogènes contiennent deux ou trois acides gras différents (**Brisson, 1982**).



Les acides gras (R1, R 2 et R3) peuvent être identiques ou différents (**Desagher, 1998**).

II.4.1.1 Rôles des triglycérides dans l'organisme

Un des rôles principaux des triglycérides dans l'organisme est de constituer une réserve d'énergie (dans les tissus adipeux des animaux).

II.4.2 Les Acides gras

II.4.2.1 Définition

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne carbonée, ce sont des constituants des graisses et des lipides membranaires. Ces composés peuvent être saturés, ou insaturés, hydroxylés ou ramifiés (**Weil, 1995**).

La fonction acide carboxylique réagit avec les alcools et les amines pour former des esters et des amides, c'est sous cette forme combinée qu'ils existent dans les aliments (**Frenot et Vierling, 2001**). Les acides gras sont classés selon le nombre d'atome de carbone et d'insaturation présents dans leur structure ce qui leurs confèrent des propriétés différentes.

II.4.2.2 Principaux constituants

On peut classer les acides gras en trois grands groupes qui diffèrent entre eux par la longueur de la chaîne carbonée consécutive et par le type de liaisons (simples ou doubles) entre les atomes de carbone de cette chaîne. Figure 4.

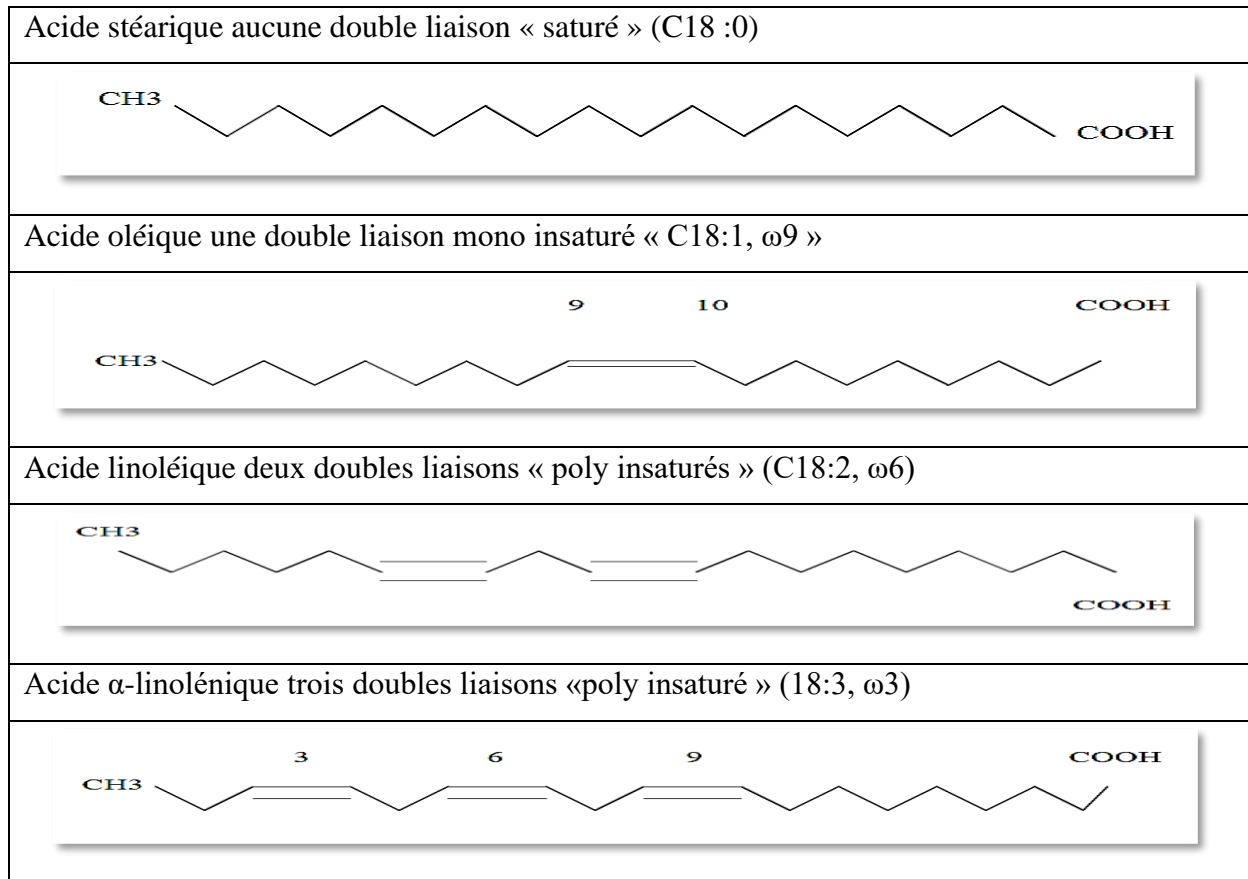


Figure 4: Configuration des acides gras saturés et des trois différentes séries d'acides gras insaturés.

II.4.2.2.1 Les acides gras saturés

Ils ont pour formule générale :

Dans les huiles les acides gras les plus fréquemment rencontrés sont l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). Les acides gras saturés ayant un nombre de carbone supérieur à 10 sont solides et assez stables à la température ambiante (Weil, 1995). La libre rotation autour de chacune des liaisons carbonées rend ces molécules extrêmement flexibles (Siret, 2002).

II.4.2.2.1.1 Rôle et action des acides gras saturés dans l'organisme

Les AGS jouent un rôle physiologique :

- Ce sont les constituants des triglycérides de réserve, des glycérophospholipides et des sphingolipides (structure des membranes, myéline...)
- Ils assurent également une part de l'apport énergétique.

II.4.2.2.2 Les acides gras insaturés

De nombreux acides gras contiennent une ou plusieurs doubles liaisons, ils sont dits insaturés (Siret, 2002). Au niveau d'une double liaison il manque deux atomes d'hydrogène du même côté de la molécule, l'espace ainsi libéré crée un point de faiblesse dans la chaîne qui entraîne une angulation (Karleskind, 1992).

II.4.2.2.2.1 Les acides gras mono insaturés

On parle d'acide gras mono-insaturé (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) lorsqu'il n'y a qu'une seule double liaison. Les acides gras mono-insaturés sont linéaires, avec deux chaînes de n et p CH_2 de part et d'autre de la double liaison $\text{C}=\text{C}$, et une formule chimique de la forme $\text{H}_3\text{C} - (\text{CH}_2)_n - \text{HC}=\text{CH} - (\text{CH}_2)_p - \text{COOH}$ où n et p sont des nombres entiers positifs ou nuls. L'acide oléique (18 :1n-9) est l'un des plus abondants.

II.4.2.2.2.1.1 Effets des acides gras mono insaturés sur l'organisme

- Les acides gras (mono-insaturés) ont une influence sur le taux de cholestérol sanguin. On considère comme des éléments protecteurs des maladies cardio-vasculaires. En effet, ils sont reconnus pour abaisser le mauvais cholestérol (cholestérol LDL) et pour augmenter le bon cholestérol (cholestérol HDL).
- Ils sont une source d'énergie.

II.4.2.2.2.2 Les acides gras polyinsaturés

Ce sont des acides qui contiennent plusieurs insaturations, et qui se distinguent les uns des autres par le nombre et la position de l'insaturation. Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés essentiels, nommés n-3 (ou oméga-3) et n-6 (ou oméga-6) par rapport à la position de la dernière double liaison et à C terminale. Deux acides gras sont à l'origine de ces familles. Il s'agit de l'acide α -linoléique, le précurseur des oméga-3, et l'acide linoléique, qui est le précurseur de la famille des oméga-6 (figure 5).

Ces deux acides gras sont indispensables car ils ne sont pas synthétisables par l'organisme. Seule l'alimentation peut nous les fournir.

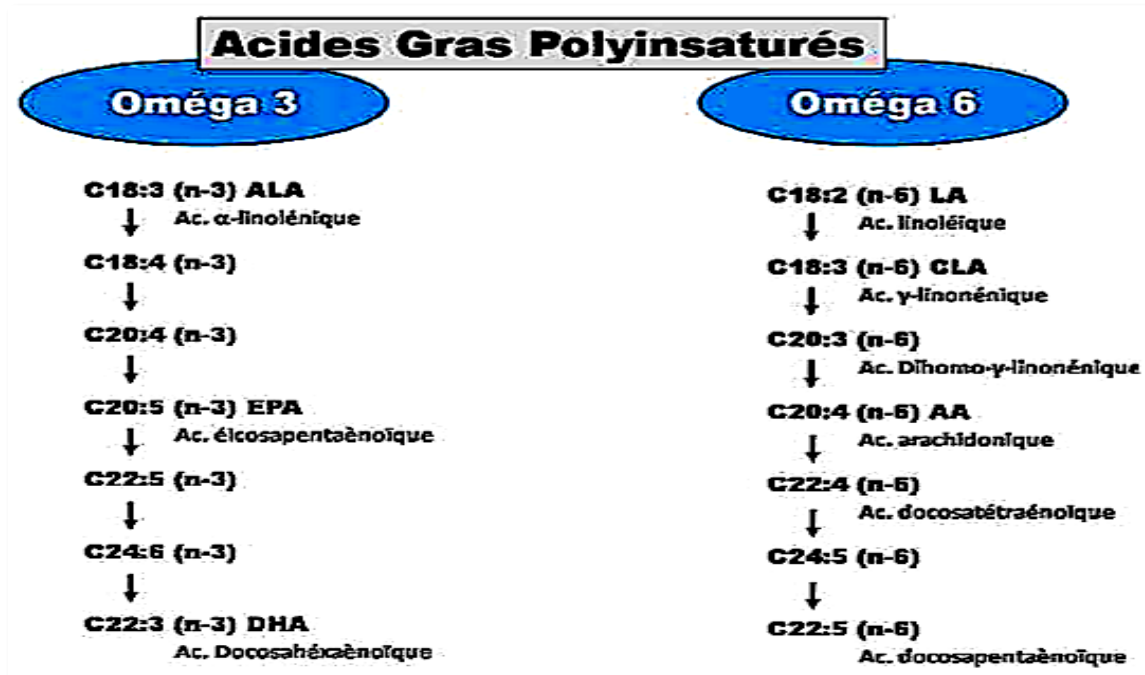


Figure 5 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés des séries oméga-3(n-3) et oméga-6(n-6) (Solinas,1992).

II.4.2.2.2.1 Rôles des acides gras polyinsaturés (Notion d'acides gras essentiels AGE) dans l'organisme

Les acides gras polyinsaturés participent à un grand nombre de fonctions biologiques :

- ✓ Source d'énergie.
- ✓ Constituants fondamentaux des phospholipides des membranes cellulaires.
- ✓ Précurseurs de molécules régulant les fonctions cellulaires telles que.
- ✓ Les prostaglandines et les fonctions reproductrices.
- ✓ Les thromboxanes et les fonctions plaquettaires.
- ✓ Régulation de l'expression de gènes impliqués dans leur propre transport et leur métabolisme.

Les oméga-3 ont de plus des fonctions spécifiques dans le développement et la physiologie de la rétine, du cerveau et du système nerveux. Ils semblent être protecteurs vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires et ils permettraient de diminuer un certain nombre de facteurs de risques liés à ces maladies. Ainsi, l'acide α-linolénique inhiberait l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. L'EPA et le DHA agiraient sur l'agrégation au collagène et diminueraient le taux de triglycérides sanguins. Les AGPI à longue chaîne semblent

également protecteurs vis-à-vis de différents cancers. Ils sont considérés comme inhibiteurs de la croissance tumorale (**Pasman *et al* ,2008 ; Hughes *et al* ,2008**).

II.2.2.2.3 Les acides gras insaturés non usuels

Certaines classes de plantes, d'invertébrés marins, insectes contiennent des acides gras polyméthylène insaturés non usuels et particulièrement les acides delta5-oléfiniques qui sont des composés caractéristiques et systématiques des huiles de graines gymnospermes. Dans les graines des conifères l'ensemble de ces acides gras non usuels peuvent être présents, dépendamment de la famille botanique considérée (**Asset *et al* , 2002**).

II.4.2.3 Besoins et apports recommandés en acides gras

Comme pour tout nutriment, des apports excessifs en lipides peuvent être néfastes pour la santé. La part recommandée des lipides dans l'apport énergétique est de **35 à 40 %**. Cette fourchette permet d'assurer la couverture des besoins en acides gras essentiels et indispensables et prend en compte la prévention des pathologies. La limite haute de cette fourchette est dépassée en France par environ 43 % des adultes et 34 % des enfants.

Il est également important de s'intéresser à la **qualité** des acides gras apportés par l'alimentation car tous ne sont pas équivalents. Ainsi, des ANC ont été proposés pour les acides gras indispensables (LA, ALA, DHA), l'EPA, les trois acides gras saturés athérogènes en cas d'excès, et l'acide oléique. Une recommandation a également été faite pour l'ensemble des acides gras saturés, bien qu'ils n'aient pas tous les mêmes effets physiologiques.

- Recommandations en acides gras pour l'adulte consommant 2000 kcal par jour :

Les valeurs sont exprimées, excepté pour l'EPA et le DHA, en **pourcentage de l'apport énergétique sans alcool**, que l'on appellera « apport énergétique » (AE), par souci de simplification. Dans le cas du DHA et de l'EPA, les valeurs sont exprimées en milligrammes dans la mesure où les études disponibles ont utilisé cette unité (**ANSES**).

II.4.3 Les constituants mineurs

II.4.3.1 L'insaponifiable

C'est l'ensemble des composés qui ne sont pas esters, mais tous autres produits de constitution plus ou moins complexe. La teneur des corps gras en ces produits est généralement très faible, très inférieure à 1% (**Roger, 1974**).

II.4.3.1.1 Les tocophérols

II.4.3.1.1.1 Définition

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs (1936). Le terme « tocophérol » recouvre en fait plusieurs composés (α -tocophérol, β tocophérol, γ -tocophérol). Présents dans les huiles végétales alimentaires, ils assurent la protection vis-à-vis de l'oxydation (antioxygènes). L' α -tocophérol est la vitamine E. Parmi les huiles végétales, les huiles riches en acides gras polyinsaturés (maïs, colza, tournesol, soja) sont celles qui sont susceptibles d'apporter le plus de tocophérols totaux. Les corps gras animaux aux ne renferment pas de tocophérols. (Wolff, 1968).

II.3.1.1.2 Structure

Les tocophérols sont des substances constituées par un noyau commun hydroxychromane et une chaîne latérale saturée phytyle à 16 carbones. Le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et tocotriénols. La forme la plus active est l' α -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les β et γ tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % environ de l'activité de la forme α , alors que la forme δ est pratiquement inactive. Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. Deux de ces produits possèdent également une certaine activité vitaminique: environ 20% pour l' α -tocotriénol et 5% pour le β -tocotriénol. Les autres sont inactifs (figure 6).

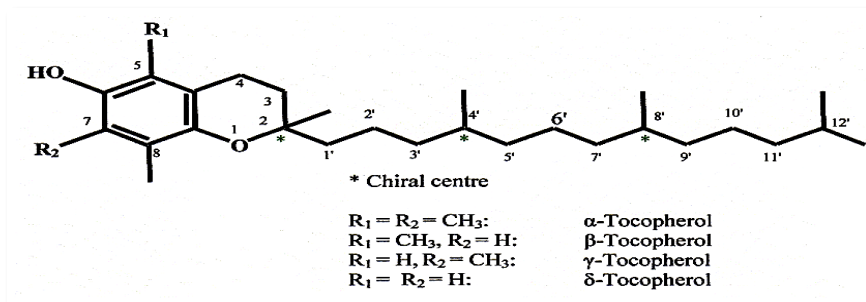


Figure 6 : Structure des tocophérols (Soulie *et al*, 1992).

II.4.3.1.1.3 Propriétés physico chimiques des tocophérols

A la température ambiante, les tocophérols se présentent sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques).

Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl- α -tocophérol sont relativement stables (**Claude, 2003**).

II.4.3.1.1.4 Sources de Vitamine E

Les sources alimentaires les plus riches en vitamine E sont les céréales (seigle, blé, avoine, etc.) (**Surai, 2002**) dont leurs germes, les fruits (bananes, fraise, melon, etc.), la plupart d'oléagineux, dont leurs huiles (tournesol, soja, maïs, olive, arachide, etc.). On trouve de la vitamine E dans les légumes (salade, épinard, chou, poireau), dans la graisse animale ainsi que dans le lait, le beurre et le fromage et également dans le poisson (**Cuvelier et al, 2003**).

II.4.3.1.1.5 Carences en vitamine E

Il n'y a guère de symptômes spécifiques de la carence en vitamine E dans l'espèce humaine. Dans certaines circonstances particulières, des troubles neurologiques et musculaires liés à une carence ont été décrits. Chez les prématurés la déficience en vitamine E peut être à l'origine d'une anémie hémolytique et augmenterait le risque d'atteinte rétinienne.

II.4.3.1.1.6 Besoins et recommandations

Les quantités d'alpha-tocophérol sont exprimés en unités internationales (UI) et en milligrammes (mg) de RRR-alpha-tocophérol (également appelé vitamine E naturelle ou d-alpha-tocophérol), la forme de vitamine E présente dans les aliments.

II.4.3.1.1.7 Rôle de la vitamine E

○ Vitamine E et activité anti oxydative

La vitamine E est un antioxydant majeur au sein des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Elle inhibe le phénomène de peroxydation lipidique en piégeant les radicaux libres générés lors du processus oxydatif (**Sies et al., 1992**). L'oxydation de l' α -tocophérol conduit à un radical tocophéryl relativement stable du fait du noyau chromanol. La vitamine E peut être secondairement régénérée en présence de vitamine C ou d'autres réducteurs.

○ Vitamine E et activité anti-inflammatoire

La vitamine E, piégeant les radicaux libres, inhibe le mécanisme de peroxydation des lipides qui aboutit à la formation de prostaglandines, médiateurs physiologiques de l'inflammation. De nombreuses études pharmacologiques ont prouvé cette activité anti-

inflammatoire par voie topique, en montrant que la vitamine E diminuait les érythèmes et les œdèmes.

La vitamine E a donc une action sur les coups de soleil, une fois formés. L'effet anti-inflammatoire de la vitamine E est également initié par d'autres mécanismes comme l'inhibition de la libération d'histamine et la stabilisation des membranes lysosomiales. En effet, les lysosomes, riches en lipides insaturés, sont très sensibles à la peroxydation: la vitamine E prévient leur rupture et empêche ainsi la libération d'enzymes et de médiateurs pro inflammatoires.

- **Vitamine E et cancer**

Compte tenu du rôle procarcinogène probable des peroxydes lipidiques, et des possibilités de mutations de l'ADN suite à la peroxydation des bases nucléiques (**Pré, 1993**), l'effet protecteur de la vitamine E semble non négligeable.

En 2002, la société américaine du cancer publiait les résultats d'une étude de longue haleine comptant près d'un million de participants adultes aux États-Unis chez qui on a voulu évaluer les effets d'une prise régulière de suppléments de vitamine C et de vitamine E sur le taux de mortalité par cancers de la vessie a révélé que les sujets ayant consommé des suppléments de vitamine E sur plus de 10 ans étaient effectivement moins à risque (**Jacobs et al., 2002**).

- **Vitamine E et fonction immunitaire**

Des nombreuses études expérimentales suggèrent que la vitamine E joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire. Un statut marginal en vitamine E a été trouvé associé à une plus grande fréquence de maladies infectieuses (**Chavance et Coll, 1989**) et de cancers (**Woodson et al., 1999**). La supplémentation en vitamine E a permis d'améliorer la réponse immunitaire chez l'homme et le rat âgés (**Pallast et al, 1999**).

La vitamine E diminue l'activité suppressive des lymphocytes T et augmente la sécrétion L'interleukine 2 chez la souris infectée par le virus de l'immunodéficiência murine (**Wang et al., 1994**). Certaines preuves indiquent la possibilité d'un effet bénéfique de la vitamine E et d'autres micronutriments sur la progression de l'infection à VIH et sur les symptômes cliniques du SIDA (**Tang et al., 1997**).

- **Vitamine E et athérosclérose**

L'événement initial de l'athérosclérose est une lésion ou une stimulation de l'endothélium artériel. L'augmentation de la perméabilité endothéliale favorise la pénétration des LDL

circulantes dans l'intima. A ce niveau, les LDL sont modifiées par peroxydation avec apparition de produits de peroxydation des lipides, fragmentation de l'Apo B et hydrolyse partielle de la phosphatidylcholine en lysophosphatidylcholine; ces modifications ont pour conséquence la perte de reconnaissance par le récepteur Apo B/E et la reconnaissance des LDL oxydés par un récepteur "scavenger" non régulé des macrophages. L'accumulation de lipides dans ces cellules entraîne leur dégénérescence en cellules dites spumeuses à l'origine de la plaque d'athérome. Ces dernières, par les médiateurs qu'elles produisent, vont initier des modifications de l'intima des vaisseaux et entretenir les processus précédents.

La vitamine E des HDL et LDL prévient l'oxydation des lipoprotéines et s'oppose au développement de la plaque d'athérome par son effet inhibiteur de la production et de la libération de radicaux libres oxygénés par les macrophages et les polynucléaires activés, et par son action sur le métabolisme de l'acide arachidonique.

L'importance de α -tocophérol est appuyée par l'existence d'une corrélation inverse entre vitamine E et mortalité par maladie coronarienne, et par la diminution du risque cardiovasculaire lors d'une supplémentation en cette vitamine (Cogny *et al.*, 1994).

- **Vitamine E et Propriétés hydratantes**

Les propriétés antirides de la vitamine E sont une conséquence de ses propriétés hydratantes. En augmentant la capacité de rétention d'eau de la peau, la vitamine E améliore son aspect de surface et diminue l'amplitude des rides ; la peau devient plus souple et plus douce.

- **Vitamine E et amélioration de la microcirculation cutanée**

La stabilisation des membranes par la vitamine E, en particulier au niveau vasculaire, améliore la microcirculation cutanée, en facilitant les mouvements des vaisseaux. Ceci permet un apport de nutriments augmenté au niveau de la peau et une meilleure évacuation des déchets. Les effets de la vitamine E sur la croissance des cheveux peuvent être attribués à cette action d'accroissement de la microcirculation locale au niveau du bulbe pileux.

II.4.3.1.2 Les stérols

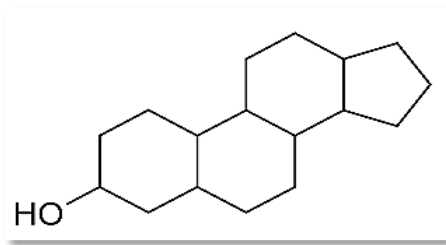
II.4.3.1.2.1 Définition

Les stérols sont des stéroïdes comprenant au moins un groupement hydroxyle "OH" dans la plupart des cas sur la carbone 3 (Naudet, 1992) . Selon l'origine biologique (Gaignaut *et al.*, 1989) on peut classer les stérols en quatre répartitions, les stérols animaux (Zoo stérols),

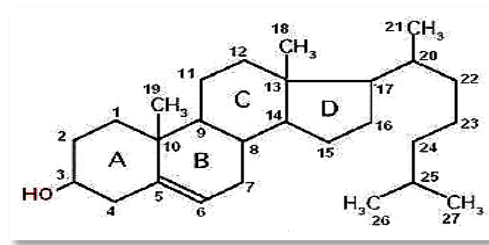
stérols végétales (Phytostérols), stérols des champignons inférieurs (Mycostérols) et les stérols des algues.

II.4.3.1.2.2 Structure

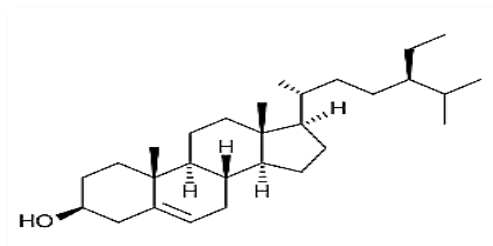
Les stérols sont des molécules lipidiques possédant une structure tétracyclique, un groupement hydroxyle sur le troisième carbone (Figure. A) et une chaîne aliphatique sur le 17^{ième} carbone (Figure. B). La structure des stérols varie essentiellement au niveau de la nature de la chaîne aliphatique en C17 (nombre de carbone, alkylation et insaturation) ainsi qu'au niveau de la position et du nombre d'insaturation sur les cycles. La structure chimique de deux stérols majeurs, le sitostérol ou phytostérol (stérol de plantes) et l'ergostérol (stérol de champignons), sont illustrés sur la figure (C et D).



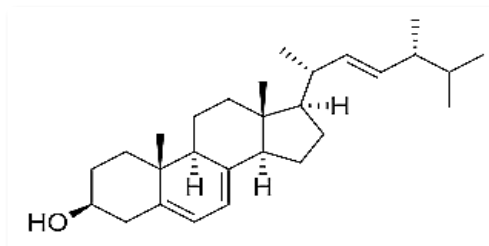
A



B



C



D

A. Noyau tétracyclique représentant la base de la structure d'un stérol.

B. Numérotation des carbones sur une molécule de cholestérols, le groupement OH est porté par le carbone 3, l'insaturation par les carbones 5 et 6 et la ramification par le carbone 17.

C. phytostérol.

D. Ergostérol.

II.4.3.1.2.3 Apports recommandés en phytostérols

Ces composés sont naturellement présents dans les huiles (de 0,1 à 0,5%) et les aliments d'origine végétale. L'apport journalier a été estimé à 0,5 g/j, mais les données de composition

sont fragmentaires. Ces stérols végétaux sont recherchés pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes. Toutefois, cet effet hypocholestérolémiant n'est observé que pour des consommations journalières comprises entre 2 et 3 g/j.

II.4.3.1.2.4 Le rôle des phytostérols dans l'organisme

Les phytostérols inhibent l'absorption digestive du cholestérol et accélèrent l'efflux de cholestérol hors des entérocytes vers la lumière intestinale (**Lecerf, 2007; Ostlund et Lin, 2006**). En l'an 2000, aux Etats-Unis, la « Food and Drug Administration » a reconnu officiellement que les produits contenant des phytostérols diminuent les risques de maladies cardiovasculaires s'ils sont associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol.

On les retrouve également dans des aliments comme les germes de blé ou de soja, les huiles végétales comestibles telles que l'huile de graine de tournesol ou de maïs. La fonction des stérols dans les plantes est identique à celle du cholestérol chez l'homme: maintenir la structure et la fonction de la membrane cellulaire.

Le β -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique, des propriétés immunomodulatrices, et antimutagénique (**Ostlund et Lin, 2006**).

D'autres travaux, notamment sur l'homme, ont montré des effets prometteurs sur la normalisation du fonctionnement des cellules lymphocytaires T, impliquées dans la diminution des réactions auto-immunes, ainsi qu'au niveau de la normalisation de l'équilibre DHEA/Cortisol. Le bêta sitostérol, seul ou en association avec d'autres phytostérols, diminue les niveaux sanguins de cholestérol.

Enfin, plusieurs études montrent l'intérêt du β -sitostérol dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate. Il a été également montré qu'il possède des propriétés antioxydantes, diminuant la production macrophagique des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Moreno, 2003**).

II.4.3.1.3 Les caroténoïdes

II.4.3.1.3.1 Définition et structure

Les caroténoïdes ce sont des hydrocarbures fortement insaturés, de couleur jaune à l'orange (**Alais et al, 2003**). Ils comprennent les carotènes et les xanthophylles. Les principaux carotènes rencontrés dans les huiles végétales sont les β carotènes, mais on les

trouve également chez les animaux, car la demi-molécule oxydée de α , β , et γ carotène est la vitamine A. (Alais et Linden, 1997).

Les caroténoïdes dérivent chimiquement d'une structure de base formée par l'enchaînement linéaire de huit unités isopréniques, associées en deux groupes de quatre unités (géranylgéranyl) tête-bêche. Cette structure de base, linéaire () avec de nombreuses doubles liaisons conjuguées, est le lycopène (figure 7) et tous les autres caroténoïdes en dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation.

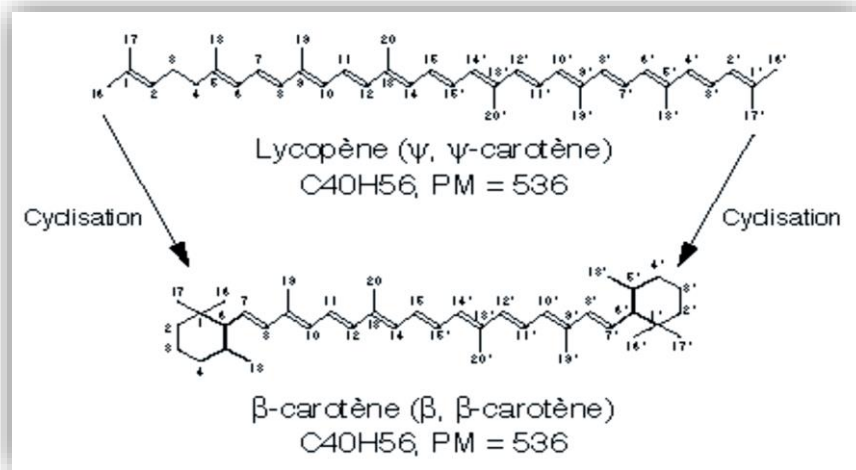


Figure 7 : Représentation schématique du lycopène, caroténoïde linéaire. Par cyclisation des extrémités, on obtient la structure du b-carotène.

La nomenclature [1] fait appel :

-pour les carotènes : au terme carotène précédé de deux lettres grecques identifiant les types de cycles (définis par la position de la double liaison), présents au deux extrémités de la molécule (17)(figure 8);

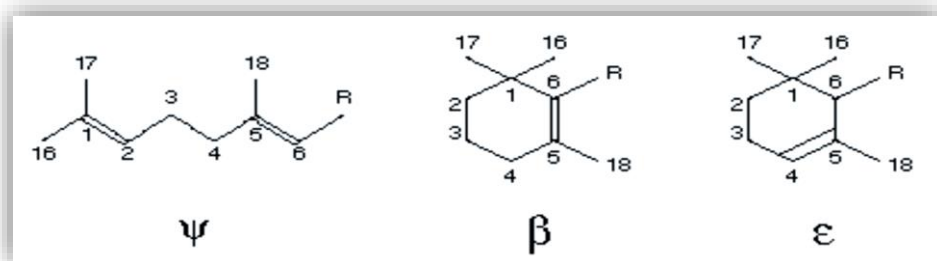


Figure 8 : Représentation des cycles terminaux qui diffèrent par la position de leur double liaison. Ils sont obtenus par cyclisation du lycopène.

-pour les xanthophylles : à la numérotation par préfixe ou suffixe des fonctions oxygénées accompagnées du numéro du carbone porteur de la fonction, conformément à la nomenclature de chimie organique et à la numérotation des carbones illustrée dans la 19.

Les dérivés de caroténoïdes, à moins de 40 carbones, s'appellent apocaroténoïdes quand les carbones manquants appartiennent aux extrémités de la molécule, ou norcaroténoïdes quand les carbones manquants sont au centre de la molécule.

II.4.3.1.3.2 Les sources et les apports recommandés en caroténoïdes

80 % des apports en caroténoïdes sont représentés par le bêta-carotène, la lutéine et le lycopène. Si les apports journaliers recommandés en caroténoïdes ne sont pas encore déterminés, certaines études évaluent à 6 mg l'apport quotidien nécessaire de **bêta-carotène**, alors que notre alimentation actuelle en fournit seulement 1,5 mg. On trouve le bêta-carotène essentiellement dans la carotte, l'abricot, le melon, les légumes verts et la citrouille.

En ce qui concerne l'apport nutritionnel en **lutéine**, il serait en France de 2,5 mg par jour, alors qu'il devrait s'élever à 6 mg. On trouve la lutéine, comme la **zéaxanthine**, essentiellement dans les épinards, le chou vert, le persil, les brocolis, la salade, les petits pois, les haricots verts, les choux de Bruxelles et le maïs.

La tomate, le melon d'eau, le pamplemousse et la papaye constituent, quant à eux, les principales sources de **lycopène**. Les apports conseillés en vitamine A sont de 800 ER (équivalent rétinol : 6 μ de bêta-carotène présentent la même activité vitaminique que 1 μ g de rétinol, soit 1 μ de ER). La vitamine A est fortement présente dans l'huile de foie de morue, le foie, le foie gras, les poissons gras, le beurre, le jaune d'œuf, les rognons, les fromages, les carottes, le cerfeuil, les abricots, les épinards, le potiron, la mâche, le poivron rouge, la tomate, l'asperge, le melon, la mangue, la papaye, les pruneaux secs...

II.4.3.1.3.3 Rôles des caroténoïdes dans l'organisme

- Le β -carotène : Présent notamment dans les carottes et le persil, il est particulièrement important pour l'organisme car c'est un précurseur de la vitamine A. Il permet de couvrir environ 40% des besoins en vitamine A dans les pays industrialisés.

- **Le lycopène** : Colorant des tomates, le lycopène protégé la peau des rayons ultraviolets. Plusieurs études ont montré que le lycopène pouvait réduire certains facteurs de risque d'athérosclérose et de cancers.

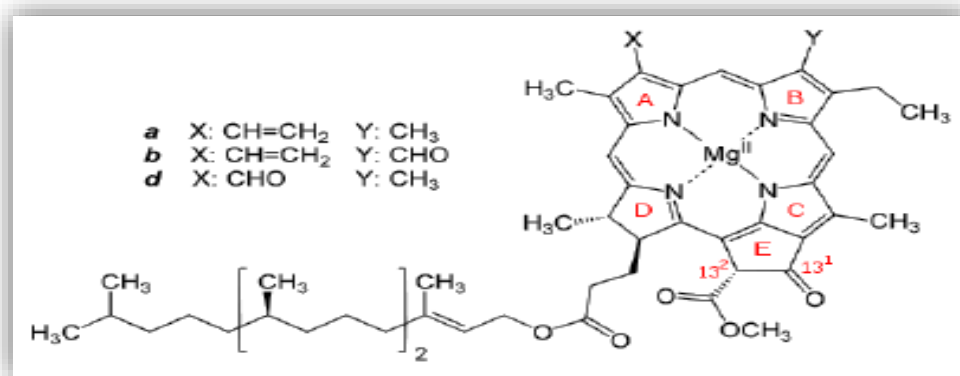
- **La lutéine** : Très riche dans le cresson, les épinards, les poivrons, la lutéine se concentre dans l'organisme surtout au niveau de la rétine et du cristallin. Elle y joue un rôle

protecteur vis-à-vis du stress oxydant et des ultraviolets. Elle aiderait à prévenir les maladies dégénératives des yeux. (Favier ,1997).

II.4.3.1.4 Les chlorophylles

II.4.3.1.4.1 Définition et structure

Ce sont les pigments verts des végétaux, elles jouent un rôle fondamental dans la photosynthèse. Elles sont liposolubles notamment du fait de la présence de la chaîne phytyle (Tremolieres *et al.*, 1980). Il existe trois molécules de chlorophylle : a ou α (C₅₅H₇₂MgN₄O₅), b ou β (C₅₅H₇₀MgN₄O₆), d ou (C₅₄H₇₀MgN₄O₆)



II.4.3.1.4.2 Rôle des chlorophylles

Les chlorophylles sont au cœur de la machinerie que les plantes vertes et certaines bactéries ont inventée pour s'alimenter en utilisant le soleil comme source d'énergie, le dioxyde de carbone comme source de carbone et l'eau. Dans cette réaction chimique, la plus importante de la biosphère, le gaz carbonique de l'atmosphère est transformé par photosynthèse en glucose et du dioxygène est dégagé.

II.4.3.1.5 Les hydrocarbures

Ce sont des paraffines de 11 à 35 atomes de carbone, se trouvent à l'état de trace dans l'huile (François ,1974) .

II.4.3.1.6 Les alcools Triterpéniques

Les alcools triterpéniques sont des composés provenant de la polycyclisation, selon divers modes, du squalène, hydrocarbure à 30 atomes de carbone. Ainsi, on distingue les alcools triterpéniques comportant 3 cycles hexagonaux et un cycle pentagonal et les alcools triterpéniques pentacycliques spécifiques des végétaux (comportant 4 cycles hexagonaux et un cycle pentagonal ou hexagonal).

Dans le règne végétal, les alcools triterpéniques les plus rencontrés sont le cycloarténol, le 24-méthylèncycloartanol, les α et β amyrines et l'érythrodiol. Les alcools triterpéniques sont très intéressants, principalement en raison de leur activité anti-inflammatoire. Mais ils sont aussi utilisés en raison de leur activité cytostatique sur les cellules cancéreuses, ou en vertu de leurs propriétés en urologie, en neurologie, en cosmétique ou encore pour leur action antibactérienne.

II.4.3.2 Les phospholipides

Une molécule de phospholipide est construite à partir de quatre constituants : des acides gras, une plate-forme à laquelle sont fixés les acides gras, un phosphate et un alcool lié au phosphate (figure 9). La plate-forme sur laquelle les phospholipides construits peut être le glycérol, alcool à trois carbones, ou la sphingosine, alcool plus complexe (Stryer *et al.*, 2003).

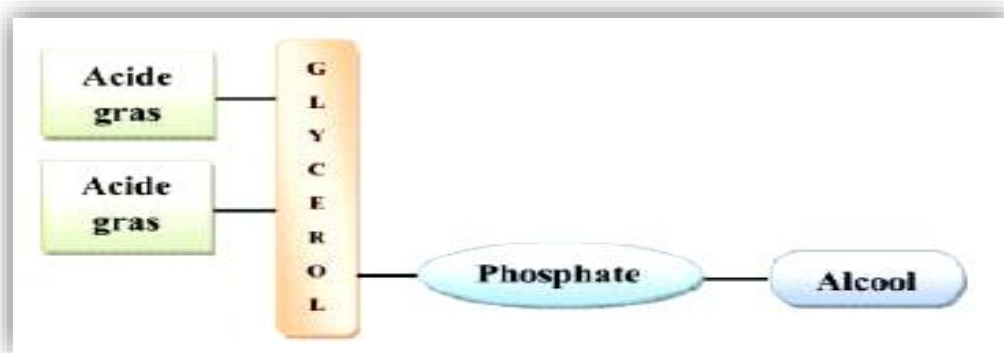


Figure 9 : Structure des phospholipides (Stryer *et al.*, 2003).

II.4.3.2.1 Rôles des phospholipides

Les phospholipides sont des esters du glycérol dont les positions sn-1 et sn-2 sont estérifiées par des AG et la fonction alcool en sn-3 est naturellement estérifiée par un acide phosphorique lui-même associé à un sucre (inositol) ou une amine (choline, éthanolamine, sérine). En raison de leur polarité (hydrophilie liée à la fonction aminée et hydrophobie liée aux AG), les phospholipides jouent un rôle majeur de constituant des interfaces membranaires, de transporteur d'AG et d'émulsifiant. Ces propriétés émulsifiantes sont largement utilisées en technologie alimentaire.

II.4.3.3 Les cires

Les cires naturelles sont des esters d'acides gras et de monoalcool aliphatique (alcools gras principalement et parfois alcool α méthylique). Les cires sont présentes aussi bien dans les lipides animaux que dans les lipides végétaux.

Chez les animaux elles sont surtout abondantes chez les animaux marins supérieurs (cétacés en particulier) ou elles peuvent former de véritable dépôt et chez les poissons.

Chez les végétaux les cires contribuent à la formation des pellicules protectrices des graines et des fruits, elles peuvent également s'accumuler dans certains tissus (Naudet *et al.* 1992).

La formule générale des cires est :

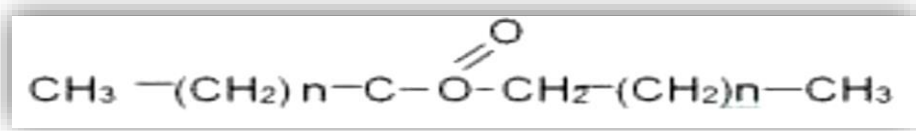


Figure 10 : Structure du Palmitate de cétyle (Weil *et al.*, 2001).

Chapitre III : Généralités sur les polyphénols

III.1 Présentation général sur les polyphénols

Les polyphénols dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire.

On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement. Contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Le terme « **phénol** » englobe approximativement **10000** composés naturels identifiés.

Les polyphénols sont un très vaste groupe de substances dont l'élément structural commun c'est la présence d'au moins : un **Noyau Aromatique** lié à un groupement **Hydroxyle** (libre ou engagé). (Figure 11).

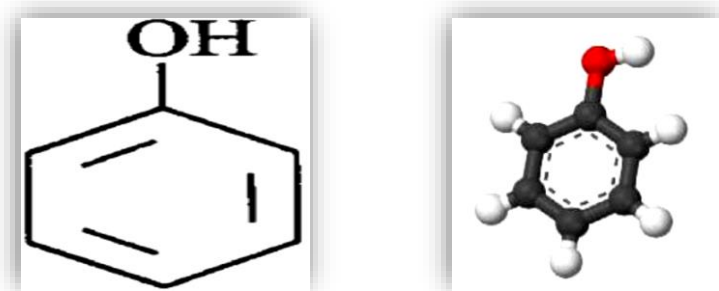


Figure 11 : Structure du noyau phénol.

III.2 La biosynthèse des polyphénols

A. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Kening et al, 1995**).

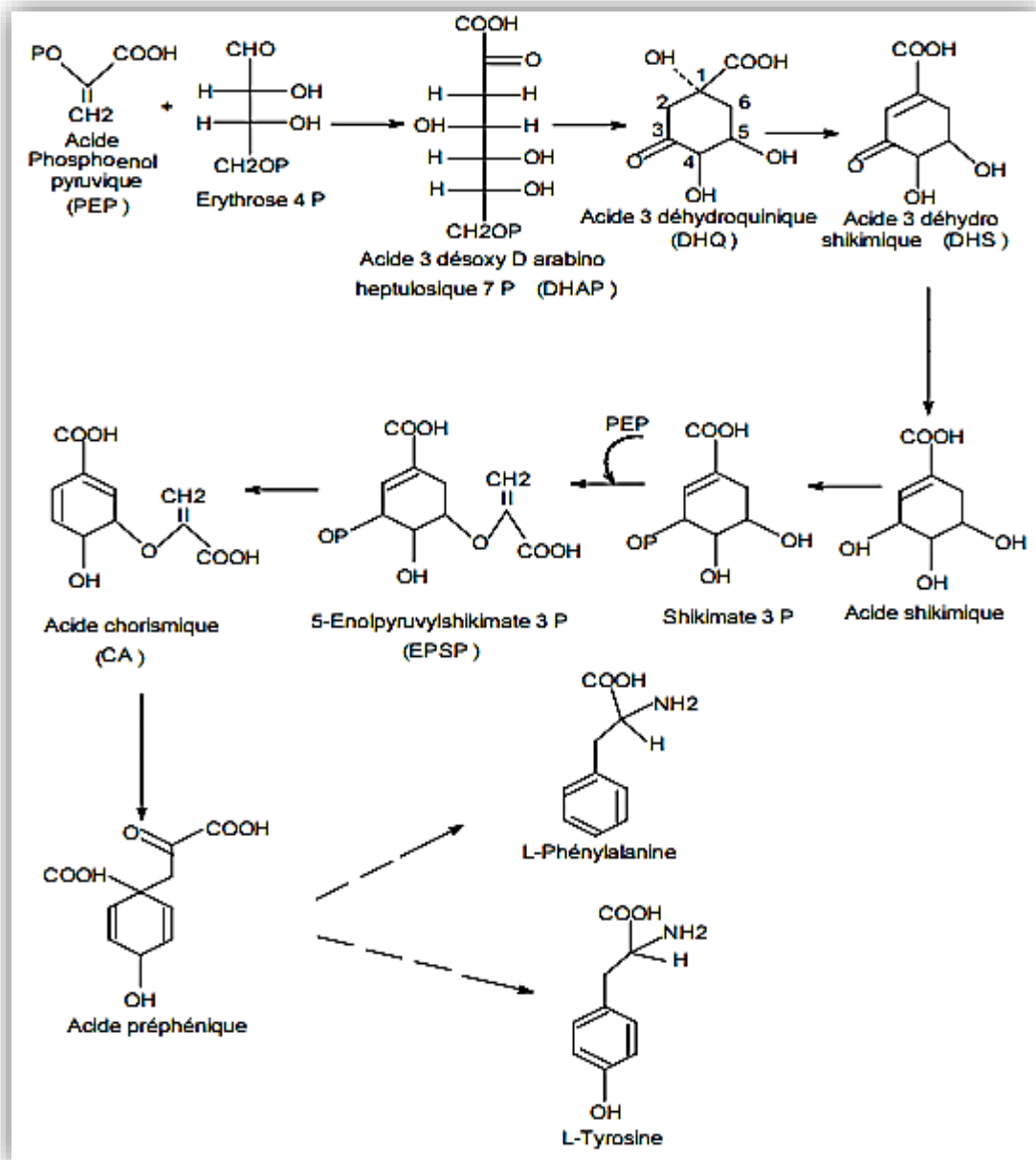


Figure 12 : La voie de Shikimate (Floss, 1997).

B. La voie de l'Acétate/Malonate

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (figure 13).

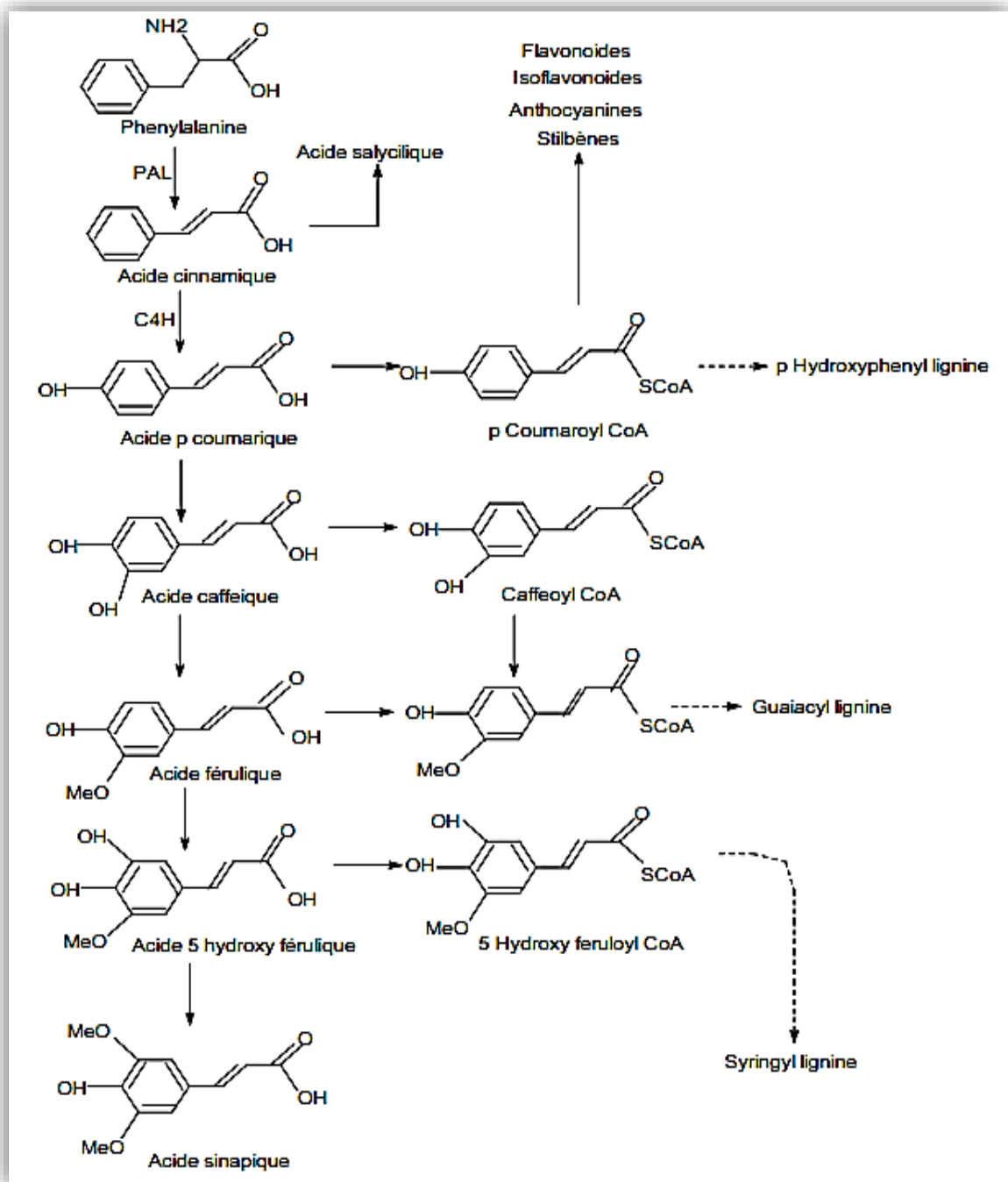


Figure 13 : La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann *et al*, 2004).

C. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

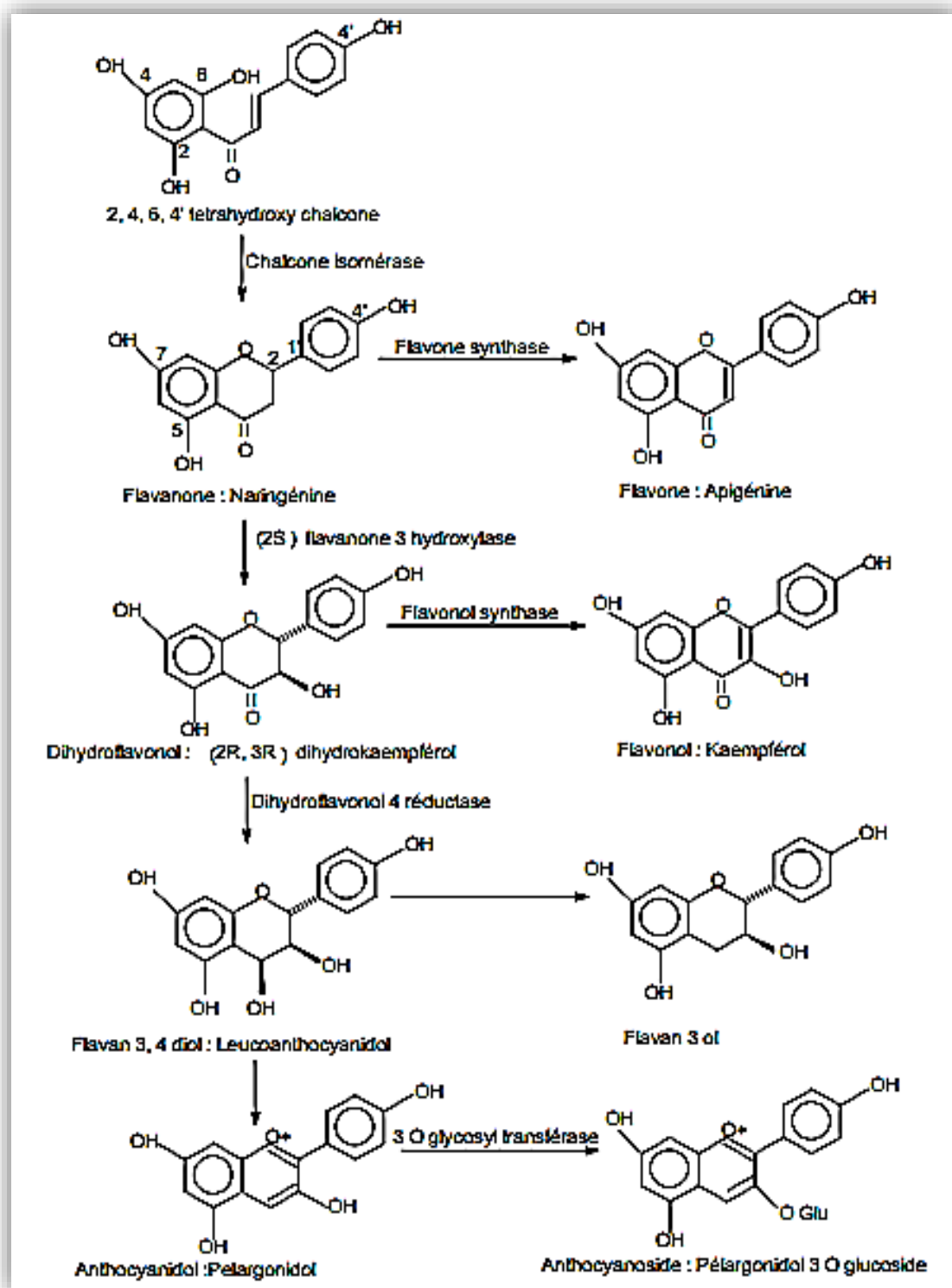


Figure 14 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel–Shirley, 2001; Subamanian *et al*, 2007).

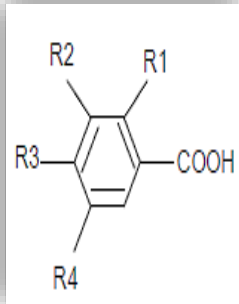
III.3 Principales classes des polyphénols

III.3.1 Les acides phénoliques simples

A. Acides hydroxybenzoïques

- ✓ Sont des dérivés de l'acide benzoïque.
- ✓ Ont une structure générale de base de type (C6-C1).
- ✓ Existents souvent sous forme d'esters ou de glycosides.
- ✓ Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 2.

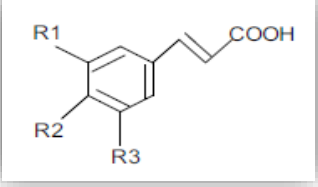
Tableau 2: Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

B. Acides hydroxycinnamiques

- ✓ Dérivent de l'acide cinnamique.
- ✓ Ont une structure générale de base de type (C6-C3).
- ✓ Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques.
- ✓ Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau 3 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

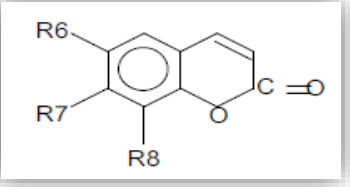
Tableau 3: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

C. Coumarines

- ✓ Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale.
- ✓ Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique.

Tableau 4: Principaux types de coumarines (Macheix *et al*, 2005 ;2006).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétol
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

III.3.2 Les flavonoïdes

III.3.2.1 Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaali *et al*, 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007). Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine **P**, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne

correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al*, 2001).

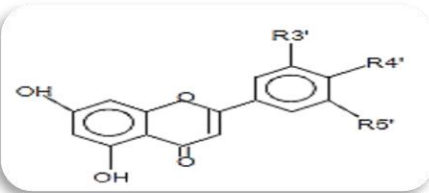
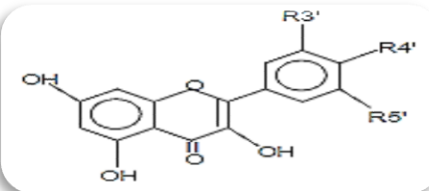
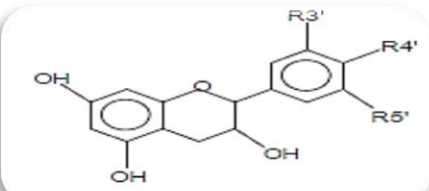
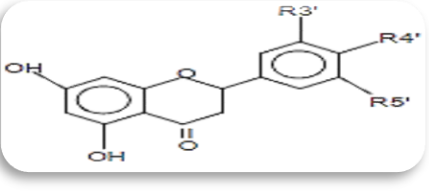
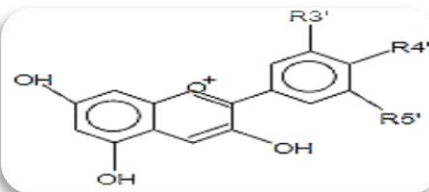
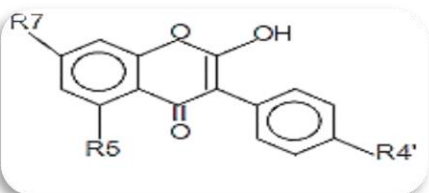
Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005; Malešev et Kuntić, 2007). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medić-Šarić *et al*, 2004).

III.3.2.2 Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W- Erdman *et al*, 2007). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (Emerenciano *et al*, 2007) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana, 2001; Malešev et Kuntić, 2007).

III.3.2.3 Classification

Tableau 5: Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001; W- Erdman *et al*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

III.4 Intérêts des polyphénols

Pour les nutritionnistes, l'intérêt des polyphénols a pris de l'ampleur depuis que certaines de ces substances se voient attribuer un certain nombre d'activités bénéfiques que ce soit pour les plantes (sources de ces polyphénols) que pour l'homme (consommateur de ces polyphénols).

III.4.1 Vis-à-vis des plantes

Les travaux plus anciens ont montré que les polyphénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation (**Parr et Bolwell, 2000**).

Les polyphénols et en particulier les anthocyanes et certains flavonoïdes interviennent dans la qualité alimentaire des fruits et participent à la coloration des fruits mûrs. Ces composés déterminent également la saveur des fruits : les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs (**Talcott et Howard, 1999**).

Les flavanones sont responsables de l'amertume des citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Hollman et al., 1996**).

D'autres composés phénoliques sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. De plus, la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

Par ailleurs, certains polyphénols responsables de la coloration et l'odeur des fleurs représentent des signaux visuels ainsi que sensoriels qui attirent les insectes pollinisateurs (**Robards et al., 1999**).

III.4.2 Vis-à-vis de l'homme

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Ces composés montrent des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes, antiallergique, antiathérogène, antioxydant, anti-inflammatoire, antithrombotiques, cardioprotecteur et les effets vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**).

Tableau 6: Composés phénoliques et leurs propriétés.

Classes de polyphénols	Activités	Références
Acide phénoliques	Anti carcinogènes – Antimutagènes Anti oxydants.	Ferguson ; 2001 , Sarni-Manchado et Chenyier ; 2006 , Atmani <i>et al.</i>, 2009
Flavonoïdes	Anti carcinogènes Anti mutagènes. Anti oxydants. Anti microbienne. Anti fongique.	Ferguson ; 2001 Alothane <i>et al.</i>, 2009 Ulanowska <i>et al.</i>, 2006 Ortuno <i>et al.</i>, 2006
Anthocyanes	Anti oxydants.	Sarni-Manchado et Chenyier ; 2006 Ferguson ; 2001
Tanins	Anti oxydants - Anti tumoral	Mousavinejade <i>et al.</i>, 2009

Chapitre IV : Oxydants, stress oxydatif et antioxydants

IV.1 Stress oxydatif

IV .1.1 Définition

Les radicaux libres sont des molécules instables et fortement réactives (**Suresh *et al.*, 2008**), entraînant le stress oxydant, qui est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (**Ratnam *et al.*, 2006**). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (**Ece *et al.*, 2007**).

Les protéines ainsi que les lipides sont les cibles principales des ROS (**Serdar *et al.*, 2006**). Ces derniers causent la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et les altérations de l'ADN (**Pre, 1993 ; Deaton, 2003**), provoquant ainsi le développement du cancer, du diabète, des maladies neurodégénératives et des maladies cardio-vasculaires (**Ratnam *et al.*, 2006**). L'organisme humain a développé des systèmes de défense pour traiter ce phénomène (stress oxydant) et lutter contre les espèces réactives qui sont préjudiciables à la vie humaine (**Prior et Cao, 2006 ; Laguerre *et al.*, 2007**).

Le stress oxydatif n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologie. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré (**Mercan, 2010**).

IV.1.2 Origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs prooxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Magder, 2006**) (Figure 15).

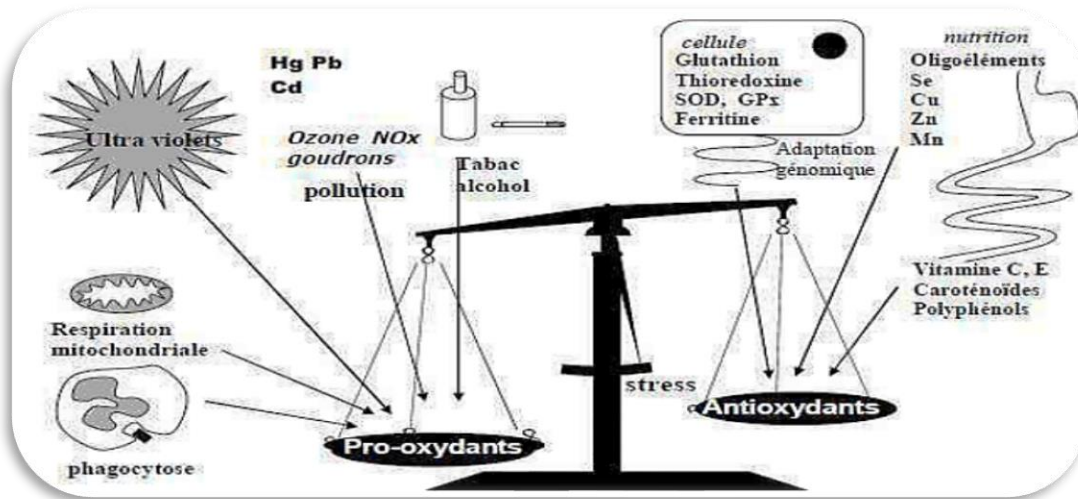


Figure 15: La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

IV.1.3 Les radicaux libres

IV.1.3.1 Définition

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (figure 16). La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte (Carange, 2010).

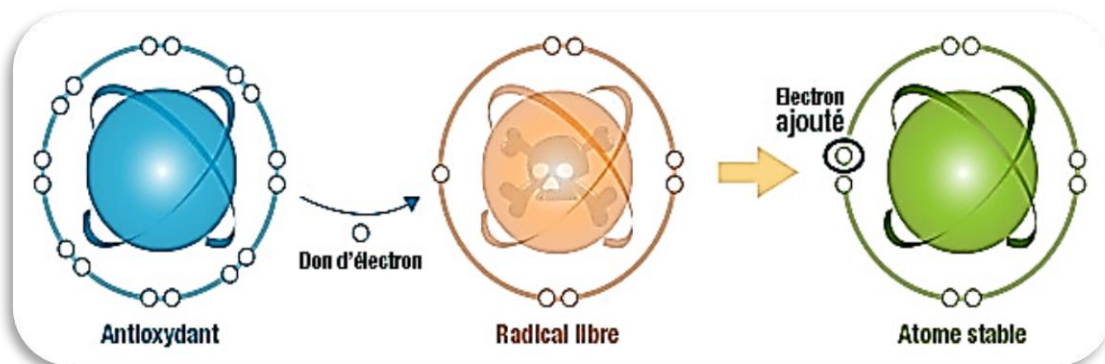


Figure 16 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.

Ces molécules se lient rapidement aux molécules non radicalaires à proximité résultant généralement en la formation de nouveaux radicaux. Les ROS sont principalement formés lors de l'oxydation des lipides par le cycle de Krebs et lors de la chaîne de transport mitochondriale d'électrons qui a pour but de produire de l'énergie. Les radicaux libres sont formés suite à l'oxydation des glucides, la glycation non enzymatique des protéines et leur subséquente dégradation. La présence d'une faible concentration de ROS est importante pour le maintien d'un statut redox cellulaire normal ; par contre, une production excessive de ROS

endommagent les lipides (peroxydation des lipides), les protéines et l'ADN compromettant les fonctions cellulaires (Yu, B.P 1994).

Les RL peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices (Delattre *et al.*, 2005).

IV.1.3.2 Les différents types des ROS

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes (Favier, 2003).

Les radicaux primaires, qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires et dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . Ils jouent un rôle particulier en physiologie.

Les radicaux secondaires se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Tableau 7).

Tableau 7: Les principaux radicaux libres (Haton, 2005).

Oxygène	O_2
Oxygène singulet	1O_2
Anion super oxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyde	HOO
Radical peroxyde	ROO
Hydroperoxyde	$ROOH$
Radical alkoxyde	RO^{\bullet}
Peroxyde d'hydrogene	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^{\bullet}

IV.1.4 Sources de production des radicaux libres

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. En effet, les sources de radicaux libres sont variées : la pollution atmosphérique, la cigarette, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, les radiations cosmiques, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques (**Favier, 2006**) (Figure 17).



Figure 17 : Sources de production des radicaux libres.

IV.1.5 Système de défense antioxydante

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances Chimiques. On divise les antioxydants en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (Enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme.

Les antioxydants endogènes se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme telle que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, toutes trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie. Ces enzymes jouent un rôle très important dans le maintien de la santé (**Baba et McGrath, 2008**). Et les antioxydants exogènes sont fournis par l'alimentation. On retrouve le bêta-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le lycopène et les polyphénols. Il y a aussi divers minéraux 'tels le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse et le fer. Figure 18.

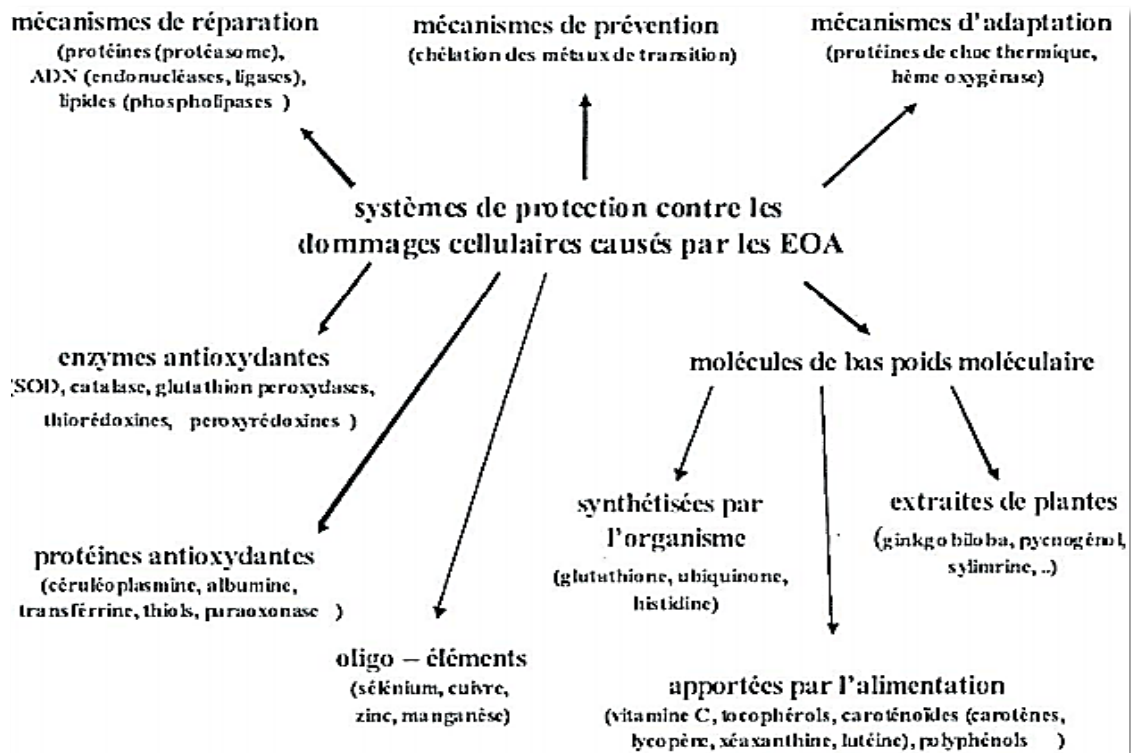
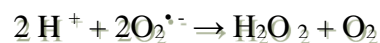


Figure 18: Réseau des antioxydants (Kohen et Nyska, 2002).

IV.1.5.1 Système antioxydants enzymatique

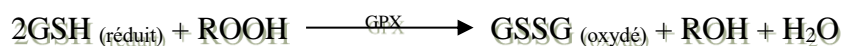
○ Les super oxydes dismutase (SOD)

La SOD est une métalloprotéine capable d'éliminer l'anion superoxyde par une action de dismutation. Cette réaction aboutit, à partir de deux molécules superoxydes, à la formation d'une molécule d'oxygène et d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (Garrel *et al.*, 2007).



○ La glutathion peroxydase

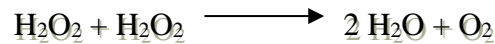
Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Valko *et al.*, 2006).



- **La catalase**

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko *et al.*, 2006**).

Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



IV.1.5.2 Système antioxydants non enzymatique

- **Les caroténoïdes**

La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Parmi d'autres caroténoïdes intéressants pour leurs propriétés antioxydantes, (**Center *et al.*, 2004**).

Il existe plusieurs membres dans le groupe des caroténoïdes, mais le caroténoïde le plus connu et étudié est le β-carotène, qui est un puissant antioxydant capable d'étancher rapidement l'oxygène singulet (**Fusco *et al.*, 2007**).

- **Les vitamines**

Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité indispensable pour le fonctionnement des voies métaboliques des êtres vivants. Elles réagissent sous forme de coenzyme (**Barati et Marechal, 2008**).

- **Les oligoéléments**

Les oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse (**Pastre, 2005**).

IV.1.6 Conséquences biochimiques du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Harris, 2002**).

IV.1.6.1 Peroxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des **EOA** et plus particulièrement des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (**ROOH**) qui peuvent être mesurés au

niveau plasmatique, Sous l'action de métaux de transition (**fer, cuivre**), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits dont font partie les aldéhydes (**Pincemail et al., 1999**). Les principaux marqueurs de l'oxydation lipidiques sont le malondéaldéhyde (**MDA**), les hydroperoxydes lipidiques, le 4-hydroxynonanal (**4-HNE**) (**Guichardant et al., 2006**).

IV.1.6.2 Peroxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les **EOA** sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (**Pincemail et al., 1999**).

IV.1.6.3 L'oxydation de l'ADN

Les espèces réactives, et plus particulièrement le radical hydroxyle (**HO•**), peuvent induire des cassures de l'**ADN**, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les **ERO** peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Ces modifications vont ainsi perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagénèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (**Valko et al., 2006**).

Partie 2 :
Matériels et méthodes

Chapitre V : Collecte des fruits du pistachier de l'atlas 2015,2016

V Collecte des fruits du pistachier de l'atlas 2015










V.1 Matériel












V.1.1 Matériel biologique








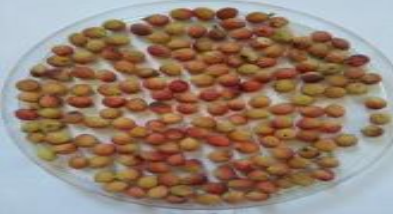


V.1.1.1 La récolte des échantillons

En 2015, les fruits de *Pistacia atlantica* ont été collectés durant une période de trois mois dans cinq endroits différents de Laghouat et un autre à Bouhnefia dans la wilaya de Mascara. Après séchage à l'air à l'ombre, les échantillons ont été conservés sous température de la chambre pendant deux semaines. En fonction du degré de maturation découvert par la couleur de la croûte, il est important de noter que la maturité des fruits n'est pas la même pour un arbre. En fait, il existe des fruits qui achèvent leur maturation prématurément et d'autres plus tard. Dans ce cas, il n'est pas étonnant de trouver des fruits matures au début du mois d'août et des fruits immatures à la fin du mois de septembre. Des descriptions sur les échantillons et leurs récoltes sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8: Description des échantillons 2015.

Arbre	La date et l'heure de la collecte	La région	Données géographiques	Code*	Photos
1 	22/07/2015 9h45	Dayet En nous	Latitude : 33°41'23.50"E Longitude : 2°39'44.19"E Altitude : 836m	1D (J)	
				1D (RF)	
				1D (N)	
2 	22/07/2015 10h00		Latitude : 33°41'23.50"E Longitude : 2°39'44.19"E Altitude : 836m	2D (J)	
				2D (RF)	
				2D (V)	
				2D (N)	

3	22/07/2015 11h00 Collecte 1	Route National 1 PK420	Latitude : 33°38'42.79"N	3RN (JR)	
3'  4	23/08/2015 19h10 Collecte 2		Longitude : 2°55'42.70"E	3' RN (JR)	
			Altitude : 812m	3' RN (V)	
4  8	29/08/2015	Laghouat (Ville)	Latitude : 33°48'07.38"N	4V(J)	
			Longitude : 2°53'20.06"N	4V(JR)	
			Altitude : 761m	4V(RV)	
5  9	19/09/2015 12h00 Collecte 2	Elghaicha Arbre D	Latitude : 33°59'15.80"N	5G(JR)	
			Longitude : 2°01'45.39"E	5G(V)	
			Altitude : 1380m		

6 	01/08/2015 09h15	Bou Hanifa W.Mascara	Latitude : 35°18'58 N Longitude : 0°2' 54 O Altitude : 237 m	6B(J)	
7 	06/08/2015 18h00	Route National 1 PK440	Latitude : 33°30'37.07"N Longitude : 2°59'32.58"E Altitude : 873m	7RN(JR)	
				7RN(RV)	
				7RN(V)	
8 	14/08/2015 12h10 Collecte 1	Elghaicha Arbre D	Latitude : 33°59'15.80"N Longitude : 2°01'45.39"E Altitude : 1380m	8G(JR)	
				8G(VR)	
				8G(V)	

*: A chaque échantillon est attribué un code comprenant un chiffre indiquant l'arbre et une première lettre indiquant l'initial du nom du site et des lettres (entre parenthèse) indiquant la couleur du fruit. Dans le cas où une deuxième cueillette concernant le même arbre est effectuée, un signe supplémentaire est ajouté.

☒ : Les caractéristiques géographiques sont obtenues à l'aide de *Google Earth* 2017.

Exemple :

- **1D(J) : 1** : arbre 1, RN : Dayet En nous, (J) : jaune.
- **3'RN (JR) : 3** : arbre 3, ' : 2^{ème} cueillette, RN : Route National, (JR) : Jaune Rouge.

V.1.2 Produits chimiques

La liste des produits chimiques utilisés est présentée en annexe 1.

V.1.3 Matériel et équipements

Le matériel et les équipements utilisés sont mentionnés en annexe 2.

V.2 Méthodes

La démarche expérimentale est résumée dans le diagramme suivant :

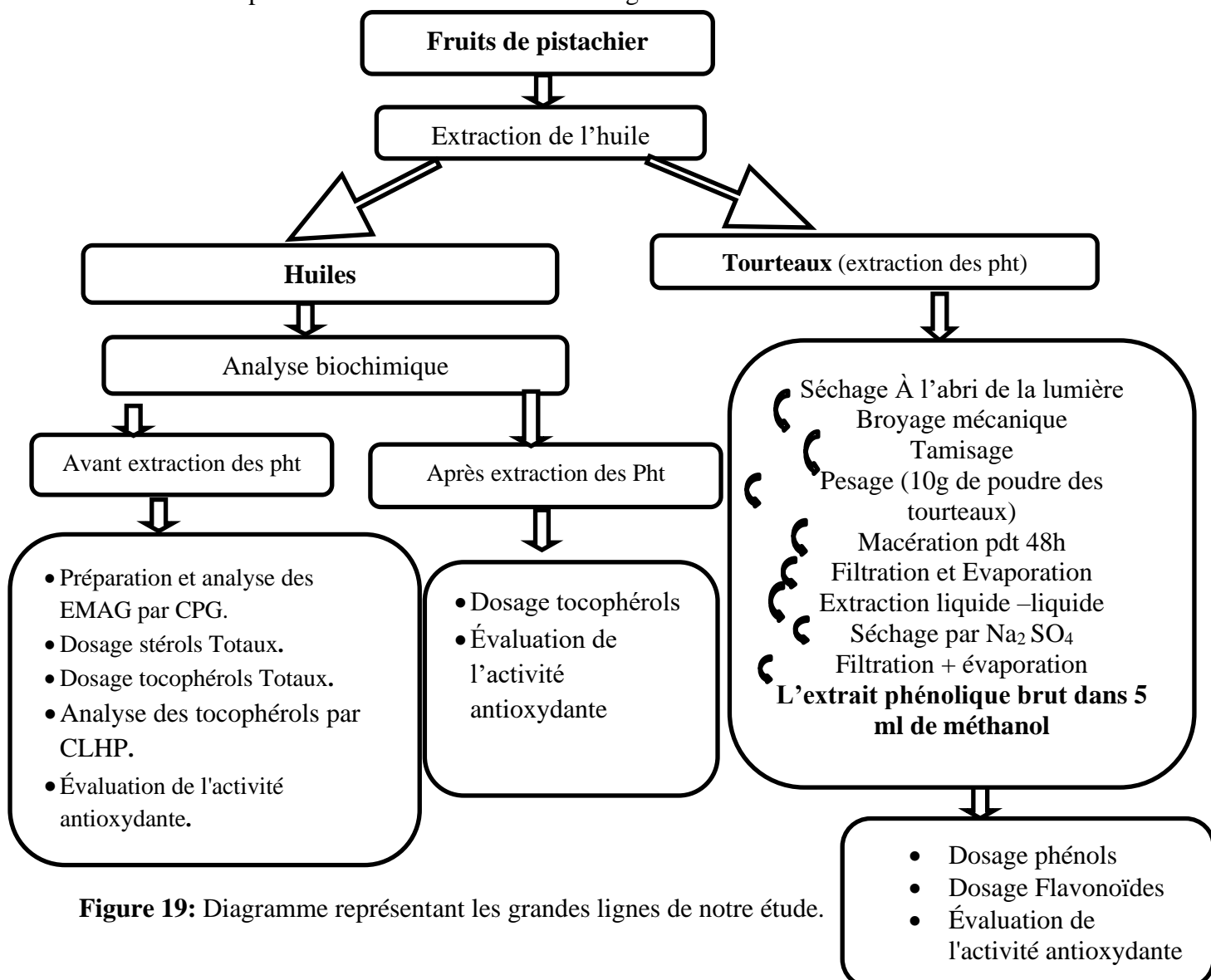


Figure 19: Diagramme représentant les grandes lignes de notre étude.

V.2.1 Tri et essai de classification des fruits

L'extraction des huiles des fruits de *Pistacia atlantica* est effectuée après le tri, selon la couleur des drupes, pour chaque récolte (Tableau 8).

V.2.2 Extraction par solvant (Soxhlet)

Nous avons choisi la méthode de l'extraction par soxhlet. Cette méthode est basée sur l'extraction solide liquide par soxhlet en utilisant l'hexane comme phase liquide pendant 8 heures.

Une cartouche pleine de 100 grammes d'échantillon est placée dans le soxhlet. Le ballon vide est préalablement pesé. Dans ce dernier, on ajoute de 300ml d'hexane est mis. Après quoi le système monté est mis à reflux.

Une fois l'opération terminée, et après déshydratation (par sulfate de sodium anhydre) et filtration, le solvant est évaporé à 40°C sous pression réduite. L'extrait obtenu est un extrait lipidique brut (huile).

V.2.2.1 Détermination de la teneur en huile

Nous avons calculé la teneur en huile de chaque échantillon en se basant sur la formule suivante

$$\text{Teneur en huiles} = \frac{H}{A} \times 100$$

H : masse d'huile sèche, en gramme d'huile.

A : prise d'essai, en gramme masse de matière végétale broyée sèche.

V.2.3 Analyse des acides gras

○ Préparation des esters méthyliques (EMAG)

Dans un ballon, 25 ml de solution méthanolique de soude (NaOCH₃ 0, 5%) sont ajoutés à 0,5 g d'huile. Le mélange est porté à une ébullition à reflux pendant 30 min. Après refroidissement, les esters méthyliques sont récupérés par une double extraction liquide-liquide en utilisant 20 ml d'hexane et 20 ml d'eau distillée. La phase organique est lavée plusieurs fois par de l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage par sulfate de sodium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé à 40 °C sous pression réduite.

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

- **Préparation de la colonne**

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

- **Préparation de l'échantillon**

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

- **Élution**

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

- **Analyse des esters d'acides gras par "CPG"**

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

- ❖ Le model d'appareil : Chrompack CP 9002.
- ❖ Type de détecteur : FID (250 °C).
- ❖ Température de l'injecteur : 280 °C.
- ❖ Volume d'injection : 0,8 ul.
- ❖ Programmation de la température du four : Isotherme.
- ❖ La colonne utilisée : DB23 (50% Cyanopropyl)
- ❖ Gaz vecteur : Azote.
- ❖ Débit : 1 ml / min.

V.2.4 Analyse quantitative des fractions minoritaires des huiles

V.2.4.1 Dosage des stérols totaux

a) Principe

Il s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard, basé sur une réaction colorée spécifique des 3 -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Le dosage des stérols est réalisée par la formation d'un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm. (Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique) (**Burck et al., 1974**).

b) Protocole

A partir des solutions chloroformiques de cholestérol à différentes concentrations, nous avons préparé une série de préparations afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de la concentration. On prend 1 ml de chaque solution et on ajoute 2 ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 minutes à l'obscurité. En mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe liant la densité optique en fonction de la concentration.

Nous avons effectué le dosage sur l'huile brute. Les échantillons d'huiles sont traités de la même manière. Le test est effectué deux fois.

La concentration des stérols dans chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec le cholestérol et exprimée en milligrammes équivalents de cholestérol par grammes d'huile (mg Chol/g d'H).

V.2.4.2 Dosage des tocophérols tortaux

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

a) Principe

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

Ce dernier, en présence de réactifs de phénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm et est très élevé.

b) Protocole

Une courbe d'étalonnage tracée à partir d' α -tocophérol commercial (vitamine E), permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g/l. A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans le butanol une concentration de 1g/l de solution concentré et des solutions diluées ayant des concentrations bien déterminées, par la suite on prélève 1ml de chaque solution diluée plus 1ml de réactif phénantroline 0.4 % et 0.5ml FeCl_3 0.12% dans l'éthanol. Après 5 min on mesure l'absorbance à 510nm.

Nous avons réalisé le dosage sur l'huile brute. Les échantillons d'huiles sont traités de la même façon. Le test est effectué deux fois.

La concentration des tocophérols dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la vitamine E et exprimée en milligrammes équivalents de vitamine E par 100 grammes d'huile (mg Vit E / 100g d'H).

V.2.4.3 Analyse des tocophérols par CLHP

Une CLHP a été réalisée selon (Nielsen et Hansen, 2008) avec quelques modifications. Avant l'analyse, 25 à 35 mg de chaque échantillon huileux ont été dilués dans 1ml de *n*-hexane. 20 µl de chaque solution sont injectés et analysés par CLHP (à 25°C).

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

Afin d'identifier les différents isomères de tocophérols d' α -, de β -, de γ - et de δ -tocophérol par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standards commerciaux.

Ainsi, des pourcentages de tocophérols individuels ont été calculés dans chaque extrait. La somme des tocophérols individuels donne la teneur totale en tocophérols.

V.2.4.4 Évaluation du pouvoir antioxydant des extraits des fruits de Pistachier de l'Atlas

V.2.4.4.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH•

a) Principe

L'activité antioxydante de nos extraits exprime leur capacité à réduire les radicaux libres. Elle est étudiée par la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violette foncée. Lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle (Figure 20) (Molyneux, 2004).

La mesure de l'absorbance (A) est effectuée par spectrophotométrie à 517nm.

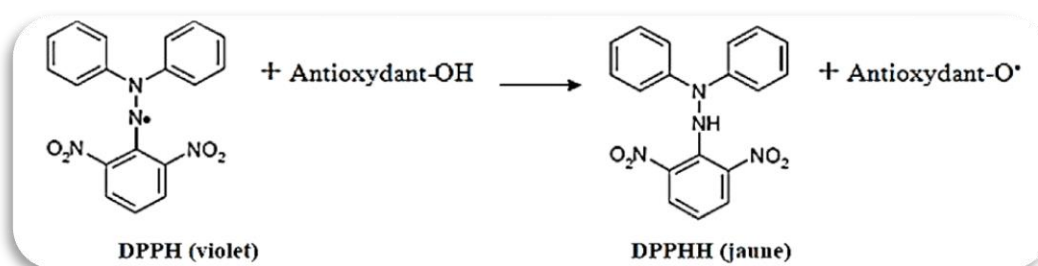


Figure 20: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004).

b) Protocole

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

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(A_{517} \text{ contrôle} - A_{\text{échantillon } 517})}{A_{517} \text{ contrôle}} \times 100 \quad (5)$$

Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre EC50 « Efficient Concentration ». L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en EC50. Elle est définie comme étant la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

V.2.5 Extraction, analyse et activité antioxydante de la fraction insaponifiable

V.2.5.1 Extraction et analyse de la fraction insaponifiable

a) Principe

L'insaponifiable d'un corps gras correspond à l'ensemble des constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (**Bereau, 2001**).

b) Protocole

L'extraction de l'insaponifiable repose sur la saponification d'une masse de 2 g d'huile par 50 ml d'une solution hydro alcoolique de potasse (1N) à chaud sous reflux pendant 1h 30 min. Après l'ajout de 50 ml d'eau distillée et 50 ml de diéthylether (double extraction) suivi d'un lavage avec l'eau distillée jusqu'à neutralisation, la phase organique est séchée par le sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite (**Figure 21**).

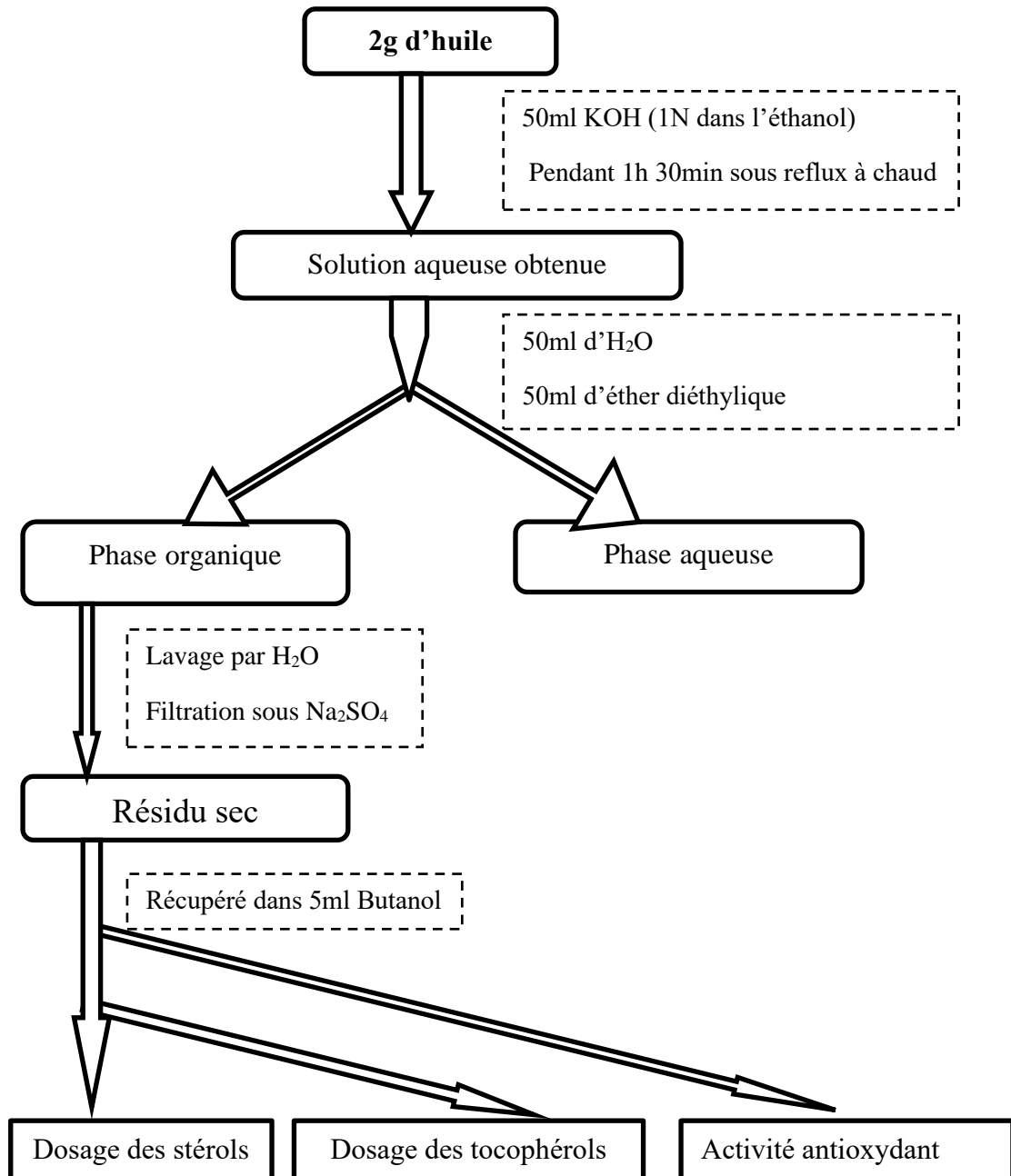


Figure 21: Schéma d'extraction des fractions insaponifiables.

V.2.5.2 Analyse quantitative des Fractions insaponifiables

Les résidus secs de la fraction insaponifiable sont solubilisés dans 5ml du butanol. Pour le calcul du rendement, le dosage des stérols et tocophérols totaux et l'évaluation de l'activité antioxydante, la même démarche expérimentale adoptée pour les huiles a été suivie.

V.2.6 Traitement des tourteaux

Notre série d'étude comprend vingt-deux échantillons issus de sept régions différentes. Les fruits récoltés en juillet, août et septembre 2015 ont été triés selon leur couleur. Ainsi, les drupes jaunes ou rouges sont considérés immatures par contre celles de couleur verte ou noire sont considérées matures.

V.2.6.1 Extraction et analyse quantitative

V.2.6.2 Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols à partir des tourteaux a été accomplie en 3 étapes selon le protocole rapporté par **Hertog et Hollman (1992)** avec quelques modifications :

- **Macération**

Après le séchage complet des tourteaux délipidés à l'abri de la lumière (évaporation de l'hexane) et à température ambiante, ils ont été finement broyés à l'aide d'un mortier traditionnel puis tamisés ($\varnothing = 250\mu\text{m}$). Une masse de 10g de la poudre est macérée dans un volume de 100 ml d'un mélange formé de 70 ml acétone et 30 ml eau distillée pendant 48h avec renouvellement du solvant d'extraction après 24h dans le but d'extraire le maximum des phénols. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite à 40°C, nous obtenons la phase aqueuse.

- **Dépigmentation et délipidation**

La phase aqueuse a été lavée trois fois par l'éther de pétrole avec un volume de 20ml afin d'enlever toute trace de lipides et de dépigmenter la préparation.

- **Isolement des phénols**

Une triple extraction liquide-liquide est réalisée par l'acétate d'éthyle, avec un volume de 20ml. Les extraits organiques sont séchés par l'ajout de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) suivi d'une filtration. Le filtrat obtenu a été concentré sous pression réduite à 40°C. Le résidu sec est solubilisé dans 5ml de méthanol puis conservé à +4°C.

V.2.6.3 Analyse quantitative des polyphénols

Le rendement en composés phénolique est déduit du rapport entre la masse d'extrait phénolique brut sèche et la masse initiale de matière végétale sèche utilisée pour la macération (10g).

V.2.6.3.1 Dosage des phénols totaux

a) Principe

L'évaluation des phénols totaux a été réalisée selon la méthode de Singleton en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Le réactif, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm (Bonnaillie *et al.*, 2012)

b) Protocole

100µl de chaque solution diluée de l'acide gallique ou de l'extrait végétal, sont ajoutés à 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu 10% (diluée 10 fois dans l'eau distillée). Deux minutes plus tard, 2ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% sont ajoutés au milieu réactionnel pour favoriser un milieu basique. Ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc.

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

V.2.6.3.2 Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes dans les extraits phénoliques des tourteaux délipidés est basée sur la formation de complexes stables entre les flavonoïdes et l'Aluminium du réactif trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) selon la méthode de (Zhishen *et al.*, 1999).

a) Protocole

1 ml d'échantillon ou standard est ajouté à 1 ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance est lu à 409 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS).

V.2.6.3.3 Evaluation de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH°

Pour le calcul l'évaluation de l'activité antioxydant, la même démarche expérimentale adoptée pour les huiles a été suivie (partie V.2.4.4).

V.2.7 Analyse et activité antioxydante des mélanges des huiles et de leurs extraits phénoliques des huiles.

V.2.7.1 Analyse et activité antioxydante des mélanges des huiles

Etant donné la polarité des composés phénoliques et donc leurs niveaux bas dans l'huile, il a été question de mélanger 10 échantillons huileux pour en avoir 3, selon leur degré de maturité. La composition de ces trois mélanges est donnée dans le tableau 9.

Tableau 9: Compositions des mélanges des huiles.

Stade de maturité	Composant en échantillons d'huile	La couleur des fruits	La masse des huiles groupées (g)
Mélange 1 immature	2D (J)	Jaune impérial	15
	3RN (JR)	Jaune impérial-Rouge	
	1D (J)	Ocre jaune	
Mélange 2 intermédiaires	2D (RF)	Rouge foncé	25 ,4
	1D (N)	Noires	
	1D (RF)	Rouge foncé	
	2D (V)	Vert	
Mélange 3 Mature	2D (N)	Noires	24,44
	3RN (RV)	Rouge-vert	
	3RN (V)	Vert	

NB : Nous avons pris en considération lors du regroupement des échantillons huileux l'aspect de l'huile, la couleur des drupes et la date de la collecte.

Le dosage des tocophérols totaux et évaluation de l'activité antioxydante ont été menés avant et après extraction des composés phénoliques.

V.2.7.1.1 Dosage des tocophérols totaux

Pour le calcul le dosage tocophérols totaux la même démarche expérimentale adoptée pour les huiles a été suivie (partie V.2.4.2).

V.2.7.1.2 Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles par le test DPPH

a) Protocole

Pour les mélanges d'huiles, nous avons suivi le même protocole décrit précédemment pour les extraits phénoliques bruts, avec des modifications concernant l'emploi du butanol pour les dilutions et α -tocophérol (Vitamine E) comme antioxydant de référence.

V.2.7.2 Analyse et activité antioxydante des extraits phénoliques des mélanges des huiles

V.2.7.2.1 Extraction des composés phénolique à partir des huiles

Les étapes importantes pour l'extraction des polyphénols à partir de l'huile sont résumées comme suit :

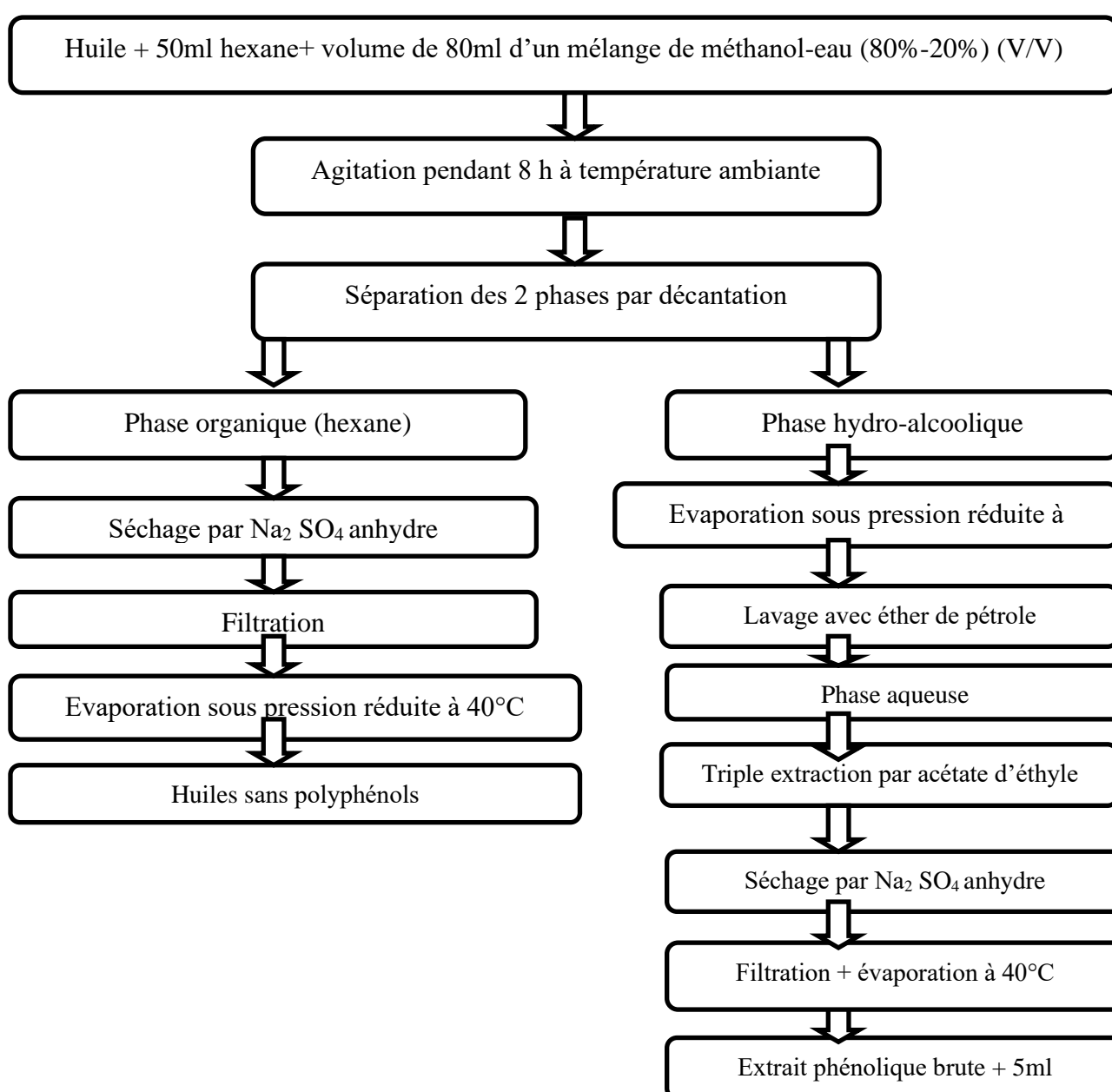


Figure 22: Schéma représentant les étapes d'extraction des polyphénols à partir des huiles.

V.2.7.2.2 Analyse quantitative

Le rendement en polyphénols exprimé par le rapport entre la masse sèches d'extrait phénolique brut et la masse d'huile de départ en gramme.

V.2.7.2.2.1 Dosage des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques à partir des huiles est suivie par un dosage spectrophotométrique par la même méthode précédente de **Singleton (1999)**. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par kilogramme d'huile.

V.2.7.2.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de **Zhishen *et al*(1999)**. (Le même protocole adopté pour les extraits phénoliques bruts extraits à partir des tourteaux). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par kilogramme d'huile.

V.2.7.2.2.3 Evaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques par le piégeage de radical libre DPPH

Pour les extraits phénoliques obtenus à partir des huiles, nous avons suivi les mêmes démarches décrites pour les extraits phénoliques des tourteaux.

V.3 Analyse statistique des données

L'analyse de données (par ACP) est réalisée par le logiciel XL-STAT.2014 pour tous les extraits. Nous avons calculé pour chaque groupe d'échantillons la moyenne et son écart type. Le test de Student est utilisé pour la comparaison des moyennes. Nous avons également calculé le coefficient de corrélation pour certains paramètres par Excel.

V Collecte des fruits du pistachier de l'atlas 2016.




V.4 Matériel





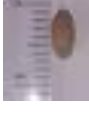





V.4.1 Matériel biologique

V.4.1.1 La récolte des échantillons






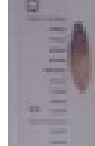


En 2016, les fruits de *Pistacia atlantica* ont été collectés pendant trois mois dans deux endroits différents de Laghouat (Hassi Delaà et Elghaicha). Après séchage à l'air à l'ombre, les échantillons ont été conservés sous température de la chambre pendant trois semaines. Les caractéristiques des échantillons et de la récolte sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10: Description des échantillons 2016.

Arbre	La date et l'heure de la collecte	La région	Données géographiques et caractéristiques climatiques	Code*	Photos
Elghaicha					
A	17/07/20 16 12h30	Elghaicha	Latitude : 33°59'15.80"N Longitude : 2°01'45.39"E Altitude : 1380m T_{min,m.a} : 7,8 °C T_{max,m.a} : 23,4 °C P_{m.a} : 298,3 (mm) Etage bioclimatique : Semi-aride	GA1(VC)	
	21/07/20 16			GA2(JR)	
	21/07/20 16			GA2(V)	

B	17/07/20 16			GB1(VC)		
	21/07/2016 13h20			GB2(JR)		
	21/07/2016 13h20			GB2(V)		
C	17/07/20 16 13h30			GC1(VC)		
	21/07/2016			GC2(JR)		
	21/07/2016			GC2(V)		
A	01/07/20 16 16h50	Hassi-Delaâ	Latitude: 33°25'3"N Longitude : 3°33'1"E Altitude : 758m	HDA1(VC)		

	22/07/20 16 18h15	T_{min,m,a} :13,3 °C T_{max,m,a} :27,1 °C P_{m,a} :252,8 (mm) Etage bioclimatique : Aride	HDA2(JR)		
	14/08/20 16 18h50		HDA3(JR)		
	14/08/20 16 18h50		HDA3(N)		
	08/09/20 16		HDA4 (JRN)		
	08/09/2016		HDA4(N)		
B	01/07/20 16 17h10		HDB1(VC)		
	22/07/20 16 18h15		HDB2(JR)		

14/08/20 16 18h16		HDB3(JRN)		
14/08/20 16 18h16		HDB3(N)		
08/09/2016		HDB4(JN)		
08/09/2016		HDB4(N)		

*: A chaque échantillon est attribué un code comprenant une première lettre indiquant l'initial du nom du site et une lettre indiquant l'arbre et des lettres (entre parenthèse) indiquant la couleur du fruit.

∞ : Les caractéristiques géographiques sont obtenues à l'aide de *Google Earth* 2018.

Exemple :

- **GA2(JR):** G : **Elghaicha**, A : arbre A ,2 :2^{ème} collecte, (JR) : Jaune Rouge.
- **HDB4(N) :** HD : **Hassi-Delaà**, B : arbre B ,4 :4^{ème} collecte, (N) : Noire.

V.4.2 Produits chimiques

La liste des produits chimiques utilisés est présentée en annexe 1.

V.4.3 Matériel et équipements

V.5 Méthodes

La démarche expérimentale est celle pour les échantillons 2015.

Partie 3 :

Résultats et Discussion

Chapitre VI : Collecte des fruits du pistachier de l’atlas 2015,2016

VI Collecte des fruits du pistachier de l’atlas 2015

VI.1 Teneur en huiles des fruits

Le rendement d’extraction des lipides et l’aspect des extraits sont mentionnés dans le tableau 11. Les extrais huileux des fruits jaunes (considérés comme immatures) de *Pistacia atlantica* ont une couleur verte foncée associée à une odeur très agréable. Par contre, l’huile des fruits verts et noirs (considérés comme matures) ont une couleur jaune claire avec une odeur agréable et très limpide. Tous les extraits des fruits matures ont un aspect liquide à température ambiante, par contre les extraits huileux des fruits immatures sont partiellement semi solides. Cette observation pourrait être expliquée par la présence des cires.

La teneur en huile (allant de 7,8 % à 41,84%) varie considérablement selon notamment la couleur des fruits qui indique en grande partie leur degré de maturité (Figure 23). La date de la collecte est un autre indicateur du stade de maturation à prendre en considération. Ainsi, les rendements d'extraction les plus faibles sont obtenus pour les fruits de couleur jaune et ils augmentent au fur et à mesure que la couleur se transforme en vert ou noir.

Nos résultats pour les fruits matures sont légèrement en baisse par rapport à ceux obtenus par Yousfi et ses collaborateurs (**Yousfi et al., 2003**) où un rendement d'extraction de 52% était atteint pour les fruits matures de couleur verte. Cette légère différence pourrait être expliquée par les conditions climatiques et la période de récolte.

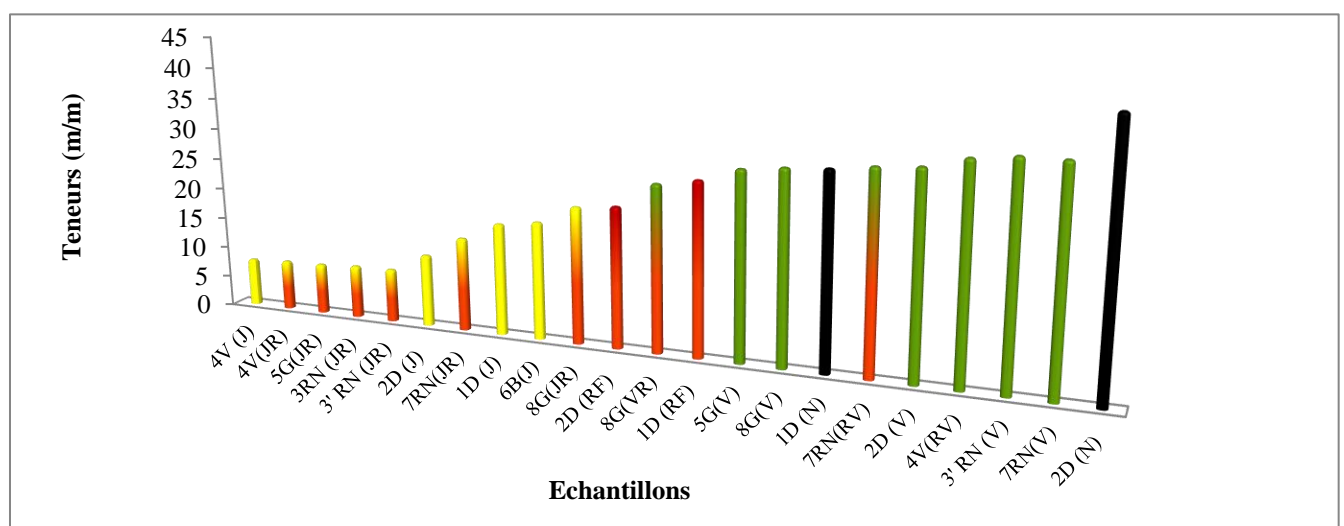










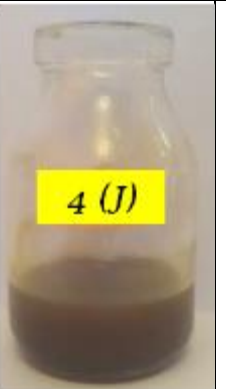
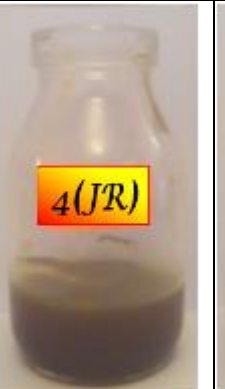
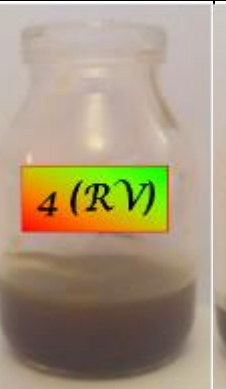

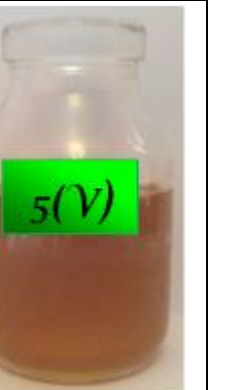






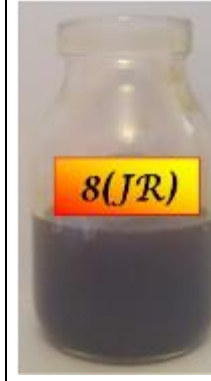


Figure 23 : Variation du rendement d’extraction des huiles à partir des fruits du *Pistacia atlantica* selon la couleur de l’enveloppe externe du fruit.

Remarque : La couleur de la colonne correspond à la couleur des graines du fruit.

Tableau 11: Les rendements, les couleurs d'huile et les couleurs des fruits correspondants des échantillons (collecte 2015).

Échantillons	1			2				3
	D(J)	D(RF)	D(N)	D(J)	D(RF)	D(V)	D(N)	RN(JR)
Couleur de l'huile								
Rendement % (m/m)	18,1	27,8	31,1	11,72	22,64	32,35	41,84	8,6

Échantillons	3'		4			5	
	RN(JR)	RN(V)	V(J)	V(JR)	V(RV)	G(JR)	G(V)
Couleur de l'huile							
Rendement % (m/m)	8,7	34,85	7,8	8,1	34,1	8,22	30

Échantillons	6	7			8		
	B(J)	RN(JR)	RN(RV)	RN(V)	G(JR)	G(VR)	G(V)
Couleur de l'huile							
Rendement % (m/m)	19	15,15	31,9	34,85	22	26,7	30,7

VI.2 Détermination de la composition en acides gras des huiles par CPG

Les résultats de l'analyse chromatographique de nos échantillons sont récapitulés dans le tableau 12 où les proportions relatives des différents acides gras constitutifs sont indiquées. Quelques chromatogrammes d'échantillons représentatifs sont présentés en Annexe 5.

Nous notons la présence, à des proportions très variées, de neuf acides gras habituellement rencontrés dans le règne végétal. Il s'agit en effet des acides palmitique, oléique, et linoléique, fortement représentés, et à des proportions faibles, des acides myristique, hypogéique, stéarique, linoléique, arachidique et gondoïque.

Les acides gras saturés dans nos huiles sont les acides myristique, palmitique, stéarique et arachidique dont les proportions varient de 17,65 % à 26,95% pour les huiles des fruits matures et de 12,62 % à 20,13% pour les huiles des fruits immatures. L'acide palmitique étant le composé majoritaire parmi les acides gras saturés. Il représente entre 10,34 % et 18,79 % pour les fruits immatures, et entre 15,85% et 25,22 % pour les fruits matures. L'acide stéarique est détecté dans toutes les huiles mais avec des proportions plus faibles ne dépassant pas 2,19%. L'acide myristique et arachidique sont aussi détectés dans la majorité des huiles mais avec des proportions très faibles ne dépassant pas respectivement 1,24 % et 0,38 %. Concernant les acides gras insaturés, les acides hypogéique, oléique, linoléique et linoléique sont présents dans toutes les huiles. Ils représentent un pourcentage total de 73,02% à 81,83 % dans les huiles des fruits matures, et de 79,83 % à 87,43 % dans les huiles des fruits immatures. Ils sont représentés essentiellement par l'acide oléique (C 18 :1), et l'acide linoléique (18 :2).

Notre rapport acides gras insaturés/acides gras saturés est légèrement élevé pour les huiles des fruits immatures (variant de 3,97 à 6,92) par rapport aux huiles issues des fruits matures, dont le rapport varie de 2,70 à 4,52.

Globalement nos résultats riment parfaitement avec ceux rapportés **par Guenane (2017)** pour les huiles des fruits de *Pistacia atlantica*. Ils sont également comparables avec des études précédentes sur les huiles des fruits de *Pistacia lentiscus* (**Charef et al., 2008 ; Trabelsi et al., 2012**). Ces résultats nous permettent de classer l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* comme huile végétale alimentaire de type oléo-linoléique.

Tableau 12: Composition en acides gras des huiles brutes des fruits étudiés 2015.

Acides gras	Échantillons%																					
	1D (J)	1D (RF)	1D (N)	2D (J)	2D (RF)	2D (V)	2D (N)	3RN (JR)	3'RN (JR)	3'RN (V)	4V (J)	4V (JR)	4V (RV)	5G (JR)	5G (V)	6B (J)	7RN (JR)	7RN (RV)	7RN (V)	8G (JR)	8G (VR)	8G (V)
C14 :0	0,07	0,05	0,09	0,15	0,07	0,07	0,06	0,13	0,14	0,06	0,09	0,12	0,08	0,14	0,08	0,09	0,11	0,08	0,11	0,10	0,09	1,24
C16 :0	12,38	15,96	17,24	12,64	18,76	15,85	20,88	12,64	15,08	20,22	18,79	16,85	21,81	15,66	21,44	10,34	14,81	20,11	25,22	11,26	16,54	18,82
C16 :1ω9	0,31	0,33	0,42	2,13	4,60	2,48	5,89	0,36	0,47	0,53	0,77	2,88	3,92	0,65	1,79	0,53	0,35	0,38	0,54	0,35	0,68	0,70
C18 :0	1,94	2,13	1,56	1,08	1,13	1,73	1,21	2,18	1,39	1,92	1,25	1,58	1,58	1,63	1,04	2,19	1,83	1,80	1,62	2,00	1,50	1,32
C18 :1ω9	51,99	55,37	53,63	46,39	55,49	57,25	53,04	54,12	50,89	59,34	49,46	48,51	39,57	47,44	46,86	61,45	53,44	55,98	48,15	47,40	50,18	51,09
C18 : 2 ω6	32,39	25,25	25,89	36,52	19,00	21,73	17,88	29,53	30,84	17,15	28,75	28,61	31,57	33,16	24,96	24,53	27,17	20,71	23,42	37,71	30,24	25,86
C 18 :3ω3	0,42	0,53	1,13	0,88	0,92	0,55	0,68	0,57	0,81	0,46	0,85	0,96	1,09	1,09	3,78	0,45	0,58	0,49	0,72	0,57	0,73	0,70
C20 :0	0,08	Trace	-	Trace	Trace	Trace	Trace	0,07	0,05	Trace	-	0,11	0,07	Trace	Trace	Trace	1,33	0,08	Trace	0,08	Trace	Trace
C20 :1 w9	0,34	0,33	-	-	-	0,24	0,23	0,35	0,19	0,27	-	0,27	0,19	0,14	trace	0,38	0,31	0,28	0,19	0,32	trace	0,17
ΣAGS	14,47	18,14	18,89	13,87	19,96	17,65	22,15	15,02	16,66	22,2	20,13	18,66	23,54	17,43	22,56	12,62	18,08	22,07	26,95	13,44	18,13	21,38
AGMI	52,64	56,03	54,05	48,52	60,09	57,49	59,16	54,83	51,55	60,14	50,23	51,66	43,68	48,23	48,65	62,36	54,1	56,64	48,88	48,07	50,86	51,96
AGPI	32,81	25,78	27,02	37,4	19,92	22,28	18,56	30,1	31,65	17,61	29,6	29,57	32,66	34,25	28,74	24,98	27,75	21,2	24,14	38,28	30,97	26,56
ΣAGI	85,45	81,81	81,07	85,92	80,01	79,77	77,72	84,93	83,2	77,75	79,83	81,23	76,34	82,48	77,39	87,34	81,85	77,84	73,02	86,35	81,83	78,52
$\frac{\Sigma AGI}{\Sigma AGS}$	5,91	4,51	4,29	6,19	4,01	4,52	3,51	5,65	4,99	3,50	3,97	4,35	3,24	4,73	3,43	6,92	4,53	3,53	2,71	6,42	4,51	3,67
Moyenne de $\frac{\Sigma AGI}{\Sigma AGS}$	Échantillons immatures 5,37 ± 0,93						Échantillons de maturité intermédiaire 4,26 ± 0,25						Échantillons matures 3,69 ± 0,55									

* p ≤ 0,05 (comparé à des échantillons matures),

VI.3 Teneur des stérols totaux dans des huiles

La teneur en stérols totaux dans les échantillons d'huile a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du cholestérol (annexe 5). Elle est exprimée en milligrammes équivalents de cholestérol par gramme d'huile.

Les résultats obtenus, moyenne de trois essais, montrent que les huiles étudiées contiennent des quantités très importantes et variables en stérols (Tableau 13).

Tableau 13: Teneur en stérols totaux dans les huiles de *Pistacia atlantica* 2015.

Echantillons immatures (selon la couleur)	Teneur (mg/g)	Echantillon intermédiaire (selon la couleur)	Teneur (mg/g)	Echantillons matures (selon la couleur)	Teneur (mg/g)
1D(J)	130,24 ± 0,93	2D(RF)	88,67 ± 0,55	4V(RV)	29,22 ± 0,15
2D(J)	145,42 ± 0,27	1D(RF)	94,53 ± 0,38	5G(V)	40,44 ± 0,57
4V(JR)	207,97 ± 0,44	-	-	2D(N)	65,55 ± 0,9
5G(JR)	248,22 ± 1,43	-	-	8G(V)	67,47 ± 0,57
4V(J)	250,52 ± 2,01	-	-	7RN(V)	69,77 ± 0,41
6B(J)	267,97 ± 0,58	-	-	2D(V)	78,89 ± 0,17
3'RN(JR)	270,65 ± 0,86	-	-	1D(N)	80,5 ± 0,31
8G(JR)	292,51 ± 0,3	-	-	7RN(RV)	100,44 ± 0,2
3RN(JR)	338,31 ± 0,45	-	-	8G(VR)	100,82 ± 0,16
7RN(JR)	369,18 ± 0,2	-	-	3'RN(V)	135,32 ± 0,25
Moyenne	252,1±75,69	-	-	Moyenne	76,8424±30,60

Nous remarquons que la teneur en stérols totaux est très variable avec une étendue large de 339,96 mg/g d'huile pour l'ensemble des échantillons. Cette dernière est de 238,94mg/g pour les échantillons immatures et de 106,09 mg/g pour les échantillons matures.

Il en ressort que les fruits immatures (jaunes ou rouge) sont significativement plus riches en stérols par rapport aux fruits matures ($p < 0,001$).

Nous notons avec intérêt une teneur en stérols substantiellement élevée pour l'échantillon 7RN(JR) immature par rapport à l'échantillon 7RN(V) mature, issus du même arbre et collectés à la même date. La même observation est valable pour les échantillons 3RN(JR) et 3'RN(JR), issus du même arbre mais collectés à deux dates différentes. Ceci montre clairement l'importance de la date de collecte dont l'effet sur le degré de maturation

de la drupe n'est à négliger. D'une manière générale, les huiles extraites des fruits de l'arbre 3RN et l'arbre 7RN sont les plus riches en stérols totaux.

Les échantillons immatures collectés à Dayet Ennous (1DJ et 2DJ), se montrent moins riches en stérols par rapport à leurs paires. Ces valeurs pourraient être dues de l'effet anthropique probable dans la variation de la composition biochimique de l'arbre.

L'échantillon 8G(V), bien qu'il soit de couleur verte-rouge et collecté en août semble contenir une teneur assez importante en stérols par rapport aux fruits matures.

L'échantillon 5G(V), bien qu'il soit de couleur verte et collecté à la fin du mois de septembre c'est-à-dire à maturité complète, semble contenir une teneur assez importante en stérols par rapport aux fruits matures ordinairement récoltés en cette période (**Maamri, 2008**). Ce cas particulier pourrait être expliqué en partie par l'effet de l'altitude (1300 m).

Globalement, il ressort de nos résultats, comparés à ceux rapportés par (**Maamri, 2008 ; Guenane, 2017**), que nos échantillons collectés très précocement (pour la première fois en juillet) sont très riches en stérols totaux, ce qui indique la très grande variation de leur teneur au cours de la maturation des fruits. Ce résultat important mérite une valorisation d'autant plus que nombreuses publications ont rapporté de multiples activités biologiques des phytostérols (**Iserin, 2001 ; Dweck, 2002 ; Corbiere, 2003 ; Gul et Amar, 2006 ; Luo et al., 2015**). Il ne faut pas omettre l'effet de la variation de saisons des collectes (entre 2008 et 2015).

Il est à relever que notre étude a montré la richesse en stérols des drupes de *Pistacia atlantica*, notamment à des stades très précoces de maturation, par rapport à des huiles de fruits issus d'autres espèces telles que *Pistacia vera* (1,18 mg/g) (**Ghalem et Bnhassani, 2007**) et l'huile de *Argania spinosa* (5,91mg/g) (**Hamia, 2007**).

Afin de d'identifier la composition en stérols individuels de nos huiles, une analyse par CPG est nécessaire.

VI.4 Teneur des tocophérols totaux dans des huiles

La teneur en tocophérol totaux dans les échantillons d'huiles a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (annexe 5). Elle est exprimée en milligrammes équivalents de vitamine E par 100 grammes d'huile.

Les teneurs en tocophérols totaux, moyennes de trois essais, présentées dans le tableau 14, sont extrêmement élevées pour l'ensemble des échantillons par rapport aux études précédentes pour la même espèce **Guenane et al., 2015**. Néanmoins, une différence significative ($p < 0,05$) est décelée entre les échantillons de couleur jaune ou jaune rouge considérés comme immatures et ceux de couleur verte ou noire considérés comme matures.

Tableau 14: Teneur en tocophérols totaux dans les huiles de *Pistacia atlantica* 2015.

Echantillons Immatures	Teneur (mg/100g)	Echantillon intermédiaire	Teneur (mg/100g)	Echantillons matures	Teneur (mg/100g)
5G(JR)	200,03 ± 0,01	1D (RF)	425,55 ± 0,8	5G(V)	192,49 ± 0,67
6B(J)	502,14 ± 0,4	2D (RF)	494,26 ± 0,82	8G(V)	197,98 ± 0,32
1D (J)	505,02 ± 0,6	-	-	1D (N)	214,55 ± 0,41
3' RN (JR)	519,27 ± 0,1	-	-	8G(VR)	301,77 ± 0,54
8G(JR)	702,45 ± 0,46	-	-	3' RN (V)	309,09 ± 0,82
2D (J)	702,59 ± 0,5	-	-	7RN(V)	391,51 ± 0,51
3RN (JR)	804,8 ± 0,67	-	-	2D (N)	394,31 ± 0,27
4V(JR)	808,01 ± 0,63	-	-	2D (V)	481,72 ± 0,5
4V (J)	825,48 ± 0,81	-	-	7RN(RV)	482,28 ± 0,49
7RN(JR)	979,62 ± 0,92	-	-	4V(RV)	550,43 ± 0,03
Moyenne	654,941±225,11	Moyenne	459,905±48,59	Moyenne	351,613±128,65

Nos valeurs sont comprises entre 200,03 et 979,62 mg/100g pour les fruits immatures et entre 192,49 et 550,43 mg/100g pour les fruits matures.

Les échantillons de couleur rouge foncé (considérés comme drupes à maturité intermédiaire) ont des valeurs pratiquement intermédiaires entre celles des échantillons matures et immatures.

La même constatation indiquée pour les échantillons 7RN et 3RN concernant, respectivement, l'importance de la couleur de la drupe et la date de collecte sur la quantité en stérols est valable pour la teneur en tocophérols totaux (tableau 14).

Il est également à noter que les échantillons de l'arbre 5G d'Elghaicha (verts et jaune-rouges), se révèlent les moins riches en tocophérols avec des valeurs très proches (192,49 et 200,03 mg/100g). Cette distinction qui mérite une étude complémentaire pourrait être due encore une fois à l'effet de l'altitude.

La comparaison de nos résultats à ceux rapportés par la littérature pour d'autres huiles montre que les huiles des fruits de *Pistacia atlantica* particulièrement aux stades très précoces de maturation sont extrêmement riches en tocophérols. Les données publiées concernent l'huile d'olive et l'huile de tournesol (respectivement, 20 et 67 mg/100g **karleskind, 1992**), l'huile des fruits noirs (matures) de et de fruits rouges (immatures) de *Pistacia lentiscus* (respectivement, 15,24 et 58,5 mg/100g. **Charef, 2011**) et l'huile d'*Argania spinosa* (102,7mg/100g, **Hamia, 2007**).

VI.5 Analyse des tocophérols des huiles par CLHP

L'identification des tocophérols (α , β , γ , δ) par CLHP (colonne polaire) a été réalisée pour 9 échantillons immatures, 5 échantillons intermédiaires et 6 échantillons matures.

Les différents isomères ont été identifiés par comparaison des temps rétentions (t_R) avec ceux des standards de tocophérols commerciaux (annexe 4). Les résultats sont regroupés dans le tableau 15.

L'analyse des tocophérols des différents échantillons d'huile des fruits de Pistachier de l'Atlas par CLHP fait apparaître une très forte prédominance des isomères α -Toc et γ -Toc et des traces de l'isomère δ -Toc dans tous des échantillons. Les autres pics observés correspondraient plus probablement aux tocotriénols, lesquels sont plus polaires que les tocophérols. Ils ont été identifiés ainsi sur la base de la comparaison de nos profils avec ceux obtenus dans des conditions similaires et rapportés dans la littérature (**Genane et al., 2017; Kamal-Eldin et al., 2000; Nielsen et Hansen, 2008**). Quelques chromatogramme représentatifs sont exposés en Annexe 4 .

Tableau 15: Pourcentage des isomères α et γ tocophérols (%) dans les huiles des fruits de *P.atlantica* 2015.

Echantillons	α -Toc	γ -Toc
1D (J)	57,66	42,34
1D (RF)	44,48	55,52
2D (J)	76,40	23,6
2D (RF)	65,89	34,11
2D (V)	61,81	38,19
2D (N)	16,10	83,9
3RN (JR)	70,31	29,8
3' RN (JR)	72,92	27,08
3' RN (V)	24,85	75,15
4V (J)	85,18	14,81
4V(JR)	85,06	14,94
4V(RV)	42,25	57,75
5G(JR)	61,51	38,49
5G(V)	30,96	69,04
6B(J)	52,01	47,99
7RN(JR)	70,29	29,71
7RN(RV)	51,59	48,41
7RN(V)	38,39	61,61
8G(JR)	82,14	17,86
8G(VR)	67,21	32,79
8G(V)	66,69	33,31
Moyenne immature	71,35 \pm 10,88	28,65 \pm 10,88
Moyenne maturité intermédiaire	55,18 \pm 10,71	44,82 \pm 10,71
Moyenne mature	44,43 \pm 17,56	55,57 \pm 17,56

Nous remarquons que la proportion de l'isomère α -Toc semble être la plus dominante dans les fruits immatures et celle de l'isomère γ -Toc est la prononcée dans les fruits matures (71,53 \pm 10,88 contre 44,43 \pm 17,56% pour α -Toc, $p \leq 0,005$ et 28,65 \pm 10,88 contre 55,57 \pm 17,56% pour γ -Toc). Nos résultats confirment en partie ceux publiés par **Guenane et al., 2015** pour le *Pistacia atlantica*. Les différences en proportions des isomères et notamment α -Toc pourraient être dues, d'une part, à la collecte très précoces de quelques échantillons et, de l'autre part, à l'impact de l'altitude de l'arbre situé à 1380 m d'altitude (82,4%), ainsi qu'à celui de la localisation urbaine de l'arbre 4V (85%).

Un coefficient de corrélation positif appréciable (0,62) a été obtenu entre la proportion en α -Toc et celle de l'acide linoléique. Cette valeur, bien qu'elle ne concerne que la proportion relative, pourrait indiquer la dépendance du degré d'insaturation des acides gras de l' α -Toc. Le calcul de la concentration exacte de l' α -Toc mettrait en exergue cette relation par une valeur élevée du coefficient de corrélation.

VI.6 L'évaluation du pouvoir antioxydant des huiles des fruits des *Pistacia atlantica*

VI.6.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par le calcul de la valeur d'IC50. Nous avons utilisé la Vitamine E commerciale (α -tocophérol) comme antioxydant de référence pour la comparaison. Pour cela, nous avons tracé le graphe représentant le pourcentage d'inhibition (I%) du DPPH en fonction de la concentration de la vitamine E (annexe 5).

Nous avons procédé de la même manière pour l'ensemble des échantillons (quelques graphes représentatifs sont mentionnés en annexe 5. Les valeurs de l'EC50 déterminées sont résumées dans le tableau 16.

Tableau 16: Les valeurs de l'EC50 calculé pour les différents extraits lipidiques des fruits de 2015 de maturité différente lors de test DPPH.

Standard	EC ₅₀ (mg/ml)	Echantillons immatures	EC ₅₀ (mg/ml)	Echantillons intermédiaire	EC ₅₀ (mg/ml)	Echantillons matures	EC ₅₀ (mg/ml)
Vit E	0,0264	2D(J)	2,75	2D(RF)	5,39	7RN(RV)	14,01
		7RN(JR)	4,90	1D(RF)	28,05	8G(VR)	14,62
		6B(J)	5,04	-	-	2D(V)	15,17
		3' RN (JR)	5,70	-	-	7RN(V)	20,09
		8G(JR)	5,82	-	-	4V(RV)	21,42
		4V(J)	6,46	-	-	2D(N)	23,89
		3RN(JR)	8,62	-	-	8G(V)	26,18
		1D(J)	11,13	-	-	1D(N)	30,09
		4V(JR)	12,47	-	-	3'RN(V)	31,99
		Moyenne	6,99	-	-	Moyenne	21,94
		Ecartype	3,15	-	-	Ecartype	6,66
		5G(JR)*	44,4	-	-	5G(V)*	74,1

*: Résultats émergents, ces valeurs n'ont pas été incluses dans le calcul des moyennes.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'huile extraite des fruits immatures a une activité antioxydante significativement plus importante par rapport à celle obtenue à partir des drupes matures (7,8±3,61 contre 24,44±6,94 mg/ml, $p < 0,001$).

La variation de l'EC50 pour des drupes issues du même arbre et de la même collecte mais ayant des couleurs différentes est clairement établie (Figure 24). Ainsi, l'extrait huileux des fruits jaunes étant le plus actif (EC₅₀ : 2,7 mg/ml). Par contre, celui des fruits

noirs (EC_{50} : 23,8 mg/ml) est le moins actif. Ces observations indiquent que la couleur du fruit est un bon indicateur du degré de maturité des fruits mais il n'en est pas le seul.

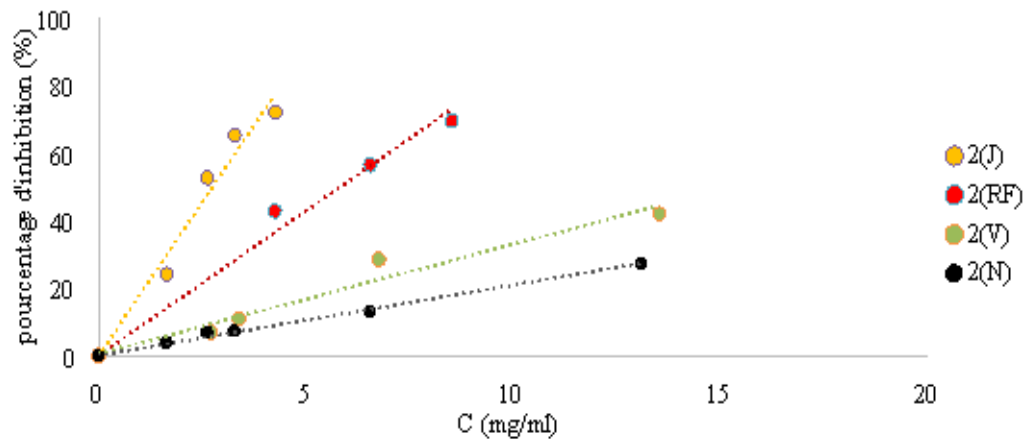


Figure 24: Graphe représentant l'activité antioxydante des huiles de l'arbre 2 récolté en juillet 2015, par le test du DPPH.

La comparaison de nos valeurs de l' EC_{50} par rapport à celles obtenues par **Guenane et al., 2015** montre que les nôtres sont plus petites et par conséquent nos extraits sont les plus antioxydants. Cette observation va de pair avec celles concernant les stérols et les tocophérols totaux et indique que plus les fruits sont collectés précocement (les nôtres en juillet) plus ils sont actifs.

Il est capital de relever que les drupes récoltées à partir de l'arbre d'Elghaicha se distinguent. En effet, leurs extraits huileux se montrent les moins actifs alors qu'ils sont les riches en tocophérols. Cette exception pourrait être expliquée par l'échantillon réduit (deux arbres), les facteurs génétiques propres à chaque arbre, la concentration des isomères de tocophérols et sans doute, l'effet de l'altitude, du climat et du sol.

VI.6.2 Relation entre la teneur en tocophérols des huiles et le pouvoir anti-oxydant

Nous avons essayé de trouver une relation entre les teneurs en tocophérols totaux et l' EC_{50} pour l'ensemble de la série d'étude en traçant une régression linéaire reliant ces deux paramètres avec calcul du coefficient de corrélation r (Figure 25).

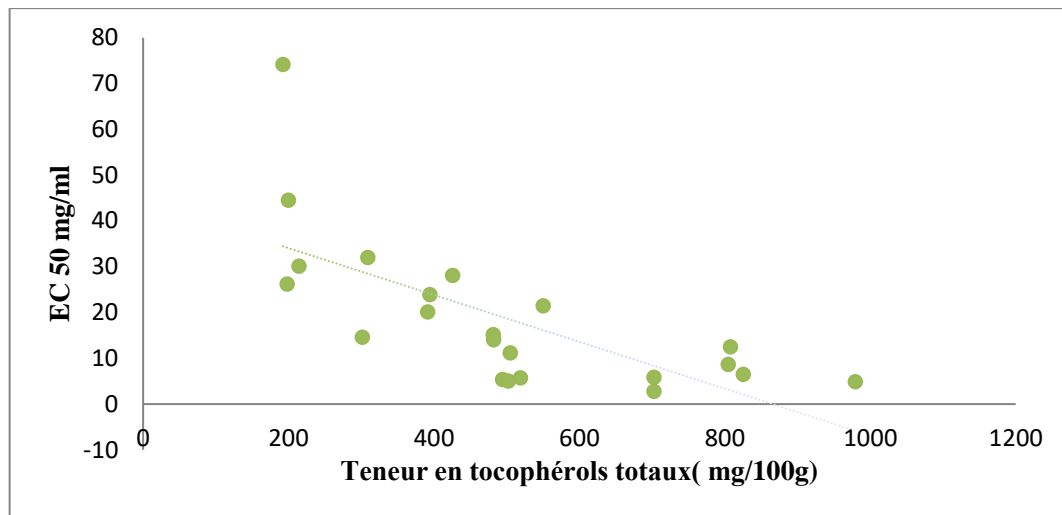


Figure 25: Régression linéaire de la corrélation entre le taux de tocophérols et l’EC50 des extraits huileux.

Le coefficient de corrélation obtenue est -0,70 (corrélation négative). C’est une valeur assez importante montrant l’existence d’une relation entre le taux de tocophérols et l’EC50. Ainsi, plus l’extrait est riche en tocophérol, plus son pouvoir antioxydant est important.

VI.7 Analyse de données concernant les paramètres étudiés

L'analyse des composantes principales a abouti aux résultats mentionnés dans le tableau 17 et la figure 26. La matrice de corrélation de Pearson indique, qu'en plus de la corrélation négative significative obtenue entre la teneur en tocophérols et l'EC50, il y a une très forte corrélation négative ($r= -0,70$) entre le rendement d'extraction huileuse et la teneur en stérols totaux signifiant que plus le rendement augment moins l'extrait est riche en stérols.

Tableau 17: Matrice de corrélation de Pearson de 2015.

Variabes	Tocophérol	Stérol	Rendement	EC50
Tocophérol	1	0,66	-0,57	-0,70
Stérol		1	-0,77	-0,46
Rendement			1	0,38
EC50				1

La distribution des différents échantillons par rapport aux quatre paramètres étudiés montre leur caractère distinctif (Figure 26). Ainsi, deux groupes distincts sont obtenus. Le premier englobe les échantillons de couleur jaune et jaune rouge (immatures) caractérisé

par un rendement faible mais une richesse en stérols et tocophérols totaux associée à une très forte activité antioxydante. Le deuxième est dominé largement par les fruits matures de couleur verte ou noire où le rendement d'extraction est le plus élevé mais avec des niveaux en tocophérols et stérols totaux largement inférieurs. Ils sont également caractérisés par des EC50 élevés d'où leur faible activité antioxydante.

Partant de ces résultats, nous pouvons considérer que les paramètres testés comme indicateurs du degré de maturités des drupes

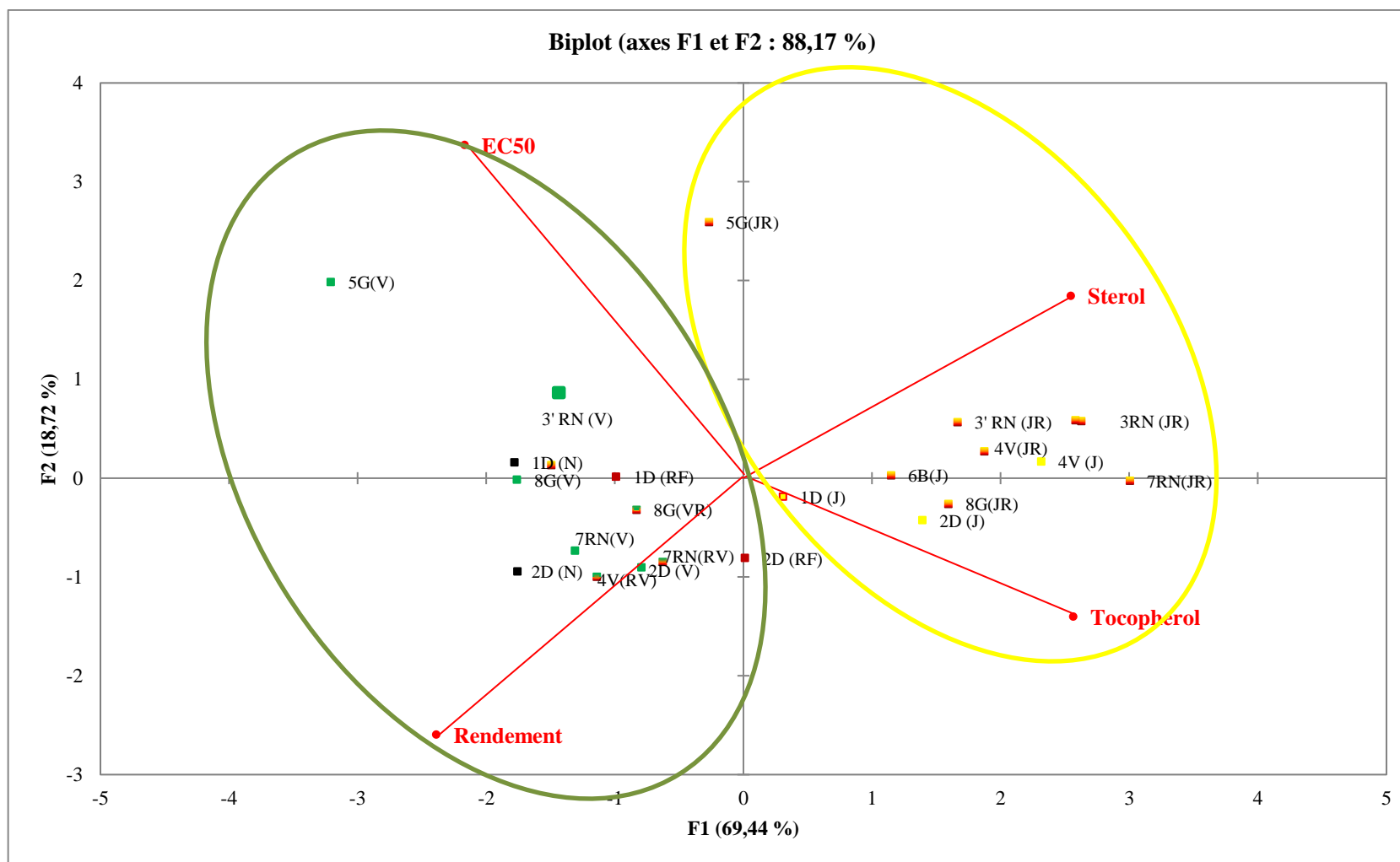


Figure 26: Représentation graphique de la distribution des échantillons en fonction des 4 variables différente.

VI.8 Analyse quantitative des fractions insaponifiables

Sur la base des résultats obtenus pour les stérols et tocophérols, nous nous sommes intéressés à l'étude de la fraction insaponifiable afin de montrer un éventuel caractère distinctif pour ses composants et de voir l'effet du degré de maturation sur sa composition et son activité antioxydante. Il faut rappeler que c'est pour la première fois que ce volet de l'étude est entamé.

VI.8.1 Taux de la fraction insaponifiable des huiles

Le taux de la fraction insaponifiable des huiles végétales est, généralement, faible. Il revêt une importance capitale à cause des composés essentiels (tocophérols, stérols, pigments, tri terpènes, ...).

Concernant nos échantillons, les taux en insaponifiables les plus élevés obtenus sont 24,88 %, 11,42% et 8,61%, 8,2%, 7,97 % et 7,73 % pour respectivement les échantillons 5 G(R), 8(GR), 3'RN(JR), 8G(VR) ,4V(JR) et 7RN(JR) (Figure 27). Les autres échantillons ont des valeurs comprises entre 0,9 % et 7,11 %.

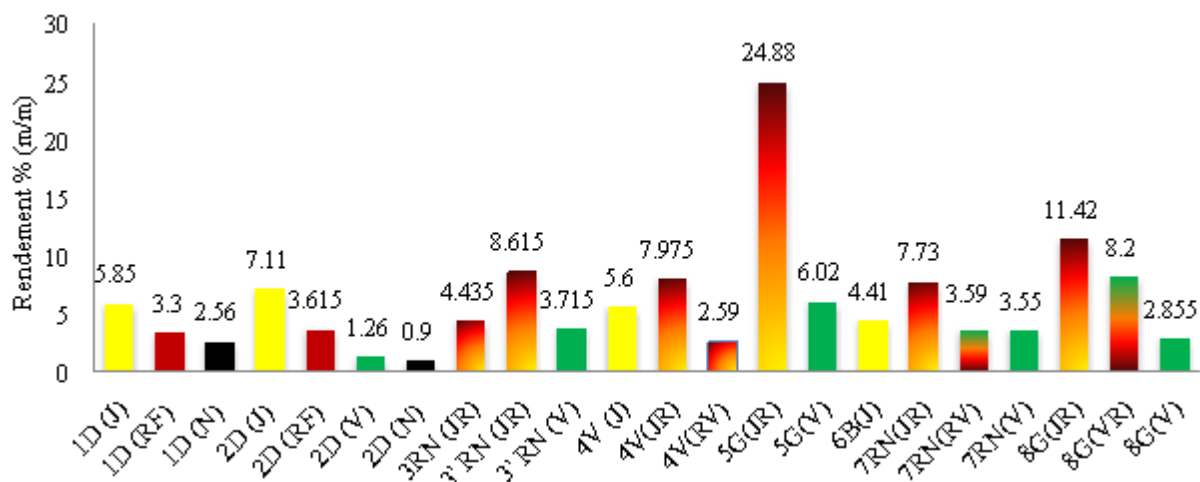


Figure 27: Taux de la fraction insaponifiable des huiles de fruits de *Pistacia atlantica*.

Nos résultats indiquent globalement une variation du taux de la fraction insaponifiable selon la couleur des fruits et partant leur degré de maturité. Il semble que ce taux diminue avec la maturation des drupes. Ces données sont comparables à celles obtenues par **Yousfi et al., (2003)** et **Guenane et al., 2017**. Il faut noter que les échantillons d'Elghaicha se montrent très riches en fraction insaponifiable. Ceci pourrait être due à des facteurs environnementaux.

VI.8.2 Teneur des stérols et tocophérols totaux dans les insaponifiables

Le tableau 18 résume les teneurs en stérols et en tocophérols totaux au niveau de la fraction insaponifiable. Les résultats sont exprimés respectivement en milligrammes équivalents de cholestérol et en milligrammes équivalents de vitamine E par gramme de matières insaponifiable.

Tableau 18: Teneurs en stérols et en tocophérols totaux dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de *Pistacia atlantica* 2015.

Echantillons immatures	Teneur(mg/g-insp)	Echantillons Matures	Teneur(mg/g-insp)
Stérols			
2D(RF)	81,92 ± 0,54	3'RN(V)	78,94 ± 0,41
1D (RF)	90,44 ± 0,31	1D (N)	82,4 ± 0,52
1D (J)	97,22 ± 0,24	4V(RV)	112,12 ± 0,39
2D(J)	98,26 ± 0,90	2D(N)	169,31 ± 0,14
4V(J)	141,7 ± 0,07	8G(V)	187,5 ± 0,07
3'RN(JR)	148,34 ± 0,09	2D(V)	225,9 ± 0,22
4V(JR)	154,66 ± 0,5	8G(VR)	230,02 ± 0,4
7RN(JR)	256,46 ± 0,92	7RN(RV)	250,14 ± 0,25
5G(JR)	271,05 ± 0,34	5G(V)	261,9 ± 0,32
3RN(JR)	287,52 ± 0,26	7RN(V)	358,7 ± 0,41
8G(JR)	360,12 ± 0,47	-	-
6B(J)	375 ± 0,26	-	-
Tocophérols			
7RN(JR)	5,6 ± 0,15	5G(V)	5,55 ± 0,11
4V(J)	7,6 ± 0,64	8G(VR)	8,75 ± 0,3
4V(JR)	7,75 ± 0,61	2D(N)	10,03 ± 0,51
5G(JR)	4,55 ± 0,78	7RN(RV)	10,43 ± 0,96
2D(J)	6,61 ± 0,54	7RN(V)	11,52 ± 0,9
6B(J)	7,48 ± 0,29	3'RN(V)	11,95 ± 0,43
1D (J)	8,07 ± 0,09	2D(V)	12,18 ± 0,29
1D (RF)	8,12 ± 0,18	1D (N)	12,88 ± 0,45
8G(JR)	8,28 ± 0,34	8G(V)	16,85 ± 0,6
2D(RF)	8,33 ± 0,30	4V(RV)	19,13 ± 0,27
3'RN(JR)	12,16 ± 0,31	-	-
3RN(JR)	28,05 ± 0,94	-	-

D'une manière globale, nous ne constatons pas de variation significative de ces deux paramètres selon la couleur des fruits ou la date de collecte encore moins selon l'emplacement géographique. Cette étude très préliminaire devrait être complétée ultérieurement.

Nous avons déterminé la proportion de l'ensemble stérols/tocophérols par rapport à la matière insaponifiable (Tableau 19) afin de déceler une éventuelle variation.

Tableau 19: Pourcentages des stérols et tocophérols dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de *Pistacia atlantica* 2015.

Echantillon	Taux Stérols/Tocophérols (%)	Autre (%)
1D (J)	12,05	87,95
1D (RF)	11,14	88,86
1D (N)	6,4	93,6
2D (J)	14,9	85,1
2D (RF)	9,83	90,17
2D (V)	18,55	81,45
2D (N)	16,88	83,12
3RN (JR)	10,25	89,75
3' RN (JR)	12,2	87,8
3' RN (V)	6,61	93,39
4V (J)	18,64	81,36
4V(JR)	19,96	80,04
4V(RV)	5,86	94,14
5G(JR)	59,57	40,43
5G(V)	47,19	52,81
6B(J)	50,13	49,87
7RN(JR)	45,8	54,2
7RN(RV)	23,98	76,02
7RN(V)	31,14	68,86
8G(JR)	43,49	56,51
8G(VR)	26,29	73,71
8G(V)	11,13	88,87

Nous remarquons une variation selon la couleur des fruits au niveau des arbres (2D. 3RN. 4V et 7RN), mais elle ne varie dans le même sens. Ceci pourrait refléter l'effet de facteurs propres à chaque arbre qui méritent des investigations plus approfondies. Les autres constituants de la fraction insaponifiable (pigments, hydrocarbures, alcools tri terpéniques,...) sembleraient être majoritaires. Ces constatations devraient être confirmées ou infirmées par des études complémentaires plus poussées.

VI.8.3 Evaluation du pouvoir antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de *Pistacia atlantica* par le test DPPH

Les graphes représentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de la matière insaponifiable pour les vingt-deux échantillons sont indiqués dans les figures respectives 28, 29, 30, 31, 32,33 et 34.

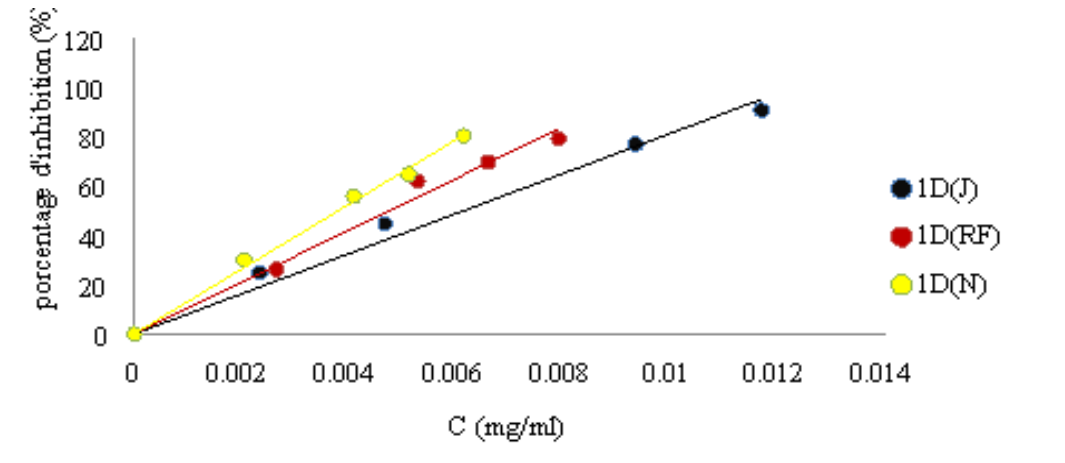


Figure 28: Graphe représentant l'activité antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 1D (même collecte).

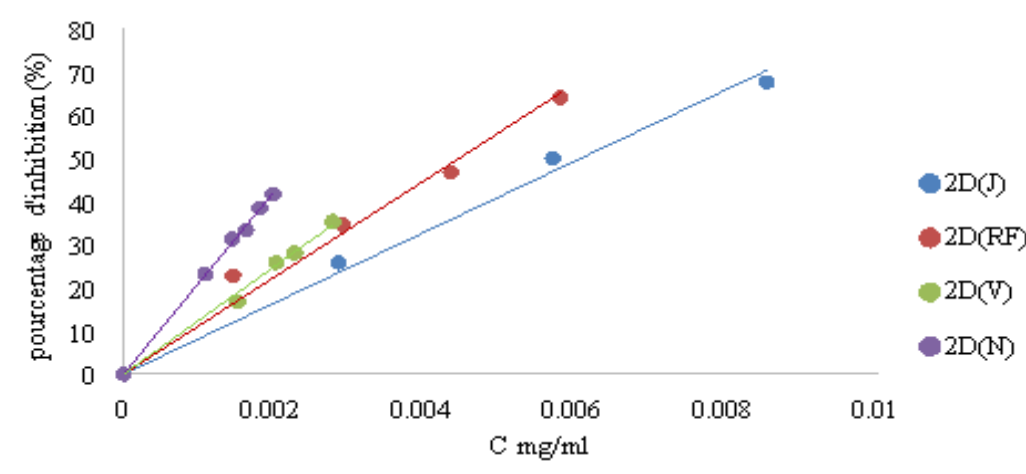


Figure 29: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 2D (même collecte).

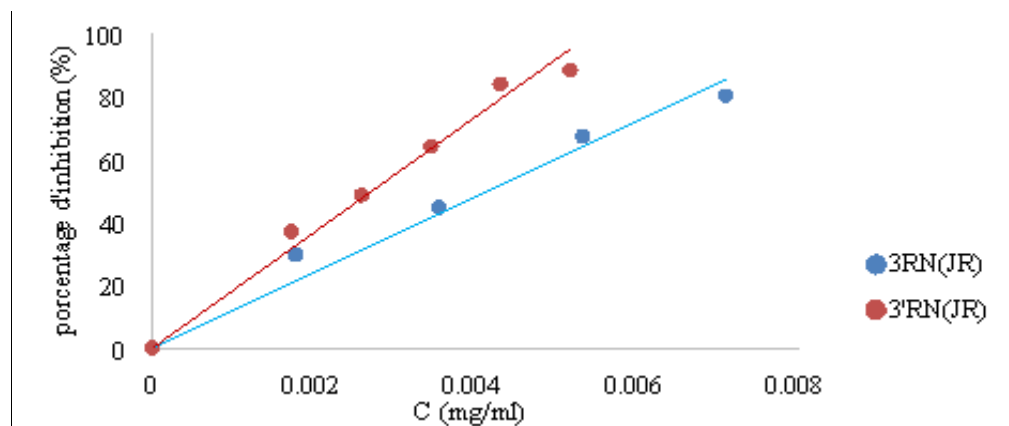


Figure 30: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 3RN de même couleur issus de deux collectes différentes.

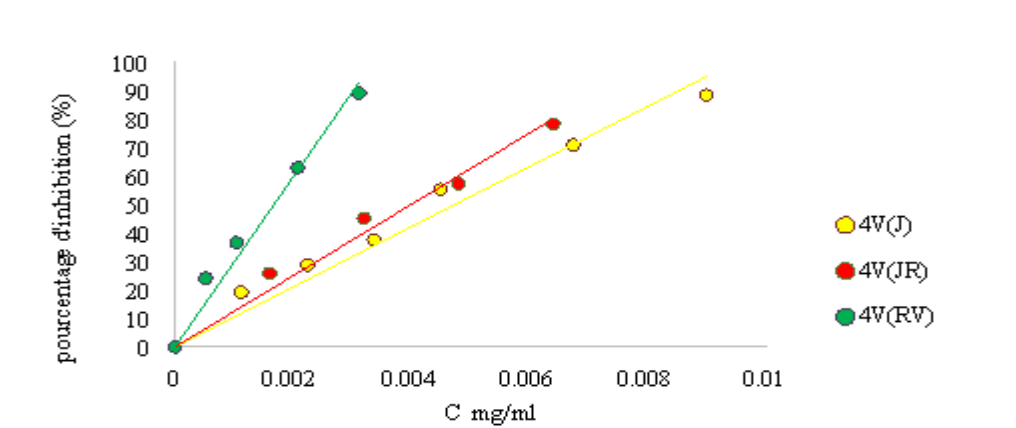


Figure 31: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 4V (même collecte).

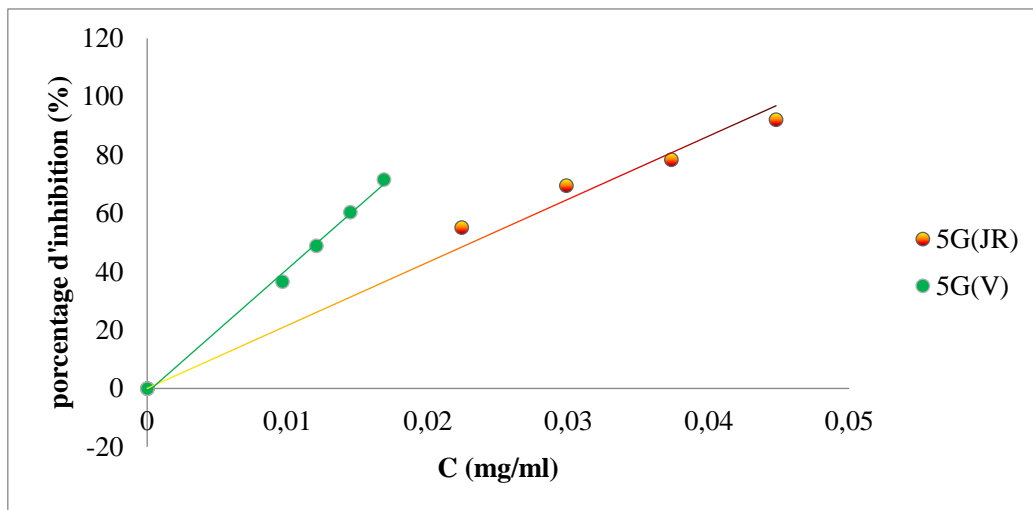


Figure 32: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 5G (même collecte).

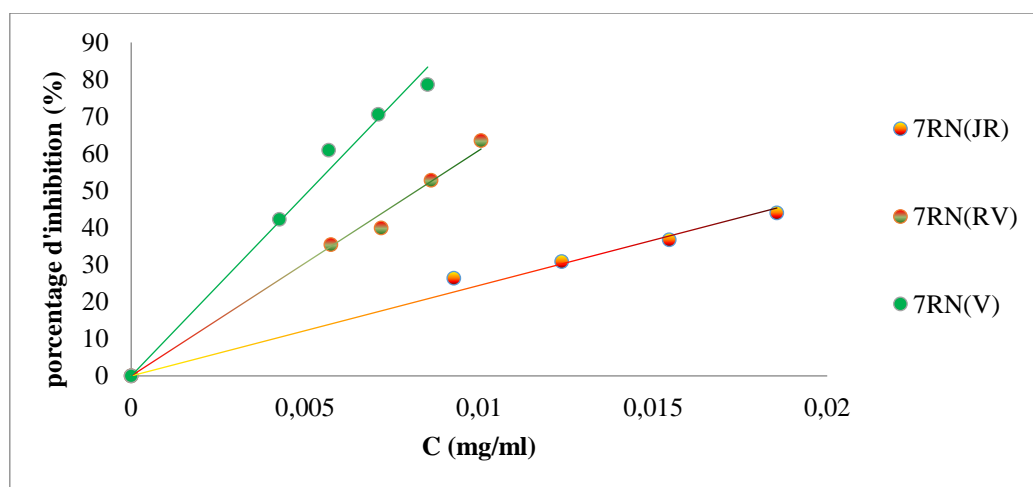


Figure 33: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 7RN (même collecte).

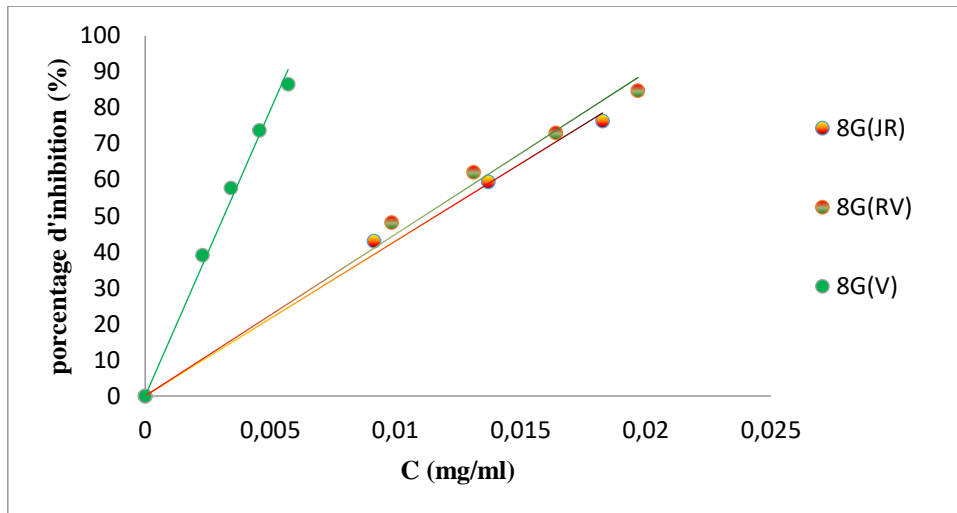


Figure 34: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre 8G (même collecte).

Ces figures montrent clairement que les fractions insaponifiables des échantillons matures ont le pouvoir antioxydant le plus élevé. Ceci est étayé par les valeurs de l'EC50 (Figure 35) qui varient de $0,43 \pm 0,12$ pour les drupes immatures à $0,27 \pm 0,1$ mg/ml pour les drupes matures ($p < 0,05$).

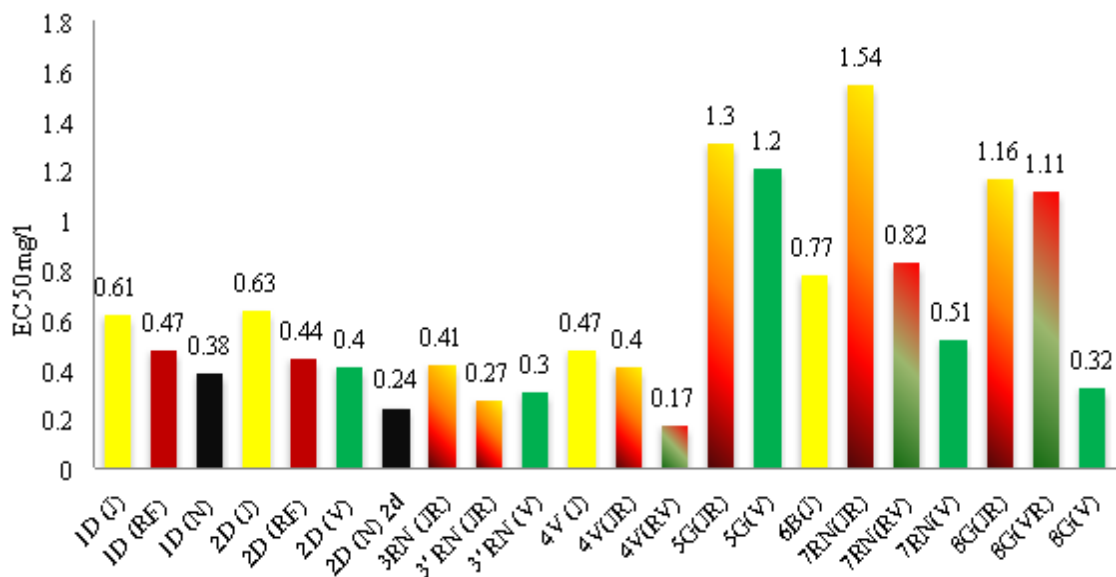


Figure 35: EC50 calculée pour les différentes fractions insaponifiables des huiles de fruits de maturité différente.

La valeur du coefficient de corrélation calculée est 0,27 indiquant une faible corrélation. Ce résultat indique que les tocophérols ne sont pas les seuls composés responsables de l'activité antioxydante. Cela nous laisse à penser de l'existence d'autres composés contenus dans la

fraction insaponifiable dotés d'activité antioxydante tels que les caroténoïdes, les triterpènes, les squalènes et autres composés mineurs.

En dernier lieu, nous notons avec un grand intérêt l'augmentation de l'activité antioxydante de la fraction insaponifiable en fonction de la maturation des fruits. Cette observation est à l'opposé de ce qui a été indiqué pour les huiles (coefficient de la corrélation négative entre EC50 de l'insaponifiable et EC50 de l'huile : (-0,67). Ce constat extrêmement intéressant pourrait indiquer la présence de molécules très actives, qui restent à déterminer, dans l'insaponifiable de l'huile des fruits matures (couleur verte ou noir ou bien collectés très tardivement).

VI.9 Extraction, analyse et évaluation du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques des tourteaux et des huiles et de mélanges des huiles

VI.9.1 Extraction, analyse et activité antioxydante des composés phénoliques des tourteaux

Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les échantillons des tourteaux ont été déterminées à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et de quercétine (annexe 5).

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique et en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de matière végétale sèche pour, respectivement, les phénols totaux et flavonoïdes (Tableau 20). Chaque résultat individuel est la moyenne de trois essais.

La masse d'extraits brut (g), les teneurs en phénols totaux (mg/g), les teneurs en flavonoïdes (mg/g) ainsi que les pourcentages des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%) sont montrés dans le tableau 20. Les valeurs moyennes pour chaque catégorie (immature, intermédiaire, mature) y sont également mentionnées.

Tableau 20: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les 22 échantillons d'extraits phénoliques des tourteaux.

Echantillons	Rendement partielle (%)	Teneurs en phénols totaux (mg/g)	Teneur en Flavonoïde (mg/g)	Pourcentage des Flavonoïdes par rapporte aux phénols totaux (%)
1D (J)	4,1	17,9 ± 0,49	1,65 ± 0,15	9,2
1D (R- F)	4,2	13,31± 0,86	1,71 ± 0,35	12,82
1D (N)	3,5	10,59 ± 0,39	2,12 ± 0,09	19,99
2D (J)	6,7	41,39 ± 0,47	1,81 ± 0,19	4,37
2D (R-F)	3,4	31,45 ± 0,84	2,78 ± 0,07	8,83
2D (V)	5,8	22,86 ± 0,85	2,52 ± 1,09	11,04
2D (N)	4,9	12,79 ± 0,34	6,72 ± 0,2	52,51
3RN (JR)	6,69	33,09 ± 0,67	3,57 ± 0,25	10,78
3' RN (JR)	4,65	26,5 ± 0,37	3,04 ± 0,63	11,47
3' RN (V)	3,67	20,7 ± 0,51	4,94 ± 1,27	23,86
4V (J)	4,13	14,63 ± 0,09	1,16 ± 0,03	7,9
4V(JR)	2,83	10,84 ± 0,58	2,05 ± 0,13	18,93
4V(RV)	1,37	7,92 ± 0,13	4,09 ± 0,4	51,6
5G(JR)	3,79	14,22 ± 0,2	1,45 ± 0,08	10,21
5G(V)	4,96	7,49 ± 0,71	4,98 ± 0,9	66,46
6B(J)	1,27	24,72 ± 0,26	3,32 ± 0,6	13,42
7RN(JR)	6,3	49,91 ± 0,47	2,18 ± 0,19	4,37
7RN(RV)	6,4	20,16 ± 0,13	5,17 ± 0,59	25,64
7RN(V)	5,2	18,52 ± 0,45	7,28 ± 1,17	39,31
8G(JR)	2,482	22,78 ± 0,42	1,66 ± 0,19	7,28
8G(VR)	2,86	11,9 ± 0,44	2,88 ± 0,7	24,17
8G(V)	1,77	8,7 ± 0,73	5,91± 0,68	67,91
Moyenne pour les immatures		25,6 ± 11,97	2,18 ± 0,79	9,79 ± 4,11
Moyenne pour les intermédiaires		22,38 ± 9,07	2,24 ± 0,53	10,82 ± 1,99
Moyenne pour les matures		14,16 ± 5,53	4,65 ± 1,66	38 ,24 ± 19,22

Il convient de dire que pour des contraintes de temps, nous n'avons pas atteint l'épuisement en ce qui concerne l'extraction des composés phénoliques. C'est ainsi que nous ne discutons pas les résultats relatifs au rendement d'extraction de ces composés.

Pour les autres paramètres, nous remarquons une diminution des teneurs en phénols totaux et une légère augmentation de celles des flavonoïdes au cours de la maturation des drupes. Nous notons avec intérêt la grande augmentation, en fonction de la maturation des fruits, de la proportion de ces derniers par rapport aux phénols totaux. Les tourteaux des fruits immatures sont riches en phénols totaux par rapport à ceux des fruits matures. Bien que cette différence ne soit pas significative, celle concernant la proportion des flavonoïdes par rapport aux

phénols totaux l'est à un $p < 0,05$. Le niveau des flavonoïdes ne semble varier que légèrement entre les deux catégories (Figure 36). Ces résultats sont extrêmement intéressants car ils pourraient rendre compte d'une variation quantitative et/ou qualitative d'autres composés phénoliques au cours de la maturation des fruits de *Pistacia atlantica*.

Pour le groupe de drupes de maturité moyenne (couleur rouge foncée ou rouge-verte), les valeurs des paramètres testés sont pratiquement intermédiaires entre les deux catégories mature et immature.

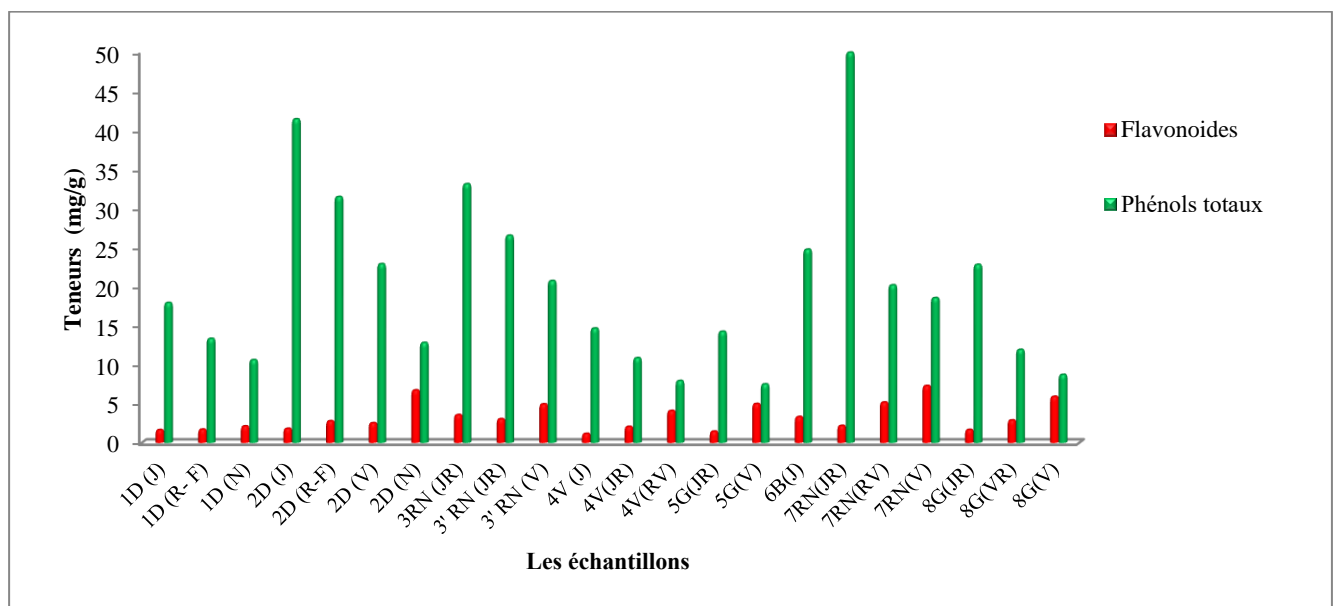


Figure 36: Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les échantillons d'extraits phénoliques des tourteaux.

La comparaison des huit arbres montre des différences notables signifiant des variations d'un arbre à un autre. Nous relevons une différence importante entre les deux arbres de Dayet Ennous. Nous nous interrogeons si cette différence entre fruits collectés simultanément à partir du même site n'était due à des facteurs propres à chaque arbre (âge, facteurs génétiques, présence d'éventuelles endophytes,...).

Les fruits de l'arbre 3 (site 40Km au sud de Laghouat), collectés en aout ont des teneurs légèrement élevées en phénols totaux et flavonoïdes par rapport à ceux des arbres de Dayet Ennous (arbre 1 et 2) collectés en juillet. Cette différence pourrait être due aux facteurs multiples tels que le sol et/ou des factures génétiques.

L'échantillon 7G(JR), bien qu'il soit de couleur jaune-rouge et collecté en août c'est-à-dire immature, semble contenir une teneur assez importante en phénols totaux par rapport aux fruits matures ordinairement récoltés en cette période.

Il est également à noter que les échantillons de l'arbre 5G d'Elghaicha (verts et jaune-rouges), se révèlent les moins riches en phénols totaux et flavonoïdes. Cette distinction qui mérite une étude complémentaire pourrait être due encore une fois à l'effet de facteurs de l'environnement.

Nous insistons sur le fait que c'est pour la première fois qu'une étude des composés phénoliques de fruits de cette plante collectés en juillet c'est-à-dire à un stade très précoce de maturation est réalisée.

Dans la littérature il y a peu de données sur la variation des teneurs des composés phénoliques des fruits de *Pistacia atlantica* selon le stade de maturité. Nous comparons nos résultats avec ceux de **Guenane (2017)** pour les mêmes fruits (de maturité différente) où une diminution remarquable des teneurs en phénols totaux au cours de la maturité des fruits a été observée (77,07, 46,78 et 26,71 mg/g pour respectivement, des fruits immatures, intermédiaires et matures (**Guenane ; 2017**).

Une étude sur les fruits matures (couleur noire) de même espèce de la région de Telghimt de Laghouat a révélé une teneur faible en polyphénols (5,93mg/g) et des flavonoïdes (4,85mg/g) (**Maamri, 2008**). D'autre part, Belyagoubi-Benhammou a montré dans sa thèse de doctorat un niveau très élevé en phénols totaux (285,956 mg EAG/ g MS) et un niveau modéré pour les flavonoïdes (12,441 mg EAG/ g MS) pour des fruits rouges de la même espèce de la région Aïn Fezza (Tlemcen) collectés très précocement (en mai) (**Belyagoubi-Benhammou, 2011**). L'ensemble de ces résultats conforte les nôtres.

VI.9.2 Extraction, analyse et activité antioxydante des extraits phénoliques des mélanges des huiles

VI.9.2.1 Extraction des polyphénols et analyse quantitative à partir des mélanges des huiles

Etant donné le caractère polaire des composés phénoliques et donc leur taux, théoriquement, faible dans l'huile, nous avons groupé des échantillons huileux selon la couleur des drupes afin d'augmenter le rendement d'extraction phénolique. C'est ainsi que nous avons obtenu trois mélanges selon le degré de maturation des fruits.

Le rendement d'extraction phénolique à partir de l'huiles ainsi que les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes (mg/kg) sont indiqués dans le tableau 21. Les analyses quantitatives des phénols totaux et des flavonoïdes sont accomplies à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage (annexe 5). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique et en milligrammes équivalents de quercétine par kilogramme d'huile pour respectivement les phénols totaux et les flavonoïdes. Ce dernier paramètre, pour des raisons expérimentales, n'a pu être analysé que pour l'échantillon Mél 1.

Tableau 21: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les mélanges huileux.

Mélanges huileux	Masse d'extrait phénolique brut (mg)	Rendement d'extraction phénolique (% , m/m)	Teneurs des phénols totaux (mg /kg)	Teneurs des Flavonoïdes (mg /kg)	Pourcentage des Flavonoïdes par rapporte aux phénols totaux (%)
Mél 1 (immature)	86,1	0,574	25,12 ±0.34	16,39 ± 0,94	65,24
Mél 2 (intermédiaire)	27,9	0,109	2,23 ± 0.61	-	-
Mél 3 (mature)	15,1	0,062	1,27 ± 0,08	-	-

Nous constatons que le mélange 1 (représentant des fruits immatures) enregistre le rendement d'extraction phénolique le plus élevé de l'ordre de 0,574 % (m/m) suivi par le mélange 2 (fruits à maturité moyenne) à raison de 0,109%, puis le mélange 3 (fruits matures) avec 0,062%.

Les phénols totaux des huiles gardent la même variation de ceux des tourteaux. En effet, nous enregistrons une diminution de leurs teneurs au cours de la maturation des drupes (25,12, 2,23 et 1,27mg/kg pour respectivement Mél1, Mél2 et Mél 3). Nos résultats sont parfaitement concordants avec ceux qui avaient trouvé des valeurs atteignant 178 et 65 mg/kg pour respectivement des échantillons immatures et matures **Guenane et al ., 2015**.

Il est à relever que la proportion des flavonoïdes dans les phénols totaux pour Mél 1 est assez élevée (65,24 %). La moyenne de cette proportion pour les échantillons de tourteaux correspondant à Mél 1 dépassait à peine 5 %. Celle pour les mêmes échantillons de tourteaux correspondant à Mél 2 et Mél 3 était respectivement 11,4 et 36,48 %. Suite à ces données, nous nous interrogeons si la variation de la proportion des flavonoïdes était inversée dans l'huile par rapport aux tourteaux. L'absence de résultats concernant les flavonoïdes dans l'huile pour Mél 2 et Mél 3 nous a été limitant.

Dans la littérature, nous n'avons trouvé que les données rapportées par **Saber-Tehrani et al.** Pour la même plante et qui indiquent une teneur de 57,57 mg/kg (**Tehrani et al., 2012**). Pour les autres espèces, l'huile d'olive est connue par sa teneur phénolique appréciable (**Nakbi et al., 2010**).

En vue d'établir le degré de la relation entre teneurs des phénols totaux au niveau des tourteaux et celles des huiles, nous avons calculé le coefficient de corrélation entre elles. Pour ce faire, nous avons calculé la moyenne des teneurs phénoliques au niveau des tourteaux des mêmes échantillons huileux mélangés pour pouvoir comparer (Tableau 22).

Tableau 22: Comparaison entre les teneurs phénoliques de mélanges des huiles et les moyennes en teneurs phénoliques des extraits phénoliques des tourteaux de fruits de chaque mélange d'huile.

Echantillons	Teneur phénolique moyennes pour les tourteaux mg/g	Teneur phénolique pour les huiles mg/g	Coefficient de corrélation entre teneur phénolique dans les tourteaux et les huiles (r)
Mél 1	36,40 ± 16,57	0,02512 ± 0,87	0,99
Mél 2	19,55 ± 9,52	0,00223 ± 0,61	
Mél 3	17,16 ± 3,86	0,00127 ± 0,32	

Nous remarquons que les teneurs phénoliques des tourteaux sont nettement supérieures à celles des huiles. C'est tout à fait logique sachant que la nature hydrosoluble des composés phénoliques. Une corrélation positive très étroite ($r = 0,99$) est obtenue entre les niveaux des phénols totaux des tourteaux et ceux des huiles. De ce fait, la charge phénolique totale varie, au cours de la maturation des drupes, d'une manière identique entre les tourteaux et les huiles.

Il est crucial de savoir si la composition phénolique au niveau de ces deux compartiments était identique ou différente. Nos résultats concernant les flavonoïdes dans l'huile, quoique limité à Mél 1 uniquement, semble plaider en faveur d'une composition différente. Seule l'identification (sur le plan qualitatif et quantitatif), par des procédés perfectionnés tels que l'HPLC, des composés phénoliques constitutifs apportera des réponses formelles. Il a été rapporté que l'acide caféique, l'acide cinnamique et le pinosésinol étaient les composés phénoliques dominants dans l'huile des fruits de *Pistacia atlantica* (**Saber-Tehrani et al., 2012**).

VI.9.3 Résultat d'évaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts des tourteaux contre le radical libre DPPH°

Pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des phénols totaux par le piégeage du radical libre DPPH, nous avons utilisé l'acide ascorbique (Vitamine C) comme produit de contrôle positive. Ce qui a permis de tracer la courbe de référence représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations en vitamine C afin de calculer l'EC50 (la concentration nécessaire d'un antioxydant pour neutraliser 50% du radicale libre) (annexe 5).

Nous avons réalisé le même traitement avec les échantillons testés. Les représentations graphiques ayant servi au calcul de l'EC50 pour chaque échantillon sont données en Annexe 4. Les valeurs de l'EC50 qui en sont déduites sont récapitulées dans le tableau 23.

Tableau 23: Activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux bruts exprimés par EC50.

Echantillons	EC 50(µg/ml)
1D (J)	20,41
1D (RF)	27,2
1D (N)	31,28
2D (J)	10,9
2D (RF)	12,68
2D (V)	27,39
2D (N)	23,77
3RN (JR)	10,08
3' RN (JR)	10,12
3' RN (V)	12,05
4V (J)	18,51
4V(JR)	20
4V(RV)	33,33
5G(JR)	15,87
5G(V)	25,89
6B(J)	9,86
7RN(JR)	19,78
7RN(RV) + 7RN(V)	34,56*
8G(JR)	11,63
8G(VR)	23,36
8G(V)	27,03
Moyenne pour les immatures	14,72±4,38
Moyenne pour les intermédiaires	19,94±7,26
Moyenne pour les matures	25,51±6,0
Acide ascorbique	5,55

*: Moyenne de deux valeurs presque identiques

Il ressort du tableau 23 que les extraits des drupes immatures ont le pouvoir antioxydant le plus élevé qui diminue d'une manière légère avec la maturation caractérisée par le changement de la couleur du fruit (passage de la couleur du jaune vers le vert ou le noir en passant par le rouge foncé). Le test de Student n'indique pas de différence significative entre les échantillons immatures et ceux matures. Ce résultat ne concorde pas avec celui rapporté par **Guenane (2017)** où une nette différence avait été décelée. L'EC50 de nos échantillons matures oscille entre 23 et 34 $\mu\text{g/ml}$ contre un intervalle compris entre 24 et 217 $\mu\text{g/ml}$ pour l'étude réalisée par Guenane. Cette différence concernant les drupes matures pourrait être expliquée par la collecte très précoce de nos fruits (juillet et aout) par rapport à ceux de Guenane (aout et septembre). Ceci est conforté par la valeur de l'EC50 (24,85 $\mu\text{g/ml}$) d'un échantillon mature collectés en Aout 2013 (**Guenane, 2017**). Cette observation indique clairement que la couleur du fruit indique mais en partie son degré de maturation. La date de la collecte est un autre paramètre à prendre en considération. En dernier lieu, il ne faut pas omettre l'effet de la variation des saisons (entre 2013 et 2015).

Dans la littérature, il a été rapporté que les fruits matures de *Pistacia atlantica* dans l'ouest de l'Azerbaïdjan étaient moins actifs (EC50 de 0,921mg/ml) (**Hatamnia et al., 2014**). Cette différence serait due en grande partie à l'emplacement géographique.

VI.9.3.1 Relation entre teneurs phénoliques et activité antioxydante

Nous avons calculé le coefficient de corrélation entre les niveaux des polyphénols dans les tourteaux et les valeurs d'EC50 pour l'ensemble des échantillons. Nous avons trouvé une corrélation négative assez appréciable ($r = -0,53$) comme le montre la régression présentée dans la figure 37. Dans un souci d'enlever l'effet de différences inter arbres (âge, emplacement géographique, ...), nous avons également calculé le coefficient de corrélation pour les échantillons de chaque arbre (Tableau 24). Nous remarquons une corrélation négative très étroite entre les deux paramètres testés. Les valeurs proches de -1 indiquent clairement une relation cause à effet entre composés phénoliques et activité antioxydante.

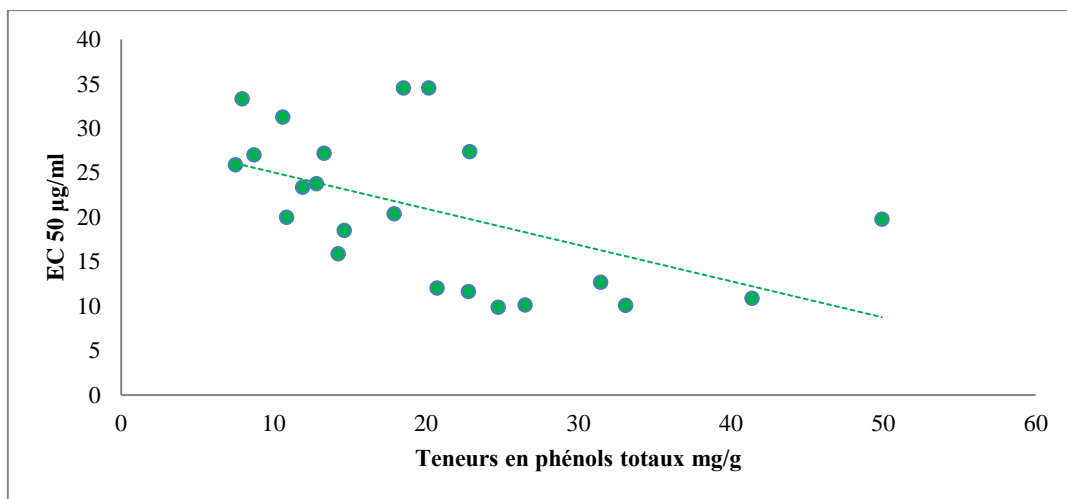


Figure 37: Régression entre l’activité antioxydante (formuler par EC50) et les teneurs en phénols totaux des extraits phénoliques bruts au niveau les tourteaux.

Tableau 24: Corrélation entre les teneurs phénoliques dans les extraits des tourteaux obtenus des fruits de chaque arbre (tous stades de maturation confondus) et l'EC50.

Les arbres	Lieu de récolte	Coefficient de corrélation(r)
1	Dayet Ennous.	-0,999
2	Dayet Ennous.	-0,830
3	Route National 1 (20 Km au sud de Laghouat).	-0,962
4	Laghouat (Ville).	-0,874
5	Elghaicha.	-1
7	Route National 1 (40 Km au sud de Laghouat).	-0,999
8	Elghaicha.	-0,99994

VI.9.4 Analyse quantitative et évaluation du pouvoir antioxydant des composés des mélanges des huiles par test de piégeage du radical libre DPPH°

Etant donné que, généralement, les tocophérols sont les molécules les plus antioxydantes des huiles, nous nous y sommes intéressés avant et après extraction phénolique. Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous avons travaillé sur des huiles groupées donnant trois mélanges selon le degré de maturité des fruits dont elles sont extraites. Nous avons réalisé le dosage des tocophérols totaux, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des mélanges des huiles et ce avant et après extraction des composés phénoliques. Nous avons également testé le pouvoir anti radicalaire des extraits phénoliques obtenus à partir des huiles.

VI.9.4.1 Dosage des tocophérols et l'évaluation d'activité antioxydante avant et après l'extraction des phénols totaux à partir des mélanges des huiles

A l'aide de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (α -tocophérols) (annexe 5), nous avons déterminé les teneurs en tocophérols totaux. La vitamine E a également été utilisée comme antioxydant de référence (annexe 5). Les résultats du dosage sont exprimés en milligrammes équivalents de vitamine E par 100 grammes d'huile et ceux relatifs au pouvoir antioxydant sont exprimés en EC50 (mg/ml). L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau 25.

Tableau 25: Teneurs en tocophérols totaux et activités antioxydants des mélanges des huiles (exprimée par EC50) avant et après extraction des polyphénols.

	Dans les mélanges des huiles brutes		Dans les mélanges des huiles après extraction des composés phénolique	
	Teneurs en tocophérols (mg/100g)	Les valeurs d'EC50 (mg/ml)	Teneurs en tocophérols (mg/100g)	Les valeurs d'EC50 (mg/ml)
Mél 1 (huile)	584,68 \pm 0,84	4,93	219,56 \pm 0,44	18,37
Mél 2 (huile)	213,5 \pm 0,67	15,52	76,52 \pm 0,42	38,08
Mél 3 (huile)	143,26 \pm 0,51	20,95	73,72 \pm 0,19	40,82

Nous constatons, à partir des données du tableau 25, que l'huile des fruits immatures a les teneurs les plus importantes en tocophérols lesquelles sont associées au pouvoir antioxydant le plus important. De ce fait, il est évident que la teneur en tocophérols totaux dans l'huile des fruits de notre plante ainsi que son activité antioxydante diminue au fur et à mesure de la progression de leur maturation.

Nous notons avec un grand intérêt une diminution importante et significative de la teneur des tocophérols totaux ainsi que l'activité antioxydante des huiles après extraction phénolique et ce pour tous les mélanges (Tableau 25). Ceci pourrait être expliqué par le passage d'une partie des tocophérols dans l'extrait phénolique. La diminution du pouvoir antioxydant de l'huile après extraction phénolique est évidente dans l'allure des droites présentées pour respectivement dans les figures 38, 39, 40 des mélanges 1, 2,3. Cette diminution indique clairement l'implication des composés phénoliques dans l'activité antioxydante avant l'extraction des composés phénoliques.

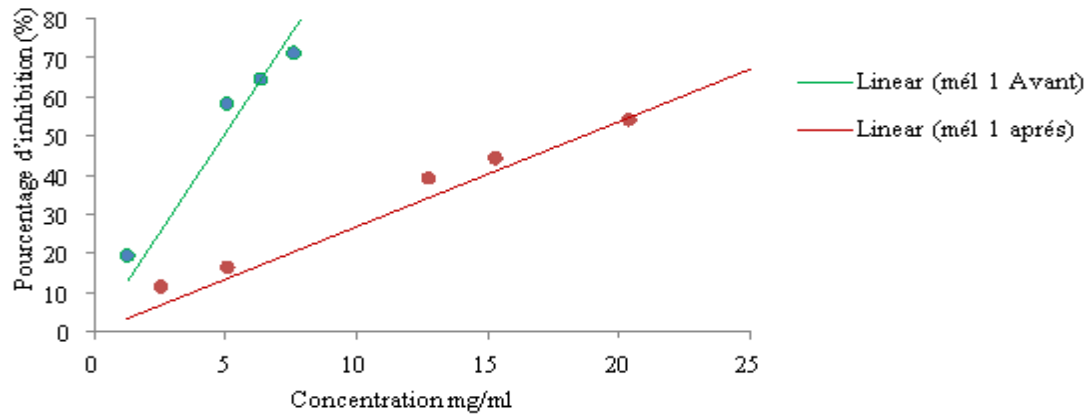


Figure 38: Activité antioxydante de mélange 1 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.

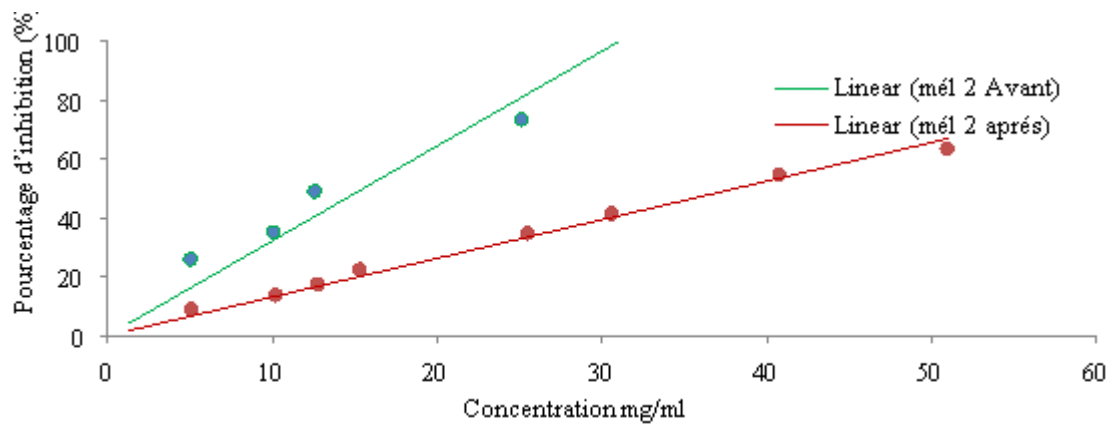


Figure 39: Activité antioxydante de mélange 2 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.

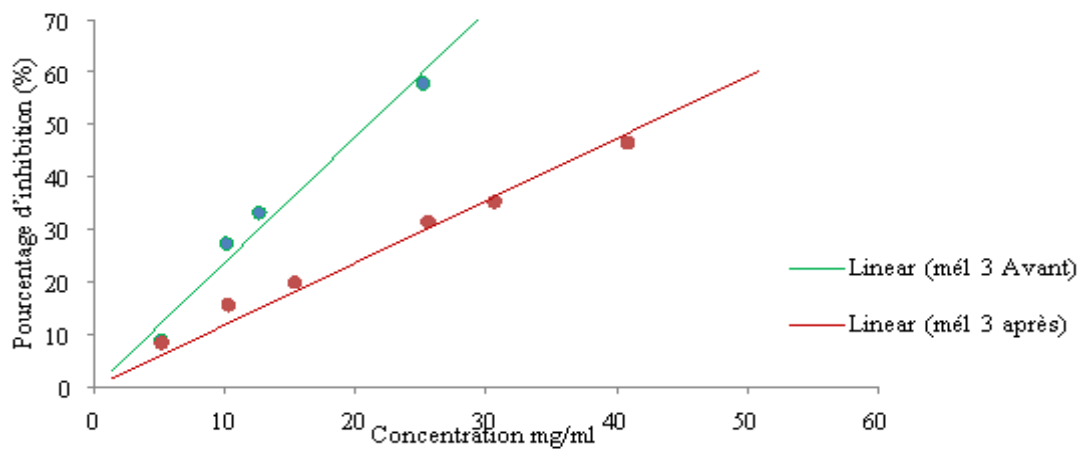


Figure 40: Activité antioxydante de mélange 3 des huiles avant et après extraction des composés phénoliques.

Il est à relever que la variation des deux paramètres testés n'a pas changé après extraction phénolique.

Nos résultats concernant la diminution de l'activité antioxydante des huiles après extraction phénolique confortent ceux rapportés par **Guenane (2017)** et plaident en faveur d'un rôle important des composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

L'activité antioxydante des extraits phénoliques à partir des huiles à été testée uniquement pour les échantillons Mél 1 et Mél 2. Vu la masse très faible de l'extrait obtenu pour Mél 3 (environ 15mg), ce dernier n'a pu être testé. Les résultats sont montrés dans le tableau 26.

Tableau 26: Activité antioxydante (exprimé par EC50) des extraits phénoliques des mélanges des huiles.

Les mélanges des huiles	EC50 µg/ml
Mél 1	89,2
Mél 2	1309
Mél 3	-

Il en ressort que l'activité antioxydante des extraits obtenus à partir de l'huile des fruits immatures est extrêmement élevée traduite par un EC50 relativement bas. Par contre, Mél 2 (intermédiaire) a une activité beaucoup plus faible traduite par un EC50 élevé. Cette variation semble être identique à celle des extraits de tourteaux où les valeurs moyennes correspondant à Mél 1, Mél 2 et Mél 3 étaient respectivement 17,03, 24,64 et 30,96 µg/ml. Ces derniers extraits se montrent plus actifs par rapport à ceux de l'huile.

VI.9.4.2 Relation entre le pouvoir anti radicalaire et les teneurs en tocophérols totaux avant et après extraction des phénols totaux

En dépit que nos résultats sur les composés phénoliques dans l'huile ne concernent que trois échantillons mélanges, nous avons essayé quand même d'établir des régressions linéaires reliant l'activité antioxydante à la teneur en tocophérols totaux avec calcul du coefficient de corrélation pour les huiles et ce avant et après extraction phénoliques. Nous décelons une corrélation négative très étroites entre ces deux paramètres avec un coefficient de corrélation légèrement supérieur après extraction des composés phénoliques (-0,995 contre -0,981, figures 41 et 42). Cette légère augmentation renseigne sur l'implication, dont le degré mérite d'être déterminé, des composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant de l'huile des fruits de *Pistacia atlantica*.

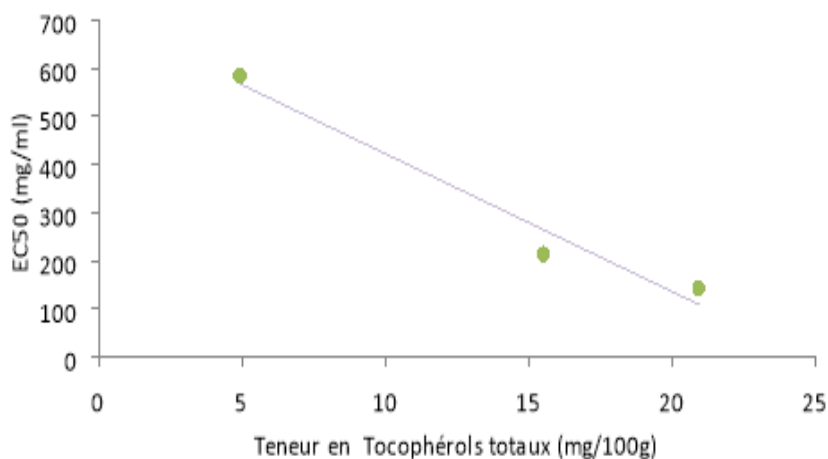


Figure 41: Régression entre l'activité antioxydante (formuler par EC50) des trois mélanges huileux et les teneurs en tocophérols avant l'extraction des composés phénoliques.

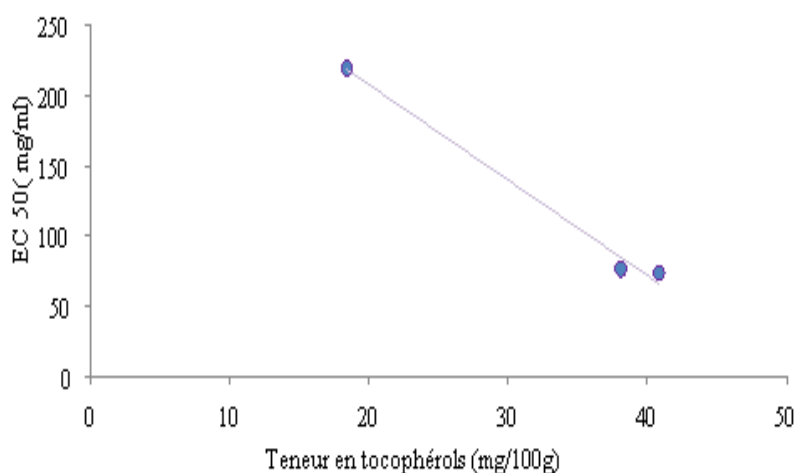


Figure 42: Régression entre l'activité antioxydante (formuler par EC50) des trois mélanges huileux et les teneurs en tocophérols après l'extraction des composés phénoliques.

VI.10 Synthèse des résultats

Les résultats relatifs à l'étude de la fraction insaponifiable nous permettent de dégager le constat que l'activité antioxydante de cette fraction augmente au cours de la maturation des fruits contrairement à celle de l'huile brute qui diminue au cours de la maturation. Par contre, les données obtenues pour les extraits phénoliques dans les mélanges des huiles montrent clairement que les teneurs en phénols totaux ainsi que leur activité antioxydante diminuent en fonction de la maturation des drupes. Ces résultats peuvent être interprétés comme suit :

- L'activité antioxydante des extraits lipidiques des fruits matures seraient due principalement à la fraction insaponifiable. Cette dernière renferme outre les tocophérols d'autres composés dotés d'activité antioxydante tels que les caroténoïdes, les triterpènes et squalènes.

- L'activité antioxydante des extraits lipidiques des fruits immatures serait due aux composés phénoliques contenus dans l'huile. Cette observation pourrait être étayée par la diminution du rapport de l'EC50 entre les mélanges des échantillons matures et immatures après l'extraction des composés phénoliques (ce rapport passe de 4 à 2, voir tableau 25).

Chapitre VII : Collecte des fruits du pistachier de l'atlas 2016.

D'après les résultats de la collecte de 2015, nous avons remarqué que parmi tous les échantillons étudiés, les deux échantillons prévenant de l'arbre situé à Elghaicha possèdent des activités antioxydants importantes par rapport aux autres. Pour cela nous avons pensé à élargir notre étude sur un nombre plus important d'échantillons de fruits en tenant compte de la date de collecte de juillet à septembre et les conditions environnementales et notamment l'altitude en choisissant deux régions différentes à savoir : Hassi Delaà et Elghaicha. L'étude a été menée sur 21 échantillons (9 d'Elghaicha et 12 de Hassi Delaà), ce nombre est divisé en deux catégories, en fonction du degré de maturité : fruit immature (vert clair ou jaune rouge) fruit mature (noir ou vert). Il est à indiquer que pour la première que des arbres de Hassi Delaà sont choisies parmi les échantillons étudiés. Nous avons adopté la même démarche expérimentale que celle décrite précédemment. Cette étude nous permettra de prédire l'influence des facteurs environnementaux sur la composition et l'activité antioxydante des extraite lipidiques et phénoliques des fruits de Pistachier de l'Atlas.

VII.1 Teneur en huiles des fruits

D'après la figure 43, nous remarquons que la variation de la teneur en huile dans les fruits suit celle discutée pour les échantillons collectés en 2015. C'est-à-dire plus les fruits sont matures plus la contenance en huile augmente. L'aspect et la couleur des huiles extraites sont présentés dans le tableau 27.

A la lumière de ces résultats, on remarque que les teneurs les plus élevées en huile sont obtenues pour les échantillons de la région de l'Elghaicha (3,97 à 14,01 % pour les fruits immatures et 35,07 à 39,60 % pour les fruits matures. Ce résultat indique l'influence de la date de la collecte et les facteurs de l'environnement sur le rendement de l'extraction.

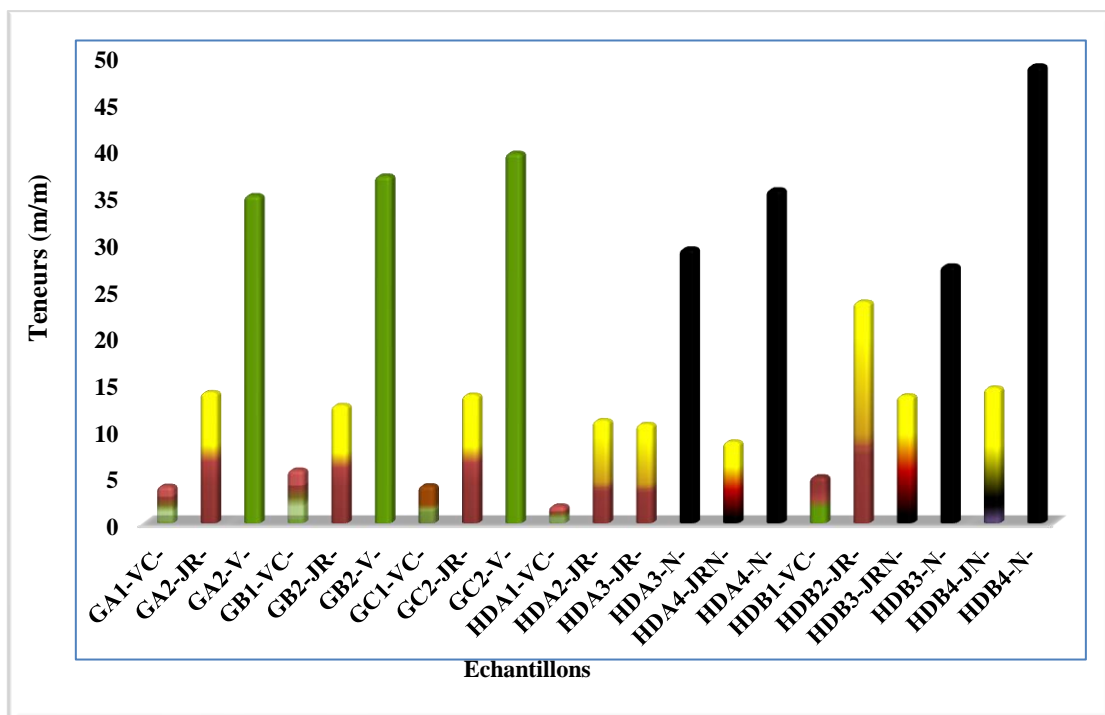























Figure 43: Variation du rendement d'extraction des huiles à partir des fruits du *Pistacia atlantica* en fonction de leur stade de maturité.

Tableau 27: Les rendements, les couleurs d'huile et les couleurs des fruits correspondants des échantillons des fruits de pistachier de l'Atlas (collecte 2016).

Échantillons	G							
	A1(VC)	A2(JR)	A2(V)	B1(VC)	B2(JR)	B2(V)	C1(VC)	C2(JR)
Couleur de l'huile								
Rendement % (m/m)	03,97	14,01	35,07	05,7	12,62	37,17	04,02	13,73

Échantillons	G	HD					
	GC2(V)	A1(VC)	A2(JR)	A3(JR)	A3(N)	A4 (JRN)	A4(N)
Couleur de l'huile							
Rendement % (m/m)	39,60	01,86	11	10,59	29,38	08,71	35,70

	HD					
	B1(VC)	B2(JR)	B3(JRN)	B3(N)	B4(JN)	B4(N)
Couleur de l'huile						
Rendement % (m/m)	04,98	23,7	13,66	27,57	14,49	48,94

VII.2 Détermination de la composition en acides gras des huiles par CPG

Le tableau 28 englobe l'ensemble des résultats relatifs aux acides gras. Ainsi, nous remarquons les mêmes variations de la composition en acides gras que celles décrites pour les échantillons de la collecte de 2015, qui montrent que les proportions des acides saturés et insaturés varient en sens inverse où la proportion en acides gras saturés est d'autant plus élevée que les fruits sont matures. Nous remarquons que de l'acide linoléique C18:3 a enregistré pour la première fois un pourcentage assez appréciable (3,81% et 3,12%) pour les fruits collectés le premier juillet 2016 à partir des deux arbres de Hassi Delaà. L'acide α -linoléique (ALA) fait partie de la famille des acides gras dits oméga 3. le rôle des oméga 3 dans la neurotransmission monoaminergique au niveau des synapses (**Chalon et al., 2001**) et les voies de signalisation comme les protéines kinases C (**Kim et al., 2004**). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Trabelsi et al sur l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* (**Trabelsi et al., 2012**). Ainsi, la proportion de l'acide linoléique serait significativement élevée à des stades très précoces de la maturation. De ce qui précède, les fruits de *Pistacia atlantica* collectés à un stade très précoce de la maturation pourraient constituer une source des acides gras ω 3.

La légère différence d'acides gras pour les extraits huileux entre les deux régions est due à la différence de localisation géographique. Concernant *Pistacia atlantica*, une étude récente a démontré l'effet des facteurs environnementaux sur la composition dans les extraits gras de fruits, feuilles (**Guersasse, 2018**).

Tableau 28: Composition en acides gras des huiles brutes des fruits étudiés 2016.

Acides gras	Échantillons %																				
	GA1 - VC-	GA2 -JR-	GA2 -V-	GB1 - VC-	GB2 -JR-	GB2 -V-	GC1 - VC-	GC2 -JR-	GC2 -V-	HDA 1-VC-	HDA 2-JR-	HDA 3-JR-	HDA 3-N-	HDA 4- JRN-	HDA 4-N-	HDB 1-VC-	HDB 2-JR-	HDB 3- JRN-	HDB 3-N-	HDB 4-JN-	HDB 4-N-
C12 :0	0,47	0,67	0,94	0,19	0,12	0,54	0,29	0,69	0,06	0,43	0,13	0,12	0,17	0,16	0,09	0,43	0,14	Tr	0,1	00,22	00,07
C16 :0	14,4	14,5	25,3	14,8	15	25,7	16,3	15,7	22,5	16,92	11,70	13,66	16,89	21,47	20,26	14,64	11,96	14,71	14,01	17,56	24,21
C16 :1ω7	0,93	0,8	0,22	0,47	0,33	0,03	0,98	0,67	0,63	Trace	0,52	0,61	1,25	1,56	1,05	1,13	0,74	0,78	0,94	01,38	01,41
C18 :0	1,75	1,01	2,13	0,54	1,18	2,85	1,14	1,81	1,17	1,97	2,49	2,60	1,74	1,56	2,36	1,93	2,42	2,24	2,28	02,21	01,81
C18 :1ω9	52	53,9	50,2	52,0	53,6	51,2	51,2	53,8	55,2	47,77	55,83	54,11	51,89	47,35	53,00	48,43	57,59	52,51	57,81	47,43	49,03
C18 :2ω6	29,0	28,1	19,9	29,4	28,5	18,0	28,4	26,7	19,8	27,45	27,71	27,25	26,29	26,63	22,07	28,91	26,42	28,12	22,86	29,26	22,07
C18 :3ω3	0,81	0,46	0,95	0,93	0,91	0,93	1,04	0,53	0,37	3,81	0,61	0,85	0,94	2,20	0,86	3,12	0,28	1,60	0,75	01,90	00,60
C20 :0	0,5	0,52	0,23	1,54	0,31	0,38	0,45	0,09	0,06	Tr	0,23	0,20	0,17	Tr	0,14	Tr	0,12	Tr	Tr	Tr	00,11
C20 :1ω9	0,19	0,15	0,17	0,13	0,05	0,3	0,27	0,03	0,11	Tr	0,50	0,40	0,16	Tr	Tr	0,50	0,29	Tr	0,97	Tr	00,29
ΣAGS	17,1	1,67	28,6	17,1	16,6	29,5	18,2	18,3	,242	19,32	14,55	16,58	18,97	23,19	22,85	17	14,64	16,95	16,39	16,39	26,2
AGMI	53,2	54,8	50,6	52,6	54	51,5	52,4	54,5	56	47,77	56,85	55,12	53,3	49,09	54,5	50,06	58,62	53,29	59,72	59,72	50,73
AGPI	29,8	28,8	20,9	30,3	29,4	19	29,4	27,2	,202	31,26	28,32	28,1	27,23	28,83	22,93	32,03	26,7	29,72	23,61	23,61	22,67
ΣAGI	82,9	83,3	71,5	82,9	83,4	70,5	81,8	81,7	,762	79,03	85,17	83,22	80,53	77,92	77,43	82,09	85,32	83,01	83,33	83,33	73,4
ΣAGI/ΣAGS	4,86	5	2,50	4,85	5,03	2,39	4,51	4,46	3,14	4,09	5,85	5,02	4,25	3,36	3,39	4,83	5,83	4,9	5,08	5,08	2,80
Moyenne de ΣAGI/ΣAGS	Échantillons immatures : 4,76 ± 0,66										Échantillons matures : 3,37 ± 0,98										

* p ≤ 0,05 (comparé à des échantillons matures).

VII.3 Teneurs en stérols totaux des huiles

Les teneurs en stérols totaux, montrent que les huiles étudiées contiennent des quantités très importantes et variables en stérols (Tableau 29).

Nous constatons que la teneur en stérols totaux est très variable qui s'échelonnent de 64,2mg/g à 402,17 mg/g. Il en ressort que les fruits immatures (vert-clair) en sont les plus riches. Comparativement aux échantillons de 2015, les échantillons de 2016 montrent des différences plus prononcées selon la localisation géographique consistant en des niveaux significativement importants pour les échantillons d'Elghaicha. Ceci pourrait être expliqué par le nombre assez important des échantillons de 2016, les facteurs de saison et les facteurs propres aux sites.

Nous remarquons que les échantillons récoltés très précocement en juillet contiennent les quantités les plus élevées en stérols.

Tableau 29:Teneur en stérols totaux dans les huiles de *Pistacia atlantica* 2016.

Echantillons immatures (selon la couleur)	Teneur (mg/g)	Echantillons matures (selon la couleur)	Teneur (mg/g)
HDB4-JN-	169,77 ± 0,58	HDB4-N-	64,22 ± 1,5
HDB3-JRN-	178,89 ± 0,6	HDA4-N-	81,1 ± 1,16
HDA4-JRN-	185,5 ± 0,87	HDB3-N-	83,62 ± 0,58
HDA3-JR-	196,45 ± 0,29	HDA3-N-	96,82 ± 0,9
HDB2-JR-	216,9 ± 1,16	GA2-V-	107,3 ± 0,47
HDA2-JR-	235,4 ± 0,87	GC2-V-	109,27 ± 0,69
GA2-JR-	245,71 ± 0,9	GB2-V-	112,69 ± 1,6
GC2-JR-	249,8 ± 0,46	-	-
HDB1-VC-	275,5 ± 0,57	-	-
HDA1-VC-	288,9 ± 0,29	-	-
GA1-VC-	307 ± 1,62	-	-
GB2-JR-	311,53 ± 0,7	-	-
GC1-VC-	386,03 ± 0,9	-	-
GB1-VC-	402,17 ± 1,6	-	-
Moyenne	260,94±72,22	Moyenne	93,57 ±17,92

VII.4 Teneur des tocophérols totaux des huiles

Les teneurs en tocophérols totaux, présentées dans le tableau 30, sont extrêmement élevées pour l'ensemble des échantillons par rapport à celles trouvées pour les échantillons de 2015. La teneur en tocophérols varie de 174,13 mg/100g à 809,18 mg/100g. Il est clair que les huiles extraites à partir des fruits immatures (vert-clair) d'Elghaicha et Hassi Delaà contiennent les quantités les plus élevées. L'accumulation des tocophérols est la plus élevée pour les échantillons collectés très précocement. Par ailleurs, quelque soit le degré de maturité des fruits, les échantillons d'Elghaicha sont les plus riches en tocophérols. Ceci serait dû aux mêmes facteurs avancés précédemment.

Tableau 30: Teneur en tocophérol totaux dans les huiles de *Pistacia atlantica* 2016.

Echantillons immatures	Teneur (mg/100g)	Echantillons matures	Teneur (mg/100g)
HDB3-JRN-	280,9 ± 0,57	HDB3-N-	174,13 ± 0,54
HDB4-JN-	305,4 ± 0,57	HDB4-N-	176,43 ± 0,14
HDA3-JR-	391,89 ± 0,7	HDA4-N-	195,64 ± 0,37
HDA4-JRN-	409,87 ± 0,34	GA2-V-	198,09 ± 0,45
HDB2-JR-	439,72 ± 0,1	HDA3-N-	205,89 ± 0,81
HDB1-VC-	477,61 ± 0,37	GC2-V-	221,2 ± 0,37
HDA2-JR-	487,56 ± 0,14	GB2-V-	280,14 ± 0,57
GA2-JR-	538,23 ± 0,46	-	-
HDA1-VC-	545,35 ± 0,57	-	-
GC2-JR-	573,13 ± 0,45	-	-
GB2-JR-	609,57 ± 0,9	-	-
GA1-VC-	700,5 ± 0,9	-	-
GC1-VC-	724,99 ± 0,91	-	-
GB1-VC-	809,18 ± 0,9	-	-
Moyenne	579,03 ± 135,32	Moyenne	239,12 ± 58,02

VII.5 Analyse des tocophérols des huiles par CLHP

L'analyse des tocophérols individuels a été réalisée dans les mêmes conditions que celles pour la collecte 2015. Les résultats sont regroupés dans le tableau 31. Les différents isomères ont également été identifiés d'une manière identique. Quelques profils chromatographiques des échantillons sont mentionnés en annexe 4.

Les pourcentages relatifs déterminés renforcent une fois de plus ce qui a été indiqués pour les échantillons 2015(partie V.2.4.3). Globalement l'isomère l'α-tocophérol domine dans les huiles des fruits immatures tandis que l'isomère γ-tocophérol domine dans les huiles des fruits matures.

Tableau 31: Pourcentage des isomères α et γ tocophérols (%) dans les huiles des fruits de *P. atlantica* 2016.

Echantillons	α -Toc	γ -Toc
GA1-VC-	76,81	23,19
GA2-JR-	60,27	39,73
GA2-V-	50,94	49,06
GB1-VC-	69,31	30,69
GB2-JR-	63,78	36,22
GB2-V-	56,5	43,50
GC2-JR-	69,51	30,49
GC2-V-	64,49	35,51
HDA2-JR-	69,41	30,59
HDA3-JR-	81,39	18,61
HDA3-N-	46,21	53,79
HDA4-JRN-	40,26	59,74
HDA4-N-	47,40	52,6
HDB1-VC-	72,77	27,23
HDB2-JR-	61,66	38,34
HDB3-JRN-	78,46	21,54
HDB3-N-	67,46	32,54
HDB4-JN-	41,20	58,8
HDB4-N-	41,18	58,82
Moyenne immature	70,34 \pm 6,77	29,66 \pm 6,77
Moyenne mature	50,63 \pm 9,58	49,37 \pm 9,58

VII.6 L'évaluation du pouvoir antioxydant des huiles des fruits des *Pistacia atlantica*

VII.6.1 Test de piégeage d'un radical libre le DPPH

L'activité antioxydante des huiles est exprimée par le facteur EC50 mg/ml. Les valeurs de l'EC50 déterminées sont résumées dans le tableau 32.

Tableau 32 : Les valeurs de l'EC50 calculé pour les différents extraits lipidiques des fruits de 2016 de maturité différente lors de test DPPH.

Standard	EC ₅₀ (mg/ml)	Echantillons immatures	EC ₅₀ (mg/ml)	Echantillons matures	EC ₅₀ (mg/ml)
Vit E	0,027	GB1-VC-	2,81	GA2-V-	11,31
		HDA1-VC-	3,89	GC2-V-	11,77
		GC1-VC-	4,33	GB2-V-	11,84
		HDA2-JR-	4,51	HDA3-N-	12,6
		HDB1-VC-	4,68	HDB3-N-	14,07
		GC2-JR-	4,84	HDA4-N-	17,62
		GB2-JR-	5,37	HDB4-N-	21,70
		HDA3-JR-	5,66	-	-
		HDA4-JRN-	6,01	-	-
		HDB2-JR-	5,96	-	-
		HDB3-JRN-	6,66	-	-
		HDB4-JN-	6,76	-	-
		GA1-VC-	9,49	-	-
		GA2-JR-	9,72	-	-
		Moyenne	5,76 ±1,95	Moyenne	14,52 ±3,82

Les valeurs d'EC50 varient de 2,81 mg/ml à 21,70mg/ml. Comme les stérols et les tocophérols, nous constatons que toujours les huiles provenant des fruits immatures sont les plus actives. La majorité des échantillons d'Elghaicha sont les plus actifs. Ce qui confirme l'influence des facteurs environnementaux sur la composition et l'activité des extraits lipidiques.

VII.6.2 Relation entre la teneur en tocophérols et le pouvoir anti-radicalaire

Partant de ces données, nous avons essayé de trouver une relation entre les teneurs en tocophérols totaux et l'EC50 pour l'ensemble de la série d'étude et ce en traçant une régression linéaire reliant ces deux paramètres avec calcul du coefficient de corrélation r (Figure 44).

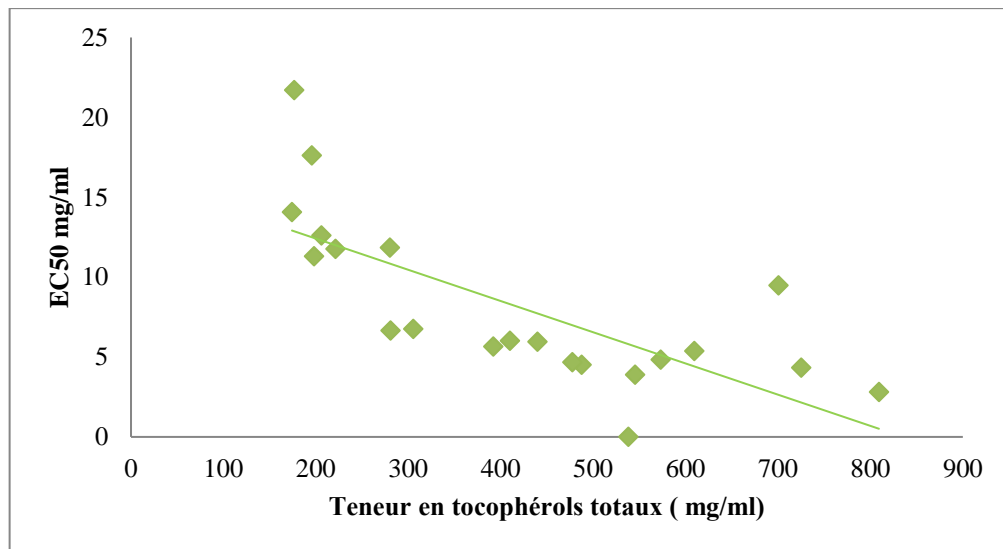


Figure 44: Régression linéaire de la corrélation entre le taux de tocophérols et l’EC50 des extraits huileux.

Nous remarquons une forte corrélation négative entre le taux de tocophérols et l’EC50. Le coefficient de corrélation obtenu est -0,72 (corrélation négative). Ainsi, plus l’extrait est riche en tocophérol, plus son pouvoir antioxydant est important. Toutefois cette valeur est assez proche trouvée pour les échantillons 2015, ce qui montre le rôle des tocophérols dans l’activité antioxydante.

VII.7 Analyse de données concernant les paramètres étudiés

L'analyse des composantes principales (ACP) pour les échantillons de fruits a permis d'avoir les données mentionnées dans le tableau 33 et la figure 45.

La matrice de corrélation de Pearson indique qu'en plus de la corrélation négative significative obtenue entre la teneur en tocophérols et l'EC50, il y a une très forte corrélation négative ($r = -0,84$) entre le rendement d'extraction huileuse et la teneur en stérols totaux signifiant que plus le rendement augmente moins l'extrait est riche en stérols.

Tableau 33 : Matrice de corrélation de Pearson de 2016.

Variables	Tocophérol	Stérol	Rendement	EC50
Tocophérol	1	0,97	-0,80	-0,72
Stérol		1	-0,84	-0,80
Rendement			1	0,86
EC50				1

La distribution des différents échantillons des fruits par rapport aux quatre paramètres étudiés montre leur caractère distinctif (Figure 45).

Deux groupes distincts sont obtenus, le premier englobe les échantillons de couleur vert- clair et jaune rouge (immatures) caractérisé par un rendement faible mais une richesse en stérols et tocophérols totaux associé à une très forte activité antioxydante. Le deuxième est dominé largement par les fruits matures de couleur verte ou noire dont le rendement d'extraction en huile est le plus élevé mais avec des niveaux en tocophérols et stérols totaux largement inférieurs. Ils sont également caractérisés par des EC50 élevés d'où leur faible activité antioxydante.

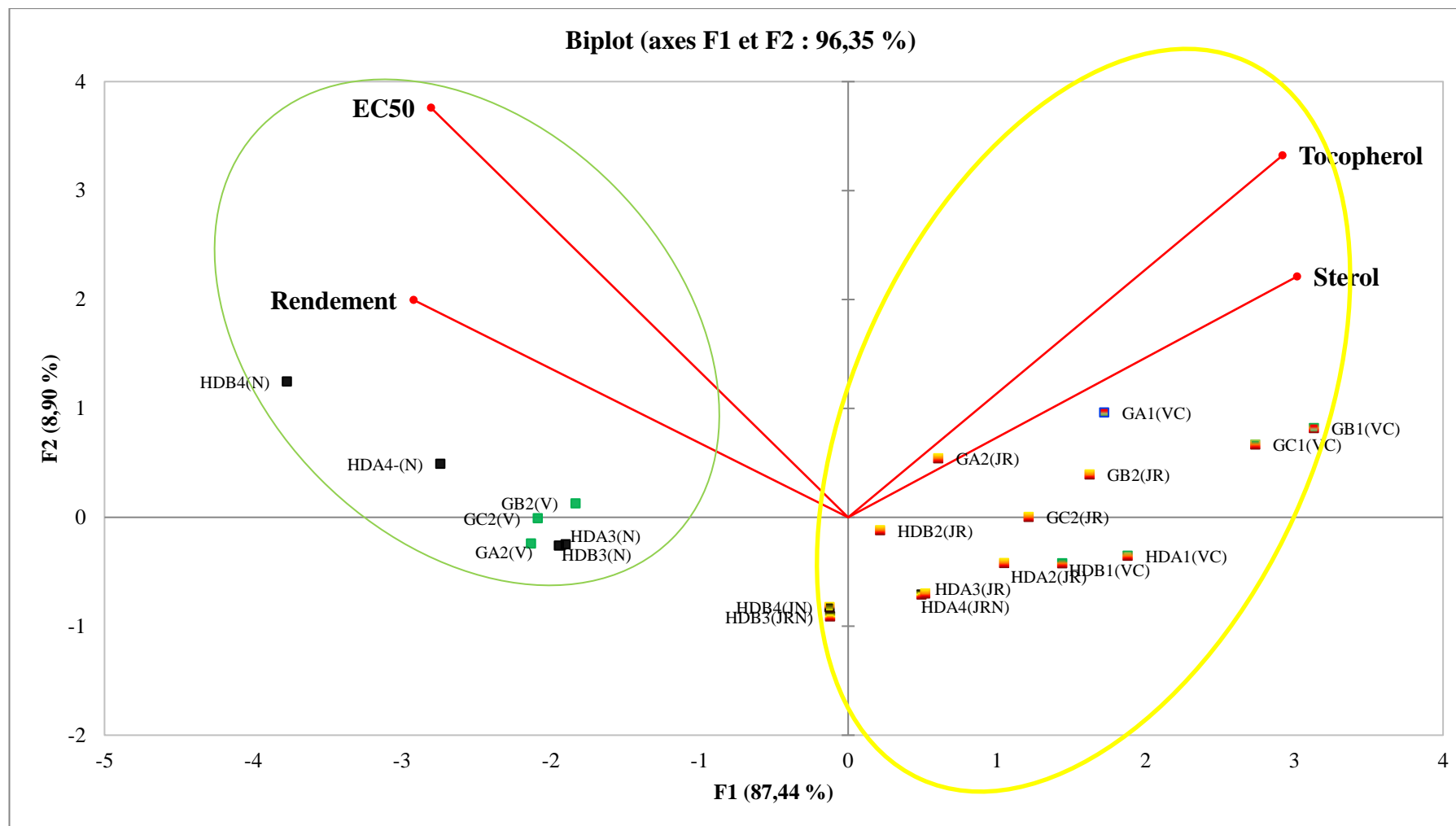


Figure 45: Représentation graphique de la distribution des échantillons en fonction des 4 variables différentes.

VII.8 Analyse quantitative des fractions insaponifiables

VII.8.1 Taux de la fraction insaponifiable des huiles

Les taux en insaponifiables présentés dans la figure 46, sont élevées pour l'ensemble des échantillons immatures par rapport aux échantillons matures. Ce résultat est déjà confirmé pour les échantillons 2015.

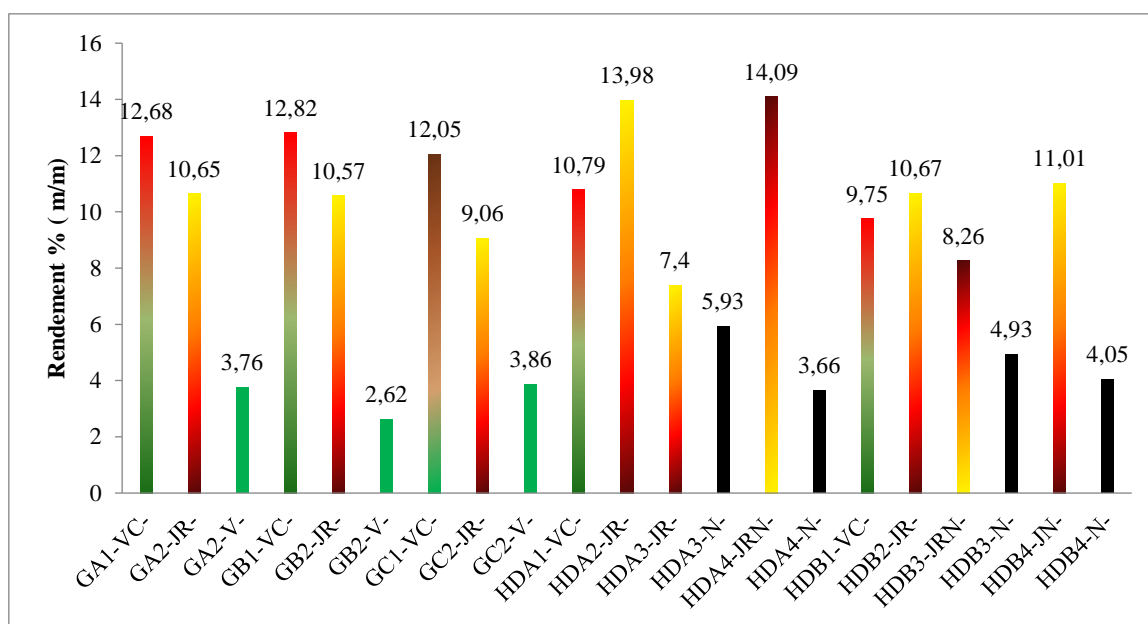


Figure 46: Taux de la fraction insaponifiable des huiles de fruits de *Pistacia atlantica*.

Nos résultats indiquent entièrement une variation du taux de la fraction insaponifiable selon la couleur des fruits et partant leur degré de maturité. Il semble que ce taux diminue avec la maturation des drupes.

VII.8.2 Teneur des stérols et tocophérols totaux dans les insaponifiables

Le tableau 34 récapitule les teneurs en stérols et en tocophérols totaux au niveau de la fraction insaponifiable, les résultats sont respectivement fournis en milligrammes équivalents de cholestérol et en milligrammes équivalents de vitamine E par gramme de matières insaponifiables.

Tableau 34: Teneurs en stérols et en tocophérols totaux dans la fraction insaponifiable d'huile des fruits de *Pistacia atlantica* 2016.

Echantillons Immatures	Teneur (mg/g)	Echantillons Matures	Teneur (mg/g)
Stérols			
HDA4-JRN-	81,69± 0,31	HDA4-N-	73,73 ± 0,76
GC2-JR-	113,22± 0,57	GC2-V-	79,78 ± 0,35
HDB3-JRN-	116,57 ± 0,09	HDA3-N-	103,67 ± 0,64
HDB4-JN-	124,37 ± 0,64	HDB3-N-	107,81 ± 0,57
GA2-JR-	130,9 ± 0,22	HDB4-N-	108,44 ± 0,48
HDA2-JR-	132,81 ± 0,79	GA2-V-	111,47 ± 0,26
GB2-JR-	148,57 ± 0,13	GB2-V-	128,35 ± 0,74
HDA1-VC-	171,98 ± 0,95	-	-
HDB2-JR-	160,2 ± 0,46	-	-
GA1-VC-	172,14 ± 0,75	-	-
GC1-VC-	179,31 ± 0,49	-	-
GB1-VC-	180,58 ± 0,3	-	-
HDB1-VC-	221,66 ± 0,14	-	-
HDA3-JR-	235,04 ± 0,29	-	-
Tocophérols			
HDA4-JRN-	5,09 ± 0,45	HDA3-N-	10,14 ± 0,45
GA1-VC-	5,15 ± 0,21	HDB4-N-	10,54 ± 0,32
GC1-VC-	5,72 ± 0,17	HDB3-N-	10,61 ± 0,62
HDB4-JN-	6,53 ± 0,07	HDA4-N-	12,55 ± 0,41
GC2-JR-	6,7 ± 0,43	GA2-V-	13,53 ± 0,18
HDA2-JR-	6,8 ± 0,74	GC2-V-	13,63 ± 0,25
GB1-VC-	6,91 ± 0,68	GB2-V-	14,64 ± 0,31
GA2-JR-	7,06 ± 0,41	-	-
HDA3-JR-	7,11 ± 0,26	-	-
HDB2-JR-	7,99 ± 0,37	-	-
GB2-JR-	8,53 ± 0,21	-	-
HDB3-JRN-	9,85 ± 0,84	-	-
HDA1-VC-	11,22 ± 0,9	-	-
HDB1-VC-	11,72 ± 0,52	-	-

Globalement, nous ne remarquons pas de variation significative de ces deux paramètres concernant la couleur des fruits ou la date de collecte encore moins selon l'emplacement géographique.

Nous avons déterminé la proportion de l'ensemble stérols/tocophérols par rapport à la matière insaponifiable (Tableau 35) afin de découvrir une éventuelle variation.

Tableau 35: Pourcentages des stérols et tocophérols dans la fraction insaponifiable d'huile de fruits de *Pistacia atlantica* 2016.

Echantillon	Stérols / tocophérols rate (%)	Autres (%)
GA1-VC-	33,44	66,56
GA2-JR-	18,54	81,46
GA2-V-	8,24	91,76
GB1-VC-	26,14	73,86
GB2-JR-	17,42	82,58
GB2-V-	8,77	91,23
GC1-VC-	31,35	68,65
GC2-JR-	16,89	83,11
GC2-V-	5,85	94,15
HDA1-VC-	15,32	84,67
HDA2-JR-	19,53	80,47
HDA3-JR-	33,04	66,96
HDA3-N-	10,23	89,77
HDA4-JRN-	16,04	83,96
HDA4-N-	5,87	94,13
HDB1-VC-	18,92	81,08
HDB2-JR-	20,06	79,94
HDB3-JRN-	11,84	88,16
HDB3-N-	10,16	89,84
HDB4-JN-	19,03	80,97
HDB4-N-	10,28	89,72

Nous constatons pour les échantillons d'Elghaicha une variation dans le même sens du rapport entre les teneurs en stérols et tocophérols selon la couleur des fruits. Pour les arbres de Hassi Delaà cette variation n'est dans le même sens. Ceci pourrait refléter l'effet de facteurs propres à chaque arbre qui nécessite des investigations plus approfondies. Les autres constituants de la fraction insaponifiable (pigments, hydrocarbures, alcools tri terpéniques,...) sembleraient être majoritaires.

VII.8.3 Evaluation du pouvoir antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de *Pistacia atlantica* par le test DPPH

Les figures ci-dessous présentent le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de la matière insaponifiable pour les vingt-un échantillon sont indiqués dans les figures respectives 47, 48, 49, 50, 51, 52 et 53.

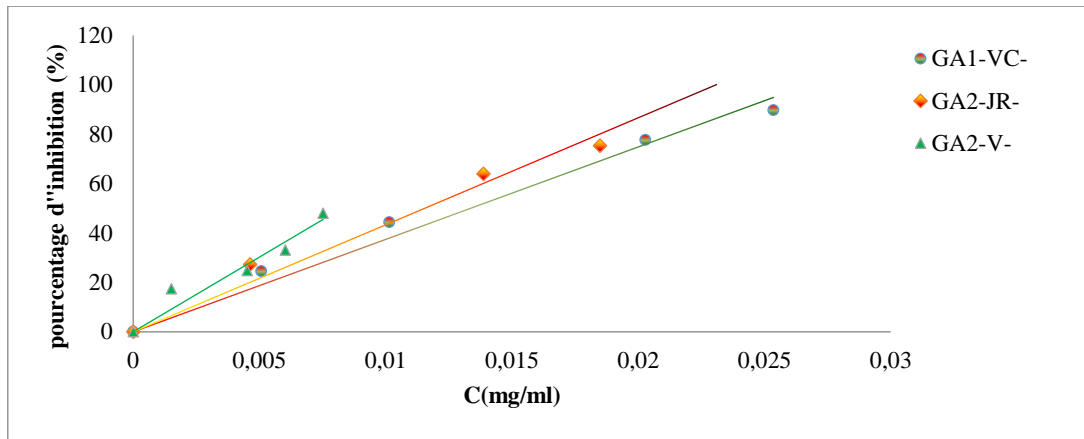


Figure 47: Graphe représentant l'activité antioxydant des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre A de l'ElGhaicha (deux collectes).

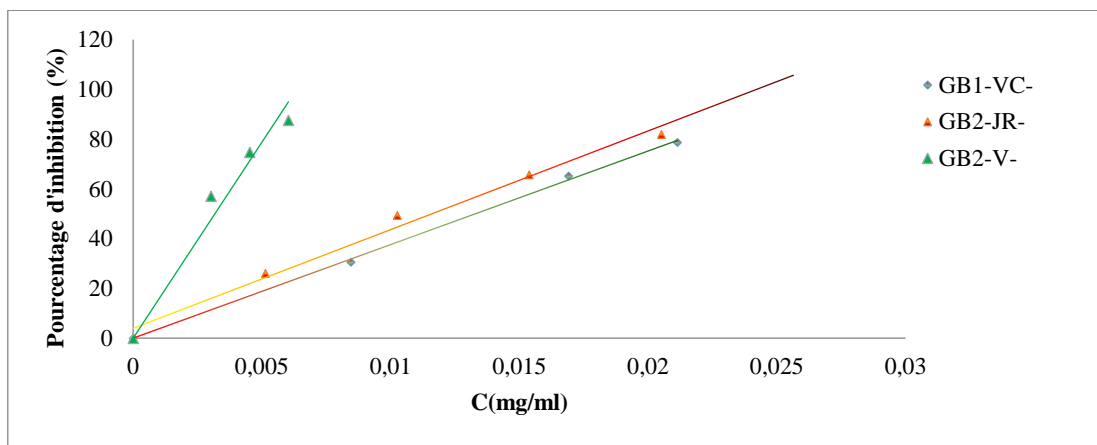


Figure 48: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre B de l'Elghaicha (deux collectes).

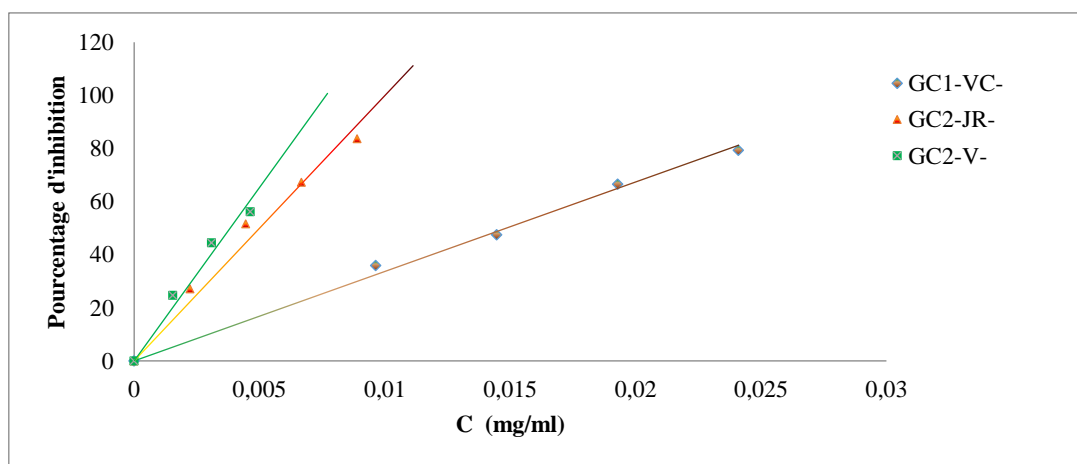


Figure 49: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre C de l'Elghaicha (deux collecte).

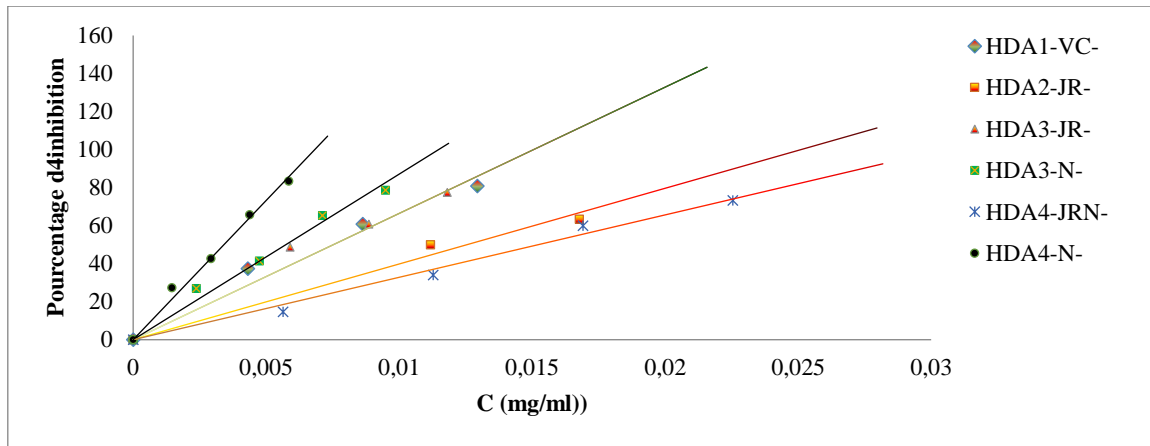


Figure 50: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre A de Hassi Delaà 4de différents couleurs issus de quatre collectes différentes.

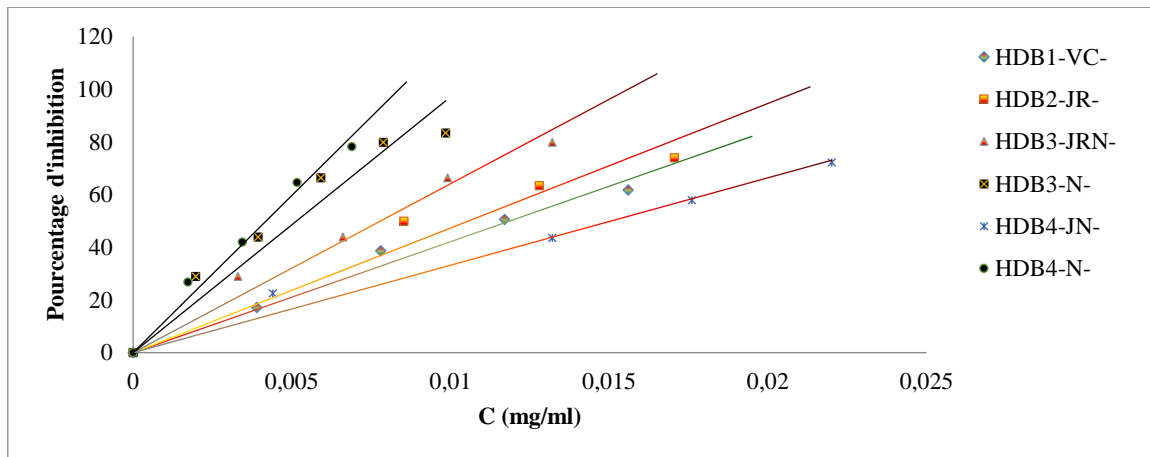


Figure 51: Graphe représentant l'activité antioxydante des fractions insaponifiables des huiles de fruits de l'arbre B de Hassi Delaà de différents couleurs issus de quatre collectes différentes.

A partir de ces figures, on remarque que les fractions insaponifiables des échantillons matures de tous les arbres du site d'Elghaicha (3 arbres) ont le pouvoir antioxydant le plus élevé. La même constatation a été notée pour les cinq échantillons issus de l'arbre d'Elghaicha collectés en 2015. Ceci pourrait être justifié par l'influence des facteurs environnementaux. Par contre, d'une manière générale nous ne notons pas de relation tangible entre le degré de maturation et l'activité antioxydante de la fraction insaponifiable pour les échantillons de Hassi Delaà (figure 52).

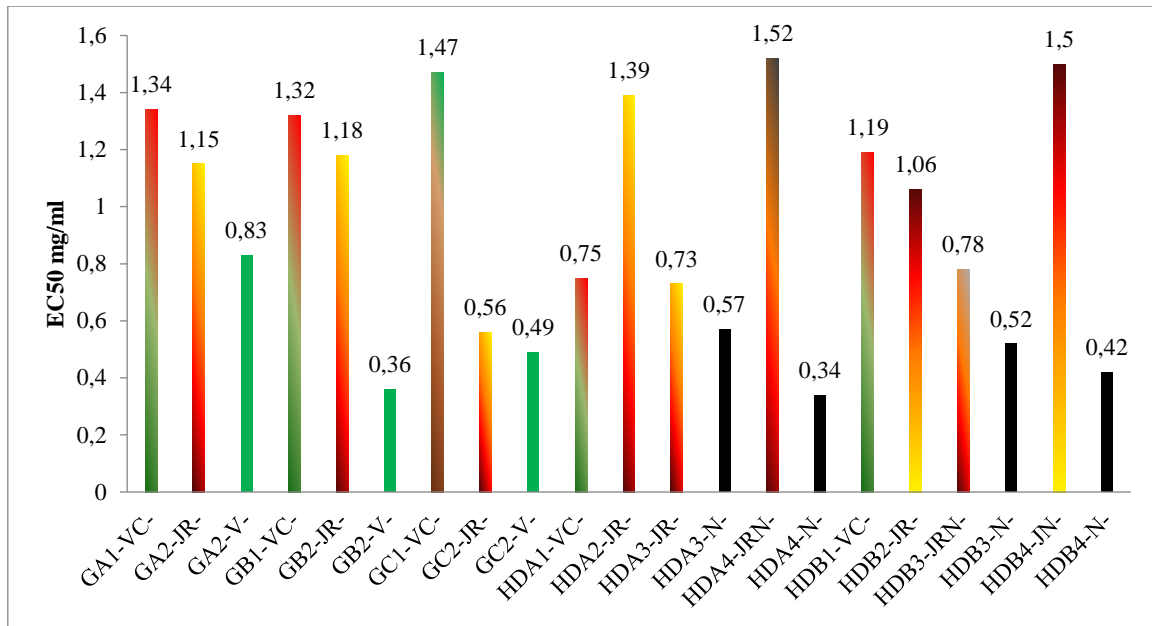


Figure 52: EC50 calculée pour les différentes fractions insaponifiables des huiles de fruits de maturité différente.

La régression linéaire entre les teneurs en tocophérols et les valeurs d'EC50 pour les fractions insaponifiables sont présentées en figure 53. Le coefficient de corrélation calculé est assez moyen ($r = -0,54$) indiquant un rôle modéré des tocophérols dans l'activité antioxydante de la matière insaponifiable.

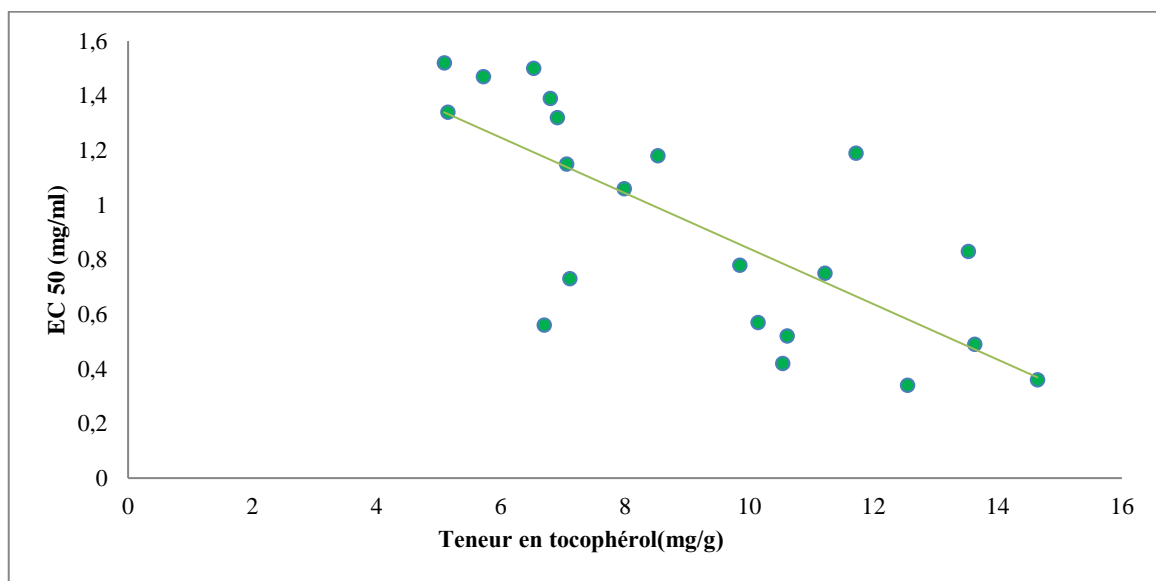


Figure 53: Régression linéaire entre le taux de tocophérols et l'EC50 des différentes fractions insaponifiables.

Comme il a été rapporté pour les échantillons 2015, l'activité antioxydante de la fraction insaponifiable augmente en fonction de la maturation des fruits. Ceci sera dû à la présence de molécules antioxydantes (les composés insaponifiables mineurs).

VII.9 Etude des composés phénoliques au niveau des tourteaux et au niveau des mélanges huiles correspondantes

VII.9.1 Extraction des polyphénols et analyse quantitative (dosage des phénols totaux, Flavonoïdes) à partir des tourteaux

Après délipidation des tourteaux, les composés phénoliques sont extraits en suivant la même procédure utilisée pour la première série. Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les échantillons des tourteaux ont été déterminées à partir des courbes d'étalonnage respectives d'acide gallique et de quercétine (annexe 5). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique et en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de matière végétale (Tableau 36). Chaque valeur est la moyenne de trois essais.

Tableau 36: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les 21 échantillons d'extrait phénoliques des tourteaux.

Echantillons	Masse d'extrait brut(g)	Rendement (%)	Teneurs en phénols totaux (mg/g)	Teneur en Flavonoïde (mg/g)	Pourcentage des Flavonoïdes par rapport aux phénols totaux (%)
GA1-VC-	0,84	8,46	22,67 ± 0,7	1,97 ± 0,11	8,69
GA2-JR-	0,58	5,78	19,51 ± 0,38	2,12 ± 0,12	10,87
GA2-V-	0,41	4,08	17,32 ± 0,69	2,43 ± 0,07	14,03
GB1-VC-	0,56	5,6	44,68 ± 0,04	1,56 ± 0,23	3,49
GB2-JR-	0,6	6,04	34,26 ± 0,41	2,2 ± 0,15	6,42
GB2-V-	0,29	2,87	22,69 ± 0,36	3,5 ± 0,34	15,43
GC1-VC-	0,35	3,51	25,07 ± 0,21	1,68 ± 0,7	6,7
GC2-JR-	0,44	4,38	21,77 ± 0,97	2,02 ± 0,04	9,28
GC2-V-	0,28	2,84	17,4 ± 0,19	2,44 ± 1,38	14,03
Moyenne pour les immatures d'Elghaicha			27,99	1,92	
Moyenne pour les matures d'Elghaicha			19,13	2,79	
HDA1-VC-	0,55	5,55	32,54 ± 0,73	1,26 ± 0,09	3,87
HDA2-JR-	0,65	6,45	37,71 ± 0,25	1,46 ± 0,16	3,87
HDA3-JR-	0,48	4,84	24,19 ± 0,21	1,88 ± 0,54	7,77
HDA3-N-	0,48	4,77	16,96 ± 0,45	2,19 ± 0,13	12,91
HDA4-JRN-	0,47	4,74	15,7 ± 0,08	1,66 ± 0,49	10,57
HDA4-N-	0,28	2,79	11,15 ± 0,082	2,75 ± 0,23	24,66
HDB1-VC-	0,55	5,45	30,81 ± 0,33	0,94 ± 0,14	3,05
HDB2-JR-	0,69	6,89	32,01 ± 0,04	1,02 ± 0,01	3,19
HDB3-JRN-	0,73	7,32	23,58 ± 0,08	1,12 ± 0,03	4,75
HDB3-N-	0,33	3,35	16,58 ± 0,33	1,88 ± 0,14	11,34
HDB4-JN-	0,31	3,11	13,08 ± 0,16	1,25 ± 0,09	9,56
HDB4-N-	0,22	2,21	10,24 ± 0,08	2,36 ± 0,08	23,05
Moyenne pour les immatures de Hassi Delaà			26,20	1,32	
Moyenne pour les immatures de Hassi Delaà			13,73	2,29	
Moyenne pour les immatures	0,55±0,14		26,97 ± 8,76	1,58 ± 0,42	6,58 ± 2,88
Moyenne pour les matures	0,33±0,09		16,05 ± 4,21	2,51 ± 0,51	16,49 ± 5,20

Les résultats du tableau 36, montrent que la teneur en phénols totaux varie de la même manière que celle observée pour les échantillons 2015 à savoir une augmentation en fonction du degré de maturation. Pour la présente série, nous notons avec intérêt un effet des facteurs environnementaux traduit par des teneurs assez importantes en phénols totaux notamment pour les fruits matures. En effet la contenance en phénols totaux est significativement élevée au niveau des fruits matures d'Elghaicha ($19,13 \pm 2.5$ mg/g contre $13,73 \pm 3$ mg/g $p < 0,05$). Nous rappelons que notre étude et celle de **Guersasse 2018** sont les premières qui montrent l'impact de l'altitude sur la teneur en composés phénoliques. Dans la littérature, il a été rapporté, pour plusieurs espèces végétales, que la teneur en métabolite secondaires dont les composés phénoliques augmentent considérablement en fonction de l'altitude (**Kumar et al., 2006; Misra et Srivastava. 2011 ; Ni et al., 2014 ; Khajehzadeh et al., 2014**). Cet effet pourrait être expliqué par l'augmentation de l'indice UV dans les sites les plus élevés, ce qui conduit à un effet plus oxydatif. Dans ces conditions et comme stratégie d'adaptation, les plantes fournissent plus de molécules à activité antioxydantes (**Stapleton ,1992 ; Kliebenstein et al., 2002 ; Bassman., 2004 ; Santos, et al., 2013 ; Liu et al., 2013 ; Kataria., 2014 ; Wong., 2015**).

Les résultats relatifs à la teneur en flavonoïdes, montrent des valeurs proches, contrairement à ce qui a été indiqué pour les échantillons 2015. Nous pouvons expliquer ce résultat par des facteurs propres à la saison, propres à l'arbre (facteurs génétiques, l'âge de l'arbre et l'éventuel présence d'endophytes) ou propres au site (le sol, l'ensoleillement,...). Nous rappelons que le site d'étude de Hassi Delaà est inclut pour la première fois dans l'étude. Ceci renseigne sur la présence d'autres composés phénoliques différents des flavonoïdes notamment pour les échantillons d'Elghaicha.

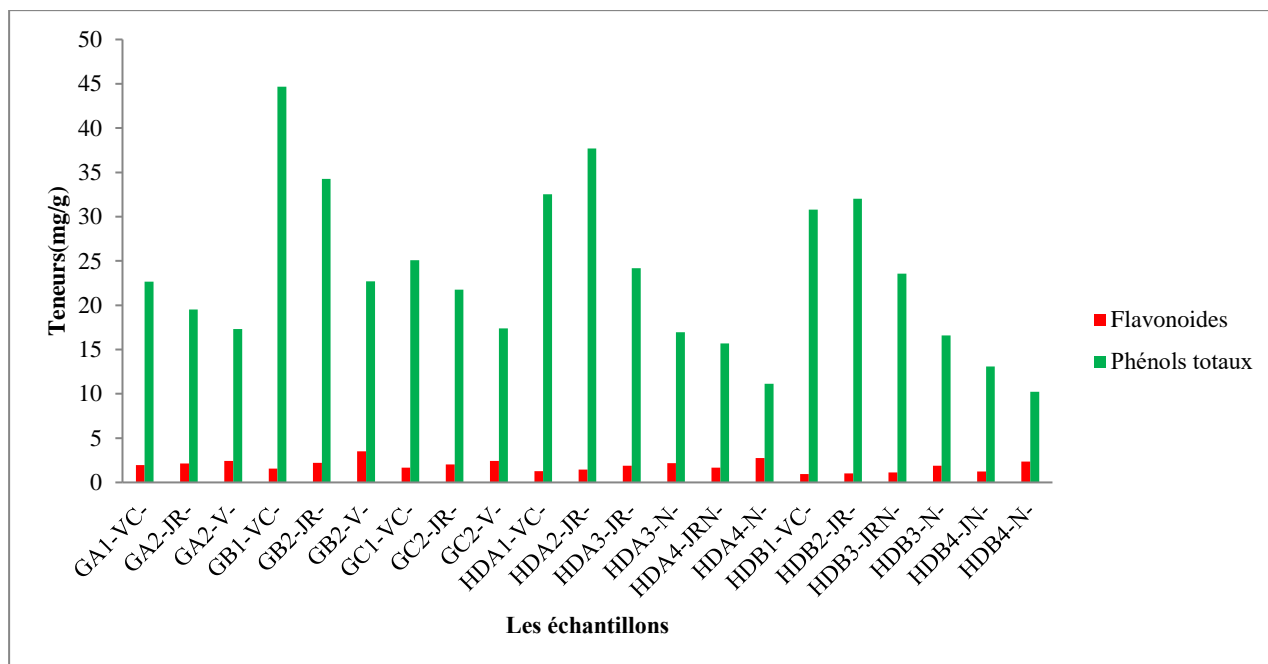


Figure 54: Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes pour les extraits des composés phénoliques des tourteaux.

La comparaison des cinq arbres montre des différences notables signifiant des variations d'un arbre à un autre (figure 54). Nous relevons une différence importante entre les arbres de l'Elghaicha. Nous nous interrogeons si cette différence entre fruits collectés simultanément à partir du même site n'était due à des facteurs propres à chaque arbre (âge, facteurs génétiques, présence d'éventuelles endophytes,...).

VII.9.2 Extraction des polyphénols et analyse quantitative (dosage des Phénols totaux, Flavonoïdes) à partir des huiles

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique et en milligrammes équivalents de quercétine par kilogramme d'huile respectivement pour les phénols totaux et les flavonoïdes.

Tableau 37: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les mélanges huileux.

Mélanges huileux	Masse d'huiles (g)	Masse d'extrait phénolique brut (g)	Rendement d'extraction phénolique	Teneurs des phénols totaux (mg /kg)	Teneurs des Flavonoïdes (mg /kg)	Pourcentage des Flavonoïdes par rapporte aux phénols totaux (%)
Mél 1 (Immature)	30,68	0,19	0,61	34,55 ± 0,56	8,65 ± 0,29	25,04
Mél 2 (Mature)	30,38	0,07	0,18	11,98 ± 0,31	4,11 ± 0,47	34,31
Mél 3 (Immature)	30,57	0,16	0,53	27,29 ± 0,44	6,55 ± 0,13	24,00
Mél 4 (mature)	30,78	0,05	0,16	10,42 ± 0,28	3 ± 0,16	28,79

Comme il a été rapporté pour les échantillons 2015, les mélanges des fruits immatures marquent le rendement d'extraction phénolique le plus élevé.

Les phénols totaux des huiles gardent le même changement de ceux des tourteaux. En effet, nous marquons une diminution de leurs teneurs au cours de la maturation des drupes (34,55 et 11,98mg/kg pour respectivement Mél 1 et Mél 2). Ce constat est étayé par le calcul du coefficient de corrélation entre la teneur en phénols totaux des huiles et celle dans les tourteaux (tableau 38). Nos résultats sont concordants avec ceux de 2015 à l'exception de ce qui concerne la proportion des flavonoïdes dans les échantillons immatures (24 à 25 % pour 2016 contre 65% pour 2015). Ceci pourrait être interprété par l'effet des mêmes facteurs cités précédemment (saisons, site, endophytes....)

Tableau 38 : Comparaison entre les teneurs phénoliques de mélanges des huiles et les moyennes en teneurs phénoliques des extraits phénoliques des tourteaux de fruits de chaque mélange d'huile.

Echantillons	Teneur phénolique moyennes pour les tourteaux mg/g	Teneur phénolique pour les huiles mg/g	Coefficient de corrélation entre teneur phénolique dans les tourteaux et les huiles (r)
Mél 1	27,99 ± 9,47	0.035 ± 1.24	0,95
Mél 2	19,14 ± 3,08	0.012 ± 1.78	
Mél 3	26,20 ± 8,62	0.027 ± 0.94	
Mél 4	13,73 ± 3,53	0.010 ± 0.72	

VII.9.3 Activités antioxydants au niveau des extraits phénoliques des tourteaux et au niveau des huiles

VII.9.3.1 Résultat d'évaluation de pouvoir antioxydant des extraits phénoliques bruts des tourteaux contre le radical libre DPPH°

Les valeurs d'EC50 pour les extraits phénoliques des tourteaux des fruits récoltés en 2016 sont rapportées dans le tableau 39. A partir de ces valeurs, on remarque que les extraits phénoliques des tourteaux des fruits récoltés très précocement se révèlent les plus actifs (de 27,83 à 31,51 $\mu\text{g/ml}$).

Globalement les présentes valeurs d'EC50 indiquent une activité moindre par rapport aux échantillons de 2015. Cette diminution pourrait être attribuée à plusieurs facteurs à savoir : variation de saison, le site, facteurs propres à l'arbre. Par ailleurs, les échantillons d'Elghaicha sont plus antioxydants (31,3 $\mu\text{g/ml}$ contre 38,09 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits de fruits immatures et 50,82 $\mu\text{g/ml}$ contre 62,46 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits matures). Ceci est concordant avec les résultats discutés précédemment relatifs aux phénols totaux et témoigné par la valeur significative du coefficient de corrélation entre ces deux paramètres (-0,71).

Tableau 39: Activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux brutes exprimé par EC50.

Echantillons	EC50
GA1-VC-	30,48
GA2-JR-	34,35
GA2-V-	54,44
GB1-VC-	29,43
GB2-JR-	31,57
GB2-V-	57,89
GC1-VC-	30,39
GC2-JR-	31,63
GC2-V-	40,15
HDA1-VC-	27,83
HDA2-JR-	35,30
HDA3-JR-	38,27
HDA3-N-	58,13
HDA4-JRN-	40,9
HDA4-N-	65,65
HDB1-VC-	31,51
HDB2-JR-	36,67
HDB3-JRN-	45,88
HDB3-N-	62,70
HDB4-JN-	48,43
HDB4-N-	63,37
Moyenne pour les immatures	35,19±6.24
Moyenne pour les matures	57,48±8.55
Acide ascorbique	5.71

VII.9.3.2 Analyse quantitative et évaluation du pouvoir antioxydant des composés des mélanges des huiles par test de piégeage du radical libre DPPH°

Pour évaluer l'activité antioxydante des huiles, nous nous sommes intéressés à l'étudier avant et après l'extraction des composés phénoliques. Nous constatons, comme il a indiqué pour les échantillons de 2015, une diminution de la teneur en tocophérols totaux ainsi que de l'activité antioxydante après extraction phénolique (tableau 40). Ceci montre que le dosage colorimétrique n'est parfaitement spécifique où des effets interférents augmentent l'absorbance et par conséquent la quantité des tocophérols totaux. D'autre part la diminution de l'activité antioxydante après extraction des composés phénoliques indique clairement leur implication dans cette activité.

La comparaison selon la localisation géographique des arbres montre que les huiles des fruits d'Elghaicha recèlent un contenu phénolique plus actif que celui des huiles des fruits de Hassi Delaà (82,7µg/ml contre 95,68µg/ml pour les fruits immatures et 297,13µg/ml contre

324,76µg/ml pour les fruits matures, tableau 41). Ce résultat qui est en accord avec ce qui a été rapporté précédemment pour les paramètres étudiés montre encore une fois l'effet des facteurs environnementaux.

Tableau 40: Teneurs en tocophérols totaux et activités antioxydants des huiles (exprimée par EC50) avant et après extraction des polyphénols.

	Avant extraction des composés phénoliques		Après extraction des composés phénoliques	
	Teneurs en tocophérols (mg/100g)	Les valeurs d'EC50 (mg/ml)	Teneurs en tocophérols (mg/100g)	Les valeurs d'EC50 (mg/ml)
Mél 1 (huile)	487,3	6,96	239,5	16,03
Mél 2 (huile)	184,7	20,13	93,1	34,53
Mél 3 (huile)	415,3	9,7	203,5	18,06
Mél 4 (huile)	155,8	21,46	66,9	38,01

Tableau 41: Activité antioxydante (exprimé par EC50) des extraits phénoliques des huiles.

Les mélanges des huiles	EC50 µg/ml
Mél 1	82,7
Mél 2	297.13
Mél 3	95.68
Mél 4	324.76

Conclusion générale et Perspectives.

Conclusion générale et Perspectives.

Dans cette contribution, nous nous sommes intéressés à étudier la composition et l'activité antioxydante d'extraits lipidiques et phénoliques des fruits du Pistachier de l'Atlas de différents degrés de maturité et de différents emplacements géographiques.

Nos résultats ont confirmé la diminution, en fonction de la progression de la maturation des fruits, de la proportion des acides gras insaturés, du taux de la matière insaponifiable, de la teneur en tocophérols et stérols totaux, de la contenance en composés phénoliques au niveau des huiles et des tourteaux ainsi que de l'activité antioxydante des extraits lipidiques et phénoliques. Le rendement d'extraction des huiles est le seul paramètre qui augmente en fonction de la maturation des drupes.

Le présent travail nous a, également, permis de dégager des conclusions que nous rapportons pour la première fois d'où leur aspect original. Nous les récapitulons comme suit :

- ✓ L'huile de fruits collectés très précocement (début juillet) contient un pourcentage non négligeable en acide linoléique dont les vertus diététiques ne sont plus à démontrer.
- ✓ La proportion de l' α -tocophérol est considérablement élevée au niveau des huiles des fruits immatures. Elle diminue, le long de la maturation, au profil de celle de γ -tocophérol.
- ✓ Contrairement à ce qui a été trouvé pour les huiles, l'activité anti radicalaire (DPPH) de la matière insaponifiable des huiles des fruits mûrs est plus importante par rapport à celle d'échantillons immatures indiquant ainsi la présence, à des niveaux significatifs, d'autres composés très actifs différents des tocophérols et des stérols.
- ✓ L'activité antioxydante des huiles des fruits immatures serait principalement due aux composés phénoliques. Pour les fruits mûrs, elle serait due principalement à la fraction insaponifiable.
- ✓ Les facteurs environnementaux propres aux sites d'étude en particulier dans les régions montagneuses auraient un impact certain sur plusieurs paramètres. En effet, le taux des acides gras insaturés, le taux de l'insaponifiable et l'activité antioxydante des extraits huileux sembleraient légèrement augmenter à haute altitude. Cette augmentation est beaucoup plus prononcée pour les métabolites secondaires (composés phénoliques).

En dépit, de la faible teneur en huile, les fruits immatures de *P. atlantica* pourraient constituer une source majeure de composés bénéfiques tels que les acides gras linoléique et linoléique, les composés phénoliques et les molécules de la fraction insaponifiable. Ces composés semblent être des critères pour distinguer les premiers stades de maturation des fruits. L'emplacement géographique de l'arbre, en particulier dans les hautes altitudes, aurait une influence sur la composition et l'activité des extraits lipidique et phénolique. Pour nous, la présente étude et ses résultats constituent un outil de recherche de premier plan pour déterminer la date idéale de collecte des fruits de *Pistacia atlantica*. D'autres études sont nécessaires pour consolider ces résultats.

A titre de recommandations pour soutenir ce travail, nous suggérons :

- ✓ Étendre l'étude à un grand nombre d'échantillons avec plusieurs collectes depuis le début de la fructification jusqu'à la fin du temps du fruit, et ce afin de choisir le moment approprié pour la collecte.
- ✓ Sélection de plusieurs sites avec l'altitude comme variable.
- ✓ Elargissement du panel de tests aux essais *in vitro* (par culture cellulaire) et *in vivo* (modèles animaux) et recherche d'autres activités (anti inflammatoires, anticancéreuses,...).
- ✓ Détermination, par des procédés perfectionnés tels que la CLHP, des composés chimiques dans les extraits phénoliques responsables de l'activité antioxydante.
- ✓ Identification des molécules responsables de l'activité antioxydante dans la fraction insaponifiable de l'huile notamment au niveau des fruits mûrs.
- ✓ Mise en évidence des mécanismes (réactions métaboliques, enzymes, signalisation,...) conduisant à une diminution des acides gras insaturés, de la partie insaponifiable, des stérols, des tocophérols et des composés phénoliques dans les fruits tout au long de leur maturation.
- ✓ Pour approfondir, les molécules actives de cette plante doivent être isolées pour être testées, *in vivo*, afin de trouver une application thérapeutique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Alais, C. (2003).** Biochimie alimentaire. 5ème édition. Bunod. Paris. P 250.
2. **Alais, C., Linden, G. (1997).** Lipides, vitamines in Abrégé de biochimie alimentaire. Ed. Masson. Paris, pp 70-112.
3. **AL-Saghir M, G. (2006).** Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia (Anacardiaceae), Thèse, doc. Univ. Virginia.
4. **AL-Saghir M, G. (2010).** Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae) Based on Morphological Data. *Asian Journal of Plant Sciences*. 9(1) :27-35.
5. **Asset, G., Staels, B.B., Wolff, R.L., Baugé, E., Madj, Z., Fruchart, J.C., Dallongeville, J. (2002).** Effects of *Pinus pinaster* and *Pinus koraiensis* Seed Oil Supplementation on Lipoprotein Metabolism in the Rat. *Lipids*, Volume 34. 1 : 39–44.
6. **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2): 303–309.
7. **Baba, L., McGrath, I.M. (2008).** Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care* 8 Journal. 256-264.
8. **Barati, E., Marechal, L. (2008).** Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*. 43 : 309 - 311.
9. **Barrero, A.F., Herrador, M. M., Arteaga, J. F., Akssira, M., Mellouki, F., Belgarrabe, A., Blazquez, M. A. (2005).** Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 17(1), 52-54.
10. **Bassman, J. (2004).** Ecosystem Consequences of Enhanced Solar Ultraviolet Radiation: Secondary Plant Metabolites as Mediators of Multiple Trophic Interactions in Terrestrial Plant Communities. *Photochemistry and Photobiology*. 79(5): 382-398.
11. **Belhadj, S. (1999).** Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. *Nucis, Newsletter*. 8 : 29-30.
12. **Belhadj, S. (2001).** Les pistacheraies algériens: état actuel et dégradation. in Ak B.E. (ed.). XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds. Zaragoza: CIHEAM. Cahiers Options Méditerranéennes. 56 :107-109.
13. **BELHADJ, S. (2003).** Les pistacheraies Algériennes : Etat actuel et dégradation. Centre universitaire de Djelfa, 107-108.

14. **Belyagoubi-Benhammou. (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Thèse de doctorat Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen,174p.
15. **Benabderrahmane, M., Benali, M., Aouissat, H., Jordan Buesso, M-J. (2009).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. De l'Algérie. *Phytothérapie*. **7** :304-308.
16. **Benhassaini ,H., Mehdadi ,Z., Hamel ,L.,Belkhodja,M.M. (2007) .** Phytoécologie de *Pistacia atlantica* Desf. subsp. atlantica dans le Nord-ouest algérien. Sécheresse. N° 18 (3) :199-205.
17. **Benhassaini, Hachemi., Bendeddouche, F.Z., Mehdadi, Z&Romane, A. (2008).** GC/MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* Desf. subsp atlantica from Algeria. Natural Product Communications, 3(6), 929-932.
18. **Bereau D. (2001).** Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens. These de doctorat. Institut National Poly- technique de Toulouse.
19. **Boudy ,P. (1952).** Guide du forestier en Afrique du nord. Vol 1, Edit. La Maison rustique. Paris. 509p
20. **Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. S., Shams-Ardekani, M. R. Rahimi, R. (2013).** Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The ScientificWorld Journal*. **Volume 2013**: 1-33.
21. **Brisson, G.J. (1982) :** In : « Corps gras alimentaires et autres composés lipidiques : La signification des mots ». Lipides et nutrition humaine. Ed : Les presses de l'université laval. p 10-12.
22. **Brosse ,J. (2000) .**Larousse des Arbres :dictionnaire des arbres et des arbustes . Ed. Larousse, 576p.
23. **Carange, J. (2010).** Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection. Thèse de doctorat. Université du Québec Trois-Rivières.
24. **Center, S.A., Randolph, J.F. (2004).** Influence of SAME on erythrocytes and liver tissue in healthy cats (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol 14, p 357.
25. **Chalon, S., Vancassel, S., Zimmer, L., Guilloteau, D., Durand, G. (2001).** Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*, 36, 937-44.

26. **Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., (2014).** Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chem.* 145, 306–311.
27. **Charef, M. (2011).** Contribution à l'étude de la composition chimique et étude des propriétés phytochimiques et nutritionnelles des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus* et du *Quercus*. Thèse de Doctorat en sciences chimiques. Université Kasdi Merbah, Faculté des Sciences et de l'Ingénieur, Ouargla, 87 p.
28. **Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., Stocker, P. (2008).** Determination of fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia Lentiscus* seeds growing in Algeria . *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 921–924.
29. **Chavance, M., Herbert, B., Fournier, C., Janot. C., Vernhes. G. (1989).** Vitamin status, immunity, and infections in an elderly population. *Eur J Clin Nutr.*43 :825-37.
30. **Chikhi, A., Bensegueni, A. (2006).** Biochimie générale. Première partie, Constantine, DarAktab El Fikr , p 146.
31. **Claude, B.(2003).**Les vitamines dans les industries agroalimentaires., Editions TEC & DOC, pages 11, 74, 86 - 90, 274 - 277, 636 - 656.
32. **Cogny, A., Paul, J.L., Soni, T., Atger, V., Moatti, N.(1994).** Vitamine E: métabolisme et rôle dans l'athérosclérose. *Ann Biol Clin* 52, 515-522.
33. **Corbiere, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordji, K., Dauça, M., Netter, P., & Beneytout, J.L. (2003).** Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*.
34. **Cuvelier, C., Dotreppe, O., Istasse, L. (2003).** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E *Ann. Méd. Vét.* 147, 315-324.
35. **De la Puerta, R., Martinez-Dominguez, E., Ruiz-Gutierrez, V.(2000).** Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z. Naturforsch. C.* 55, 814-9.
36. **Deaton, CM., Marlin, DJ. (2003).** Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice.* Vol 2(3). 278-291.
37. **Debbache, M. (1998).** Développement de la culture du Pistachier, rapport de stage. TURQUIE.
38. **Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont, R. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 1 - 405.

39. **Delazar, A., Nazemieh, H., Modaresi, M & Afshar, J. (2003).** Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var. mutica.
40. **Desagher, S.(1998).**Métabolisme, édition : Ellipses, Marketing : 41p.
41. **Dweck, A.C. (2002).**Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal Care Mag*, 3(2):19-21.
42. **Ece, A., Gurkan, F., Celik, F., Boşnak, M., Yel, S., Balik, H., Erel, O. (2007).** Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clinical Biochemistry Journal*. Vol 40(9-10). 634-639.
43. **Emerenciano, V.P., Barbosa, K.O., Scotti, M.T., Ferriro, M.J.P.(2007).** Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*.18 (5) : 891-899.
44. **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*.331: 372-379.
45. **Favier, A. (1997).**le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix de marqueurs. *Ann. Biol. Clin.* 55:9-16.
46. **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.
47. **Favier, A. (2006).** Stress Oxydant et pathologies humaines, *Annals of Pharmacotherapy SAGE Journal*. Vol 64. 390-396.
48. **Fetati, A., Lassouani, A.,(2018).**Chemical Composition of Leaves and Fruitsof a South Algerian *Pistacia Atlantica* Desf. Ecotype.Springer International Publishing AG.1415-1417.
49. **Floss, H.G. (1997).** Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*.14 : 433-434.
50. **François, R. (1974).**Les industries des corps gras : biochimie, extraction, raffinage, nuisance et réglementation. Paris, Lavoisier,.P 36 – 53. ISBN :2.88020.007.5.
51. **Frenot, M., et Vierling, E. (2001).** Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. *Ed : Doin éditeurs, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux. p297.*
52. **Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, MR., Cesari, M. (2007).** Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging journal*. Vol 2(3). 377-87.

53. **Gaignaut, J.C., Bitdet, D., Gaillard, M., J. Perronnet, J. (1989).** Stérols et Stéroïdes, Partie, Paris, 11-35.
54. **Ghedira, k. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 3 (4) : 162-169.
55. **Gourine, N., Sifi, I., Gaydou, E .M., Yousfi, M. (2011).** Chemical composition of the essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. From Algeria. *Natural Products Journal*, 1, 125-127.
56. **Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P. & Gaydou, E.M. (2010).** Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops Products*, 31, 203-208.
57. **Govindan, N., Rajamohan, T. (2009).** Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 610-616.
58. **Guenane, H. (2017).** Activités biologiques des extraits lipidiques des fruits du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.). Thèse de Doctorat en sciences. Université Kasdi Merbah. Ouargla, 196p.
59. **Guenane, H., Bentireche, F., Bellakhdar, A., Ould Elhadj, M. D., Yousfi, M. (2017).** Total tocopherol content and antioxidant activity of fruit oil from *Pistacia atlantica* Desf. Growing wild in Algeria. *Der Pharma Chemica*, 9:153–157.
60. **Guenane, H., Bombarda, I., Ould Elhadj, M. D., & Yousfi, M. (2015).** Effect of maturation degree on composition of fatty acids and tocopherols of oil from *Pistacia atlantica* growing wild in Algeria. *Natural Product Communications*, 10:1723–1728.
61. **Guersasse, A. (2018).** دراسة فيتوكيميائية و النشاط المضاد للأكسدة للزيوت و المستخلصات الفينولية من الاوراق والثمار والعص للفسق الاطلسي مذكرة لنيل شهادة ماجستير في البيولوجيا المدسة العليا للاساتذة طالب عبد الرحمن الاغواط, p59.
62. **Guichardant, M., Bacot, S., Moliere, P., Lagarde, M. (2006).** Les biomarqueurs de la peroxidation lipidique. *Oléagineux, corps gras, lipids*. Vol 13(1). 31-34.
63. **Gul, M.K., Amar, S. (2006).** Sterols and the phytosterol content in oil seed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology*. 5:71-79.
64. **Harris, A.L. (2002).** Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2(1). 38-47.
65. **Haton, C. (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat. Université de Paris VI.

66. **Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. et Legrand, M. (2004).** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, 16 (6) : 1446- 1465.
67. **Hollman, PCH., van trip, JMP., buysman, MNCP. (1996).** Fluorescence detection of flavonols in HPLC by post-column chelation with aluminium. *Anal Chem.*68:3511-3515.
68. **Hughes, G.M.E.J., Boyland, N.J., Williams, L., Mennen, C., Scott, T.C., Kirkham, J. A., Harrold, H. G., Keizer, J. (2008).** Halford. *Lipids in Health and Disease*, 7:6.
69. **Iserin, P. (2001)** .Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins 2ième édition Ed Larousse/VUEF, pp13-16, p 250, pp291-296.
70. **Jacobs, E.J., Henion A.K., Briggs, P.J., Connell, C.J., McCullough, M.L., Jonas, C.R., Rodriguez, C., Calle, E.E., Thun, M.J. (2002).** Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women. *American Journal of Epidemiology* .156, 1002-10.
71. **Kaabeche K, Guenou G, Bouvard D, Didelot N, Listrat A, Marie PJ. (2005).** Cbl-mediated ubiquitination of alpha 5 integrin subunit mediates fibronectin-dependent osteoblast detachment and apoptosis induced by FGFR2 activation. *J Cell Science* 118:1223–1232.
72. **Kamal-Eldin,A., Gorgen,S., Pettersson,J., Lampi,A.M.(2000).** Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols Comparison of different chromatographic columns.*Journal of Chromatography*. 881 :217–227
73. **Karaali, A., Boyacioğlu, D., Güneş, G., Özçelik,B.(2004).** Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.
74. **Karleskind, A. (1992).** Manuel des corps gras. Edition : Lavoisier Tec et Doc, Tome 1, Paris.
75. **Kataria, S., Jajoo, A., Guruprasad, K-N. (2014).** Impact of Increasing Ultraviolet-B (UV-B) Radiation on Photosynthetic Processes. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 137: 55–66.

76. **Kening, Y., Vincenzo, D. L., Normand, B. (1995).** Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell*. 7 : 1787-1799.
77. **Khajehzadeh, M.H., Zare-maivan, H., Ghanati, F., Sharif., M.(2014).** Changes of Enzymes Activity and Production of Secondary Metabolites of *Artemisia aucheri* in Different Altitudes and Its Relation to Adaptation. *Journal of Chemical Health Risks*.4(3) : 57–66.
78. **Khaldi, A., Khouja, M.K. (1996).** Atlas pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in North Africa: taxonomy, geographical distribution, utilization and conservation. *Genetic Resources*. IPGRI, Rome, Italie, p 57-62.
79. **Kim, H.Y., Bigelow, J., Kevala, J. H. (2004).** Substrate preference in phosphatidylserine biosynthesis for docosahexaenoic acid containing species. *Biochemistry*, 43, 1030-6.
80. **Kliebenstein, D., Lim, J., Laurie, G., Landry, L., Last, R.(2002).** Arabidopsis UVR8 Regulates Ultraviolet-B Signal Transduction and Tolerance and Contains Sequence Similarity to Human Regulator of Chromatin Condensation. *Plant Physiology*. Vol. 130, pp. 234–243.
81. **Kohen, R., Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. SAGE Journals. Vol 30. 620-650.
82. **Kumar, N., Kumar, S ., Vats, S.K., Ahuja, P.S. (2006).** Effect of altitude on the primary products of photosynthesis and the associated enzymes in barley and wheat. *Photosynthesis Research*.88: 63–71.
83. **Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* .Vol 46(5). 244-282.
84. **Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M., Hseini, S. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de ZAËR (Maroc), le Jeunia, revue. N° 186.
85. **Lecerf, JM. (2007).** Phytostérols et risque cardiovasculaire. *Nutr. Clin. Métab.*21, 17-27.
86. **Liu, B., Liu, X.B., Li, Y.S., Herbert, S.J. (2013).** Effects of enhanced UV-B radiation on seed growth characteristics and yield components in soybean. *Field Crops Research*, 154, 158–163.

87. **Luo, X., Su, P., Zhang, W., (2015).** Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 13(7), 4231–4254.
88. **Maamri, S. (2008).** Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Thèse de Magister ès sciences. Université M'hamed Bougara. Boumerdes, 108p.
89. **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay- Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne : Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 192 p.
90. **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénolique dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: Sarni-Manchado, P. and Cheynier, V. Les polyphénols en Agroalimentaire. Paris : Technique et Documentation-lavoisier. P.1-26.
91. **Magder, S. (2006).** Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Critical Care Med Journal*. Vol 10 .208-216.
92. **Malešev, D., Kuntić, V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal.
93. **Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51 (6): 304-15.
94. **Mecherara-Idjeri, S.,Hassani, A., Castola, V., Casanova, J. (2008b).** Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.*, 20(3), 215-219.
95. **Mecherara-Idjeri, S.,Hassani, A.,Castola, V .,Casanova, J. (2008a).** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria part I: leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 32-38.
96. **Medić-Šarić ,M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., Monar, A. (2004).** Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.77* (1-2) : 361-366.
97. **Mercan, MD.(2010).** Le stress oxydatif. Unilabs A.R.L., Lausanne. 3-15.
98. **Misra,A., Srivastava,N.K.(2011).** Altitude-related changes in activities of carbon metabolism enzymes and secondary plant productsmenthoforon an active pharmaceutical constituents yield in peppermint (*Mentha piperita* L. Var. Kukarail).*African Journal of Pharmacy and Pharmacology*.Vol. 5(17).1983-1989.
99. **Monjauze, A. (1968).** Répartition et écologie de *Pistacia atlantica* Desf. en Algérie. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*. 56: 1-127.

100. **Monjauze, A. (1980).** Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica* Desf. Biologie et forêt. *Revue Forestière Française*. **4**: 357-363.
101. **Moreno, J. (2003).**Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radical Biology and Medicine* .**35** :1073-1081.
102. **Nakbi, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Koubaa, N., Echbili, A., Hammami, M.,Attia, N. (2010).**Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**:711–715. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.003>
103. **Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R.,Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. **33** : 2-16.
104. **Naudet, M. (1992).***In* Manuel des corps gras, Karleskind A., Technique et Documentation Lavoisier., Paris.p 43-45.
105. **Naudet, M., Soulier, J ., Farines, M. (1992).** Principaux constituants chimiques des corps gras. In : manuel des corps gras.1. 65-113. ed : techniques et documentation. Londres Paris New York. ISBN : 2-85206-662-9.
106. **Ni, Q.,Shao, Y.,Wang, Y.Z. Jing, Y.H.,Zhang, Y.C. (2014).**Impact of high altitude on the hepatic fatty acid oxidation and synthesis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.**446** : 574–579.
107. **Nielsen,E.E., Hansen,M.M. (2008).** Waking the dead: the value of population genetic analyses of historical samples. *F I S H and F I S H E R I E S*. **9** : 450–461.
108. **Ostlund, R.E et Lin, X. (2006).** Regulation of cholesterol absorption by phytosterols *Curr. Atheroscler. Rep* **8**, 487-91.
109. **Pallast, E.G., Schouten, E.G., De waart, F.G., Fonk, H.C., Doekes, G., Blomberg, B.M., Kok, F.J. (1999).** Effect of 50- and 100 mg vitamin E supplements on cellular immune function in non-institutionalized elderly persons. *Am. J. Clin. Nutr.* **69** :1273-81.
110. **Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000).** Phenols in the Plant and in Man. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of the Diet by Modifying the Phenols Content or Profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80** : 985-1012.
111. **Pasman, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O’Shea, M., Gambelli, L., Hendriks, H.F.J., Einerhand, A.W.C., Scott, C., Keizer, H.G., Mennen, L.I. (2008).** The Effect of Korean Pine Nut Oil on in Vitro CCK Release, on Appetite

- Sensations and on Gut Hormones in Post-Menopausal Overweight Women. *Lipids in Health and Disease*, 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-7-10>.
112. **Pastre, J.O.C. (2005)**. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire. *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*. 120p.
113. **Perona, J.S., Martinez-Gonzalez, J., Sanchez-Dominguez, J.M., Badimon, L., Ruiz-Gutierrez, V. (2004)**. The Unsaponifiable Fraction of Virgin Olive Oil in Chylomicrons from Men Improves the Balance between Vasoprotective and Prothrombotic Factors Released by Endothelial Cells. *J. Nut.* 134, 3284-3289.
114. **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O. (1999)**. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Medi Sphere*.
115. **Piquemal, G. (2008)**. Les flavonoïdes (en ligne). http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215.
116. **Pre, J. (1993)**. Radicaux libres et peroxydation lipidique. II Aspects physiopathologiques. *Sem. Hôp. Paris*. 69 :29-39.
117. **Prior, R.L., Cao, G. (2006)**. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Control Release Journal*. Vol 113(3). 189-207.
118. **Ratnam, V.D., Ankola, D.D., Baradwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V. (2006)**. Role of antioxidants in Sciences. Vol 81. 895-905.
119. **Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999)**. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66:401-436.
120. **Santos, A.L., Moreirinha, C., Diana Lopes, D., Esteves, A.C., Henriques, I., Almeida, A., Domingues, M., Delgadillo, I., Correia, A., Cunha, A. (2013)**. Effects of UV Radiation on the Lipids and Proteins of Bacteria Studied by Mid-Infrared Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*. [dx.doi.org/10.1021/es400660g](https://doi.org/10.1021/es400660g).
121. **Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006)**. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. p2- 10.
122. **Serdar, Z., Aslan, K., Dirican, M., Sarandol, E., Yeşilbursa, D., Serdar, A. (2006)**. Lipid and protein oxidation. Vol 39(8). 794-803.
123. **Sies, H., Stall, W., Sundquist, A.R. (1992)**. Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci USA*. 669: 7-20.

124. **Sifi, I., Gourine, N., Gaydou, E. M., Yousfi, M. (2015).** Chemotypes of essential oil of unripe galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria. *Nat Prod Res*, 29(20), 1945-1949.
125. **Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152–178.
126. **Siret, C. (2002).** Les composants chimiques des produits alimentaires. *Techniques de l'Ingénieur*, f1010, 20 p.
127. **Solinas, M. (1992).** Les principes d'extraction de l'huile d'olives. *Rev. Olivae*.42: 31-35.
128. **Stapleton, A. (1992).** Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *American Society of Plant Physiologists*, Vol 4.1353-1358.
129. **Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J. (2003).** *Biochimie. Paris*. P.323.ISBN 2- 257-17116-0.
130. **Subsamanian, S., Stacey, G., Yu, O. (2007).** Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*. 12 (7) : 282-283.
131. **Surai, P.F. (2002).** VITAMIN E. In : Surai P.F., *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press: Nottingham. 27-128.
132. **Suresh Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, PV. (2008).** Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty–Ane-dible seaweed. *Food Chemistry*. 107(1). 289-295.
133. **Talcott, S.T., Howard, L.R. (1999).** Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .47 (5):2109–2115.
134. **Tang, A.M., Graham, N.M.H., Semba, R.D., Saah, A.J. (1997).** Association between serum vitamin A and E levels and HIV-1 disease progression. *AIDS*, 11: 613-620
135. **Tehrani.M.S., Givianrad.M.H., Aberoomand-Azar,P., Waqif-Husain.S.,Jafari. S.A.M. (2012).** Chemical Composition of Iran's *Pistacia atlantica* Cold-Pressed Oil.2013:6.
136. **Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Mayer, P. (2012).** Total lipid content. Fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*, 131: 434–440.
137. **Tremoleires, J., Serville, Y., Jacquot, R., Dupin, H. (1980).** *Manuel d'alimentation humaine*. Tome 1 : les bases d'alimentation *Ed : E.S.F. Paris. p 553.*

138. **Tzakou, O., Bazos, I., Yannitsaros, A. (2007).** Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and fragrance journal*, 22(5), 358-362.
139. **Uzzan, A. (1992a)** « Les corps gras » in DUPIN H, CUQ J-L, MALEWIAK M-L, LEYNAUD-ROUAUD C et BERTHIER A-M : Alimentation et nutrition humaine. *Ed : E.S.F. Paris.p 1533.*
140. **Uzzan, A. (1992b).**« Fruits oléagineux et leurs huiles : olive et huile d'olive » in KARLESKIND A : manuel des corps gras. Tome 1. *Ed : Technique et documentation. Lavoisier. Paris. p787.*
141. **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol J. , Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160:1-40.
142. **Vierling, E. (2003).** Aliments et boisson. « Filière et produits ». *Ed : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux. p271.*
143. **W- Erdman, J., Balentine, J. D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts ,J ., Harnly Hollman, J. P., L –Keen, C., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. et Burrowes, J. (2007).** Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3) supp 718 s-737 s.
144. **Wang, Y., Hwang ,D.C., Licing, B., Watson R.R. (1994).** Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS are normalized by vitamin E supplementation. *J Nutr* 124 : 2024-32.
145. **Weil, J.H., Bonnet, J., Boulenger, Y et al. (2001).** Structure des lipides. In : biochimie générale. 9ème éd. Paris : Dunod,. 267-274p. ISBN : 2-10-0055-739.
146. **Weil, JH. (1995).** Biochimie générale, 7ème edition, Paris. p239.
147. **Winkel-Shirley, B. (2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology.* 126 : 485-493.
148. **Wolff, J.P. (1968).** Manueld'analysedescorpgras.Paris,Azoulay.517 p.
149. **Wong, C.Y.,Teoh, M.L., Phang, S.M., Lim, P.E., Beardall, J. (2015).** Interactive Effects of Temperature and UV Radiation on Photosynthesis of Chlorella Strains from Polar, Temperate and Tropical Environments: Differential Impacts on Damage and Repair. *PLoS ONE* 10(10): e0139469.

150. **Woodson, K., Tangre, JA., Barret, MJ., Virtamo, J., Taylor, PR., Albanes, D. (1999).** Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. *J. Natl. Cancer. Inst.* 91, 1738-43.
151. **Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydoud, E.M. (2005).** Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* of fruit growing in Algeria. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **82** (2): 93-96.
152. **Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Ben bertal, D. (2003).** Étude des acides gras de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas algérien. *Oléagineux. Corps gras. Lipides.* **10** (5-6): 425-427.
153. **Yousfi, M., Nadjmi, B., Bellal, R., Ben Bertal, D., Pallad, G. (2002).** Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **79** (10): 1049-1050.
154. **Yu, BP.(1994).** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, Vol 74(1). 139-62.
155. **Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555–559.
156. **Zohary, M. (1952).** A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series .5*:187-228.
157. **Zohary, M. (1996).** The genus *Pistacia* L. Dans *Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia*. Genetic Resources. IPGRI, Rome, Italie. pp 1–11.

Annexe

Annexe 1

✓ Les réactifs et les produits chimiques

- Acide acétique.
- Acide chlorhydrique (HCL).
- Acide sulfurique (H₂SO₄).
- Alpha –tocophérol (vitamine E).
- Anhydride acétique.
- Butanol.
- Chloroforme.
- Cholestérol.
- Diéthyléther.
- Ethanol absolu.
- Hexane.
- Hydroxyde de potassium (KOH).
- Méthanol.
- Phénantroline.
- Sulfate de sodium anhydride (Na₂SO₄).
- Trichlorure de Fer (FeCl₃).
- 2 ,2-diphényl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).

Annexe 2

✓ Matériel

- Ampoule à décanter 250 ml
- Ballon à fond rond 250 ml, 500 ml
- Bécher 50 ml
- Burette graduée 25 ml
- Cuvette (quartz et plastique)
- Entonnoir
- Eprouvette graduée 25ml, 250 ml
- Erlenmeyer de 50ml, 250 ml
- Fiole jaugée de 50 ml, 100 ml ,200 ml
- Micropipette
- Papier filtre
- Pipette pasteur
- Tube à essais
- Soxhlet

✓ Equipements

- Agitateur magnétique (Heidolph-MR 3001 K)
- Balance (KERN ABS)
- Chauffe ballon
- Hotte chimique (ASEM)
- Rotavapeur (BüCHI-R-200)
- Spectrophotométrie UV /visible (SHIMADZU UV 1601)
- Vortex (VELP scientifica)

Annexe 3

Test de Student :

Cas du petit échantillon : $n_1, n_2 < 30$.

Si la t calculée $\geq t$ lue sur la table, la différence entre les deux échantillons est significative.

Si la t calculée $< t$ lue sur la table, la différence entre les deux échantillons n'est pas significative.

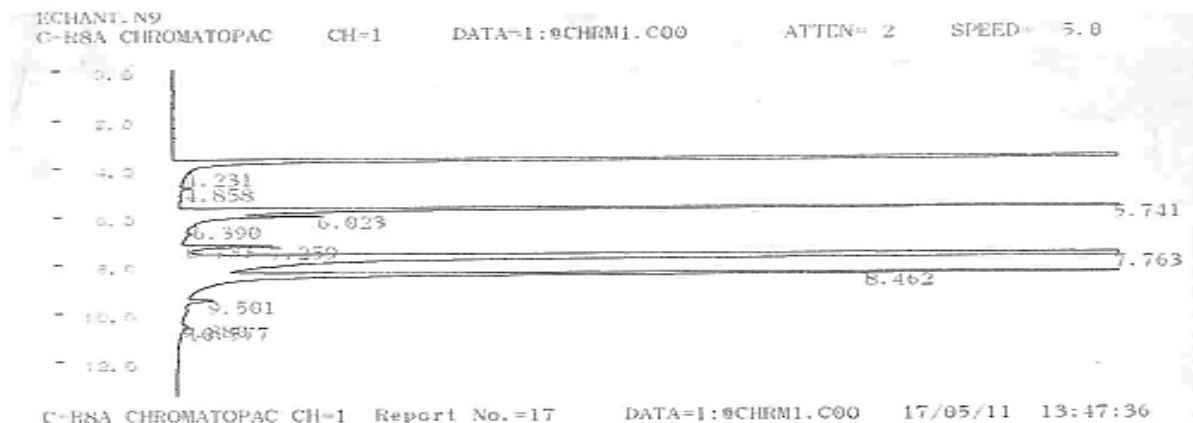
$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Table de loi de Student

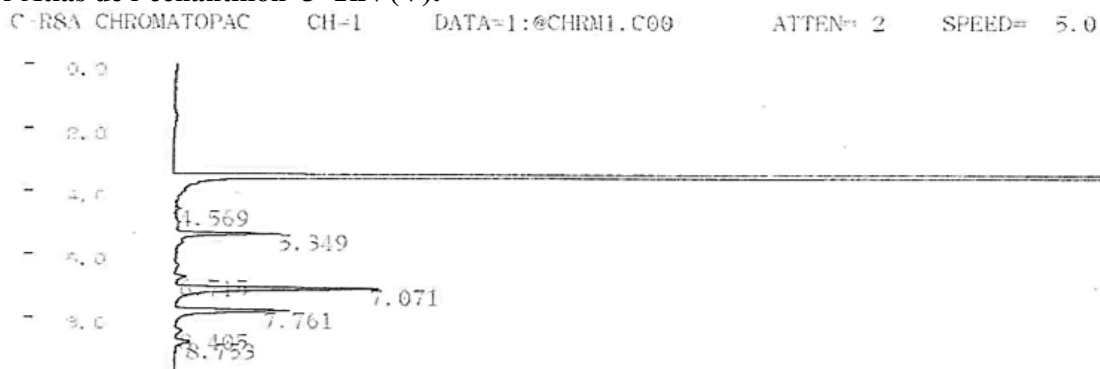
α	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
1	1,000	1,378	1,963	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	127,3	318,3	636,6
2	0,816	1,061	1,386	1,888	2,920	4,303	6,965	9,925	14,09	22,33	31,60
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,21	12,92
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,893	6,869
6	0,718	0,908	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,711	0,898	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,706	0,893	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,703	0,889	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,767
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,690
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,395	3,659
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
50	0,679	0,849	1,047	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	2,937	3,261	3,496
60	0,679	0,848	1,045	1,295	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,232	3,460
80	0,678	0,846	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	2,887	3,195	3,416
100	0,677	0,845	1,042	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	2,871	3,174	3,390
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,160	3,373
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,291

Annexe 4

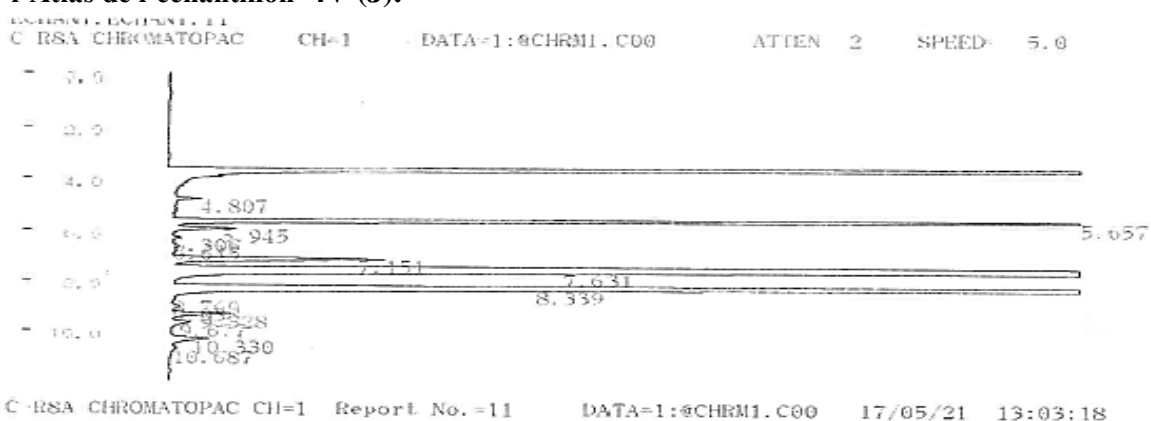
Profils chromatographiques de l'analyse, par CPG, des EMAG pour quelques échantillons de la saison 2015.



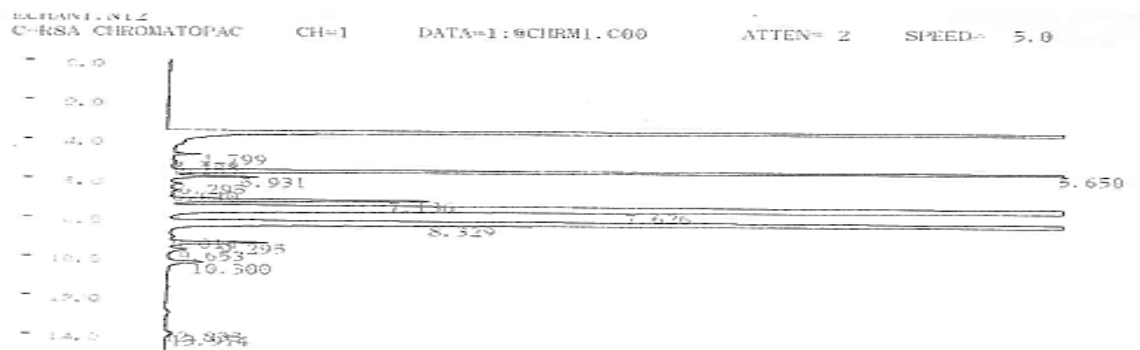
Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 3' RN (V).



Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 4V (J).

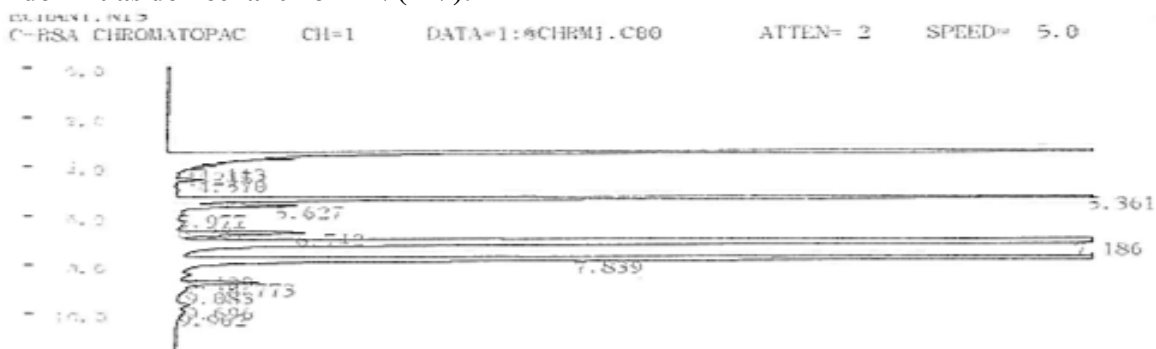


Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 4V(JR).



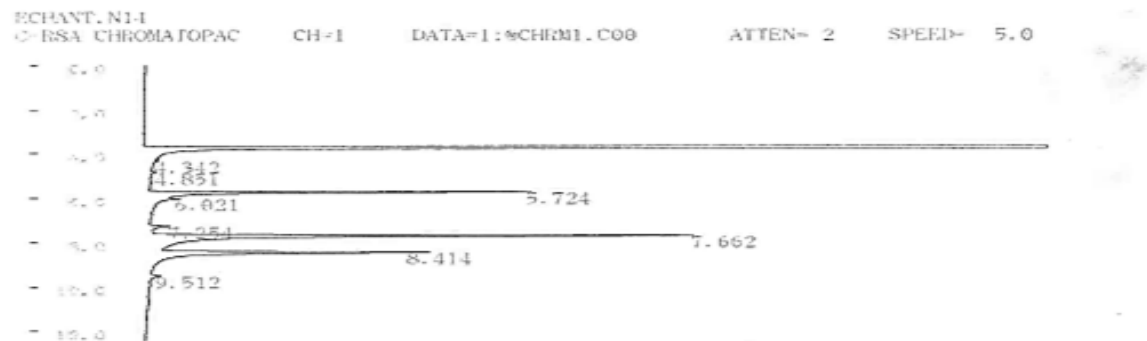
C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=10 DATA=1:%CHRM1.C00 17/05/21 12:46:50

Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 4V(RV).



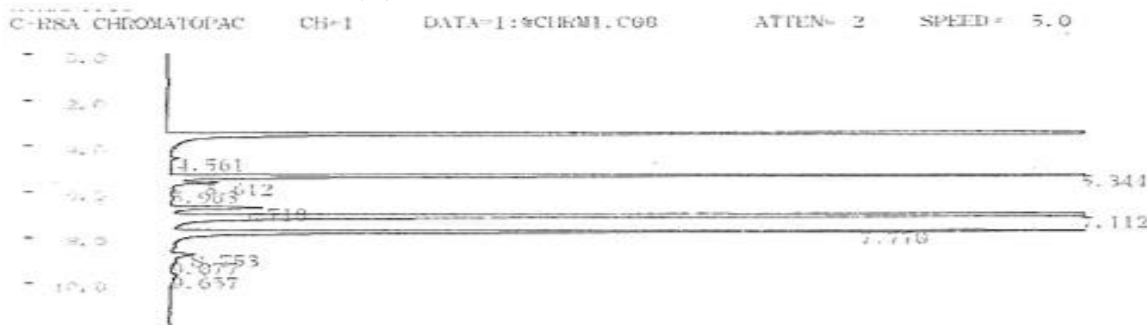
C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=17 DATA=1:%CHRM1.C00 17/05/30 14:11:00

Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 5G(JR).



C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=19 DATA=1:%CHRM1.C00 17/05/11 14:17:36

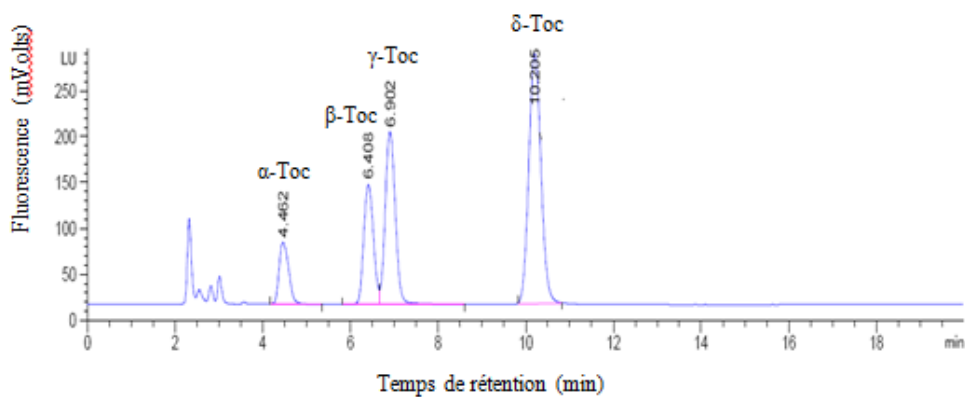
Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 5G(V).



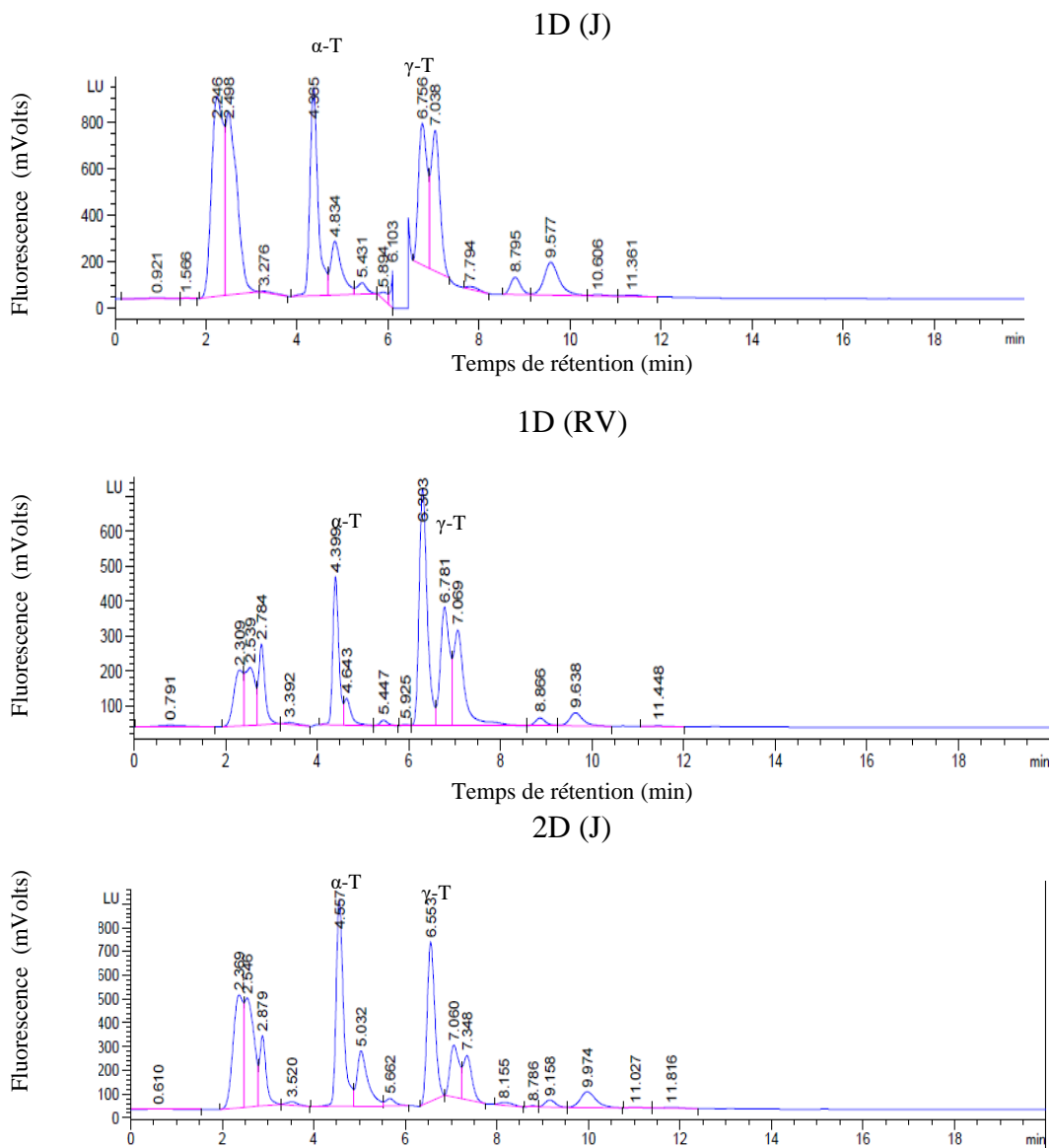
C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=16 DATA=1:%CHRM1.C00 17/05/30 13:56:24

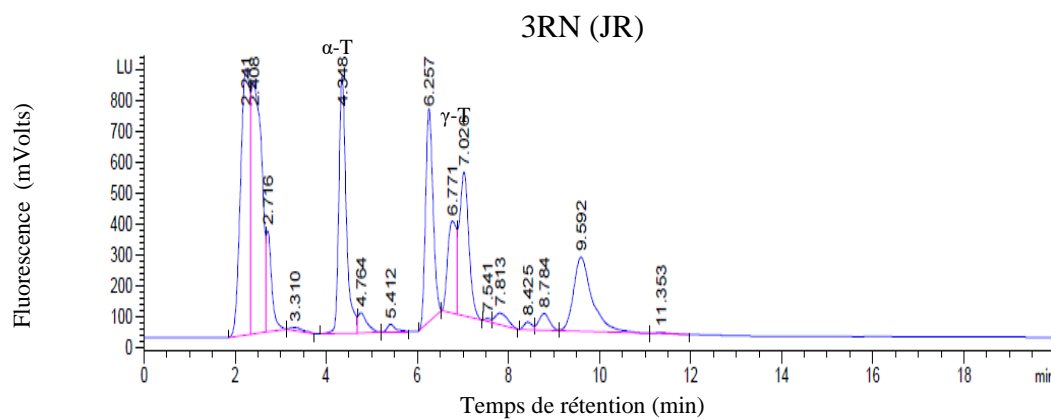
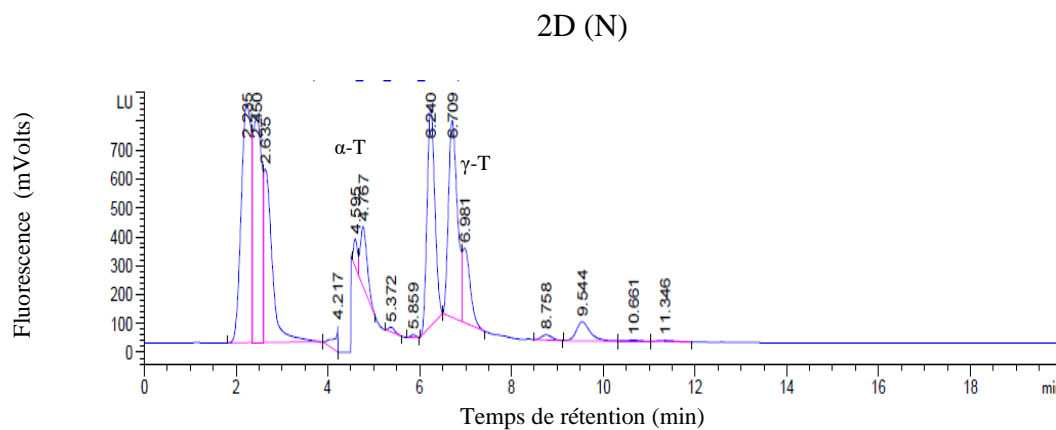
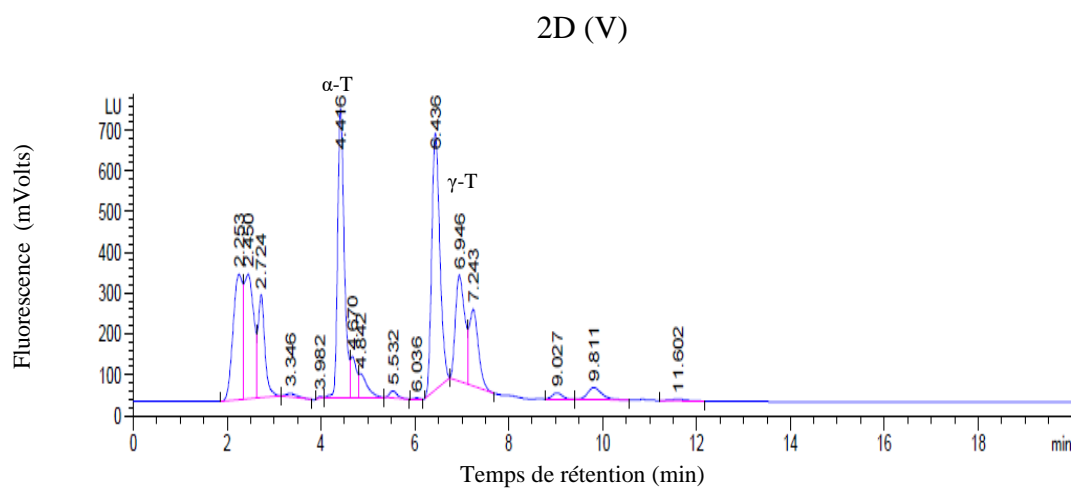
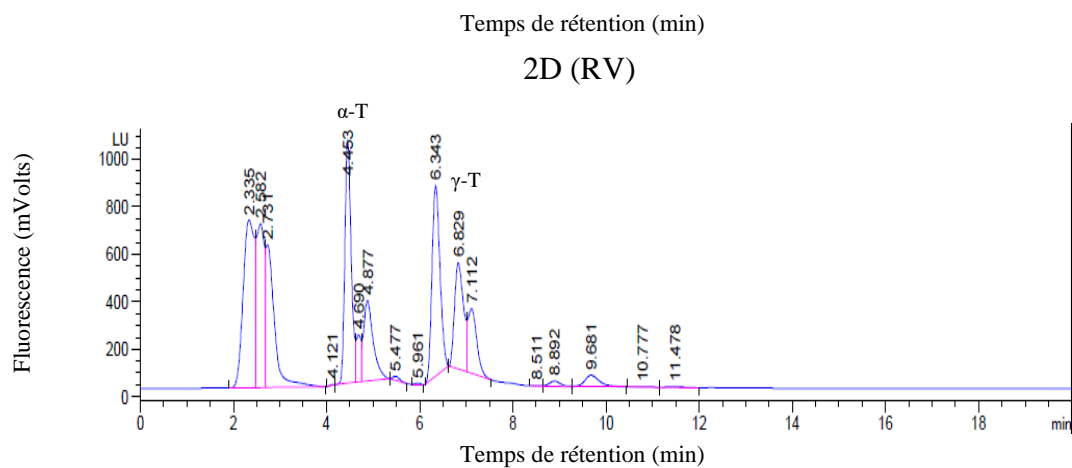
Chromatogramme CPG des esters méthyliques des acides gras d'huile brute de Pistachier de l'Atlas de l'échantillon 6B(J).

Profil chromatographique des standards commerciaux de tocophérols.

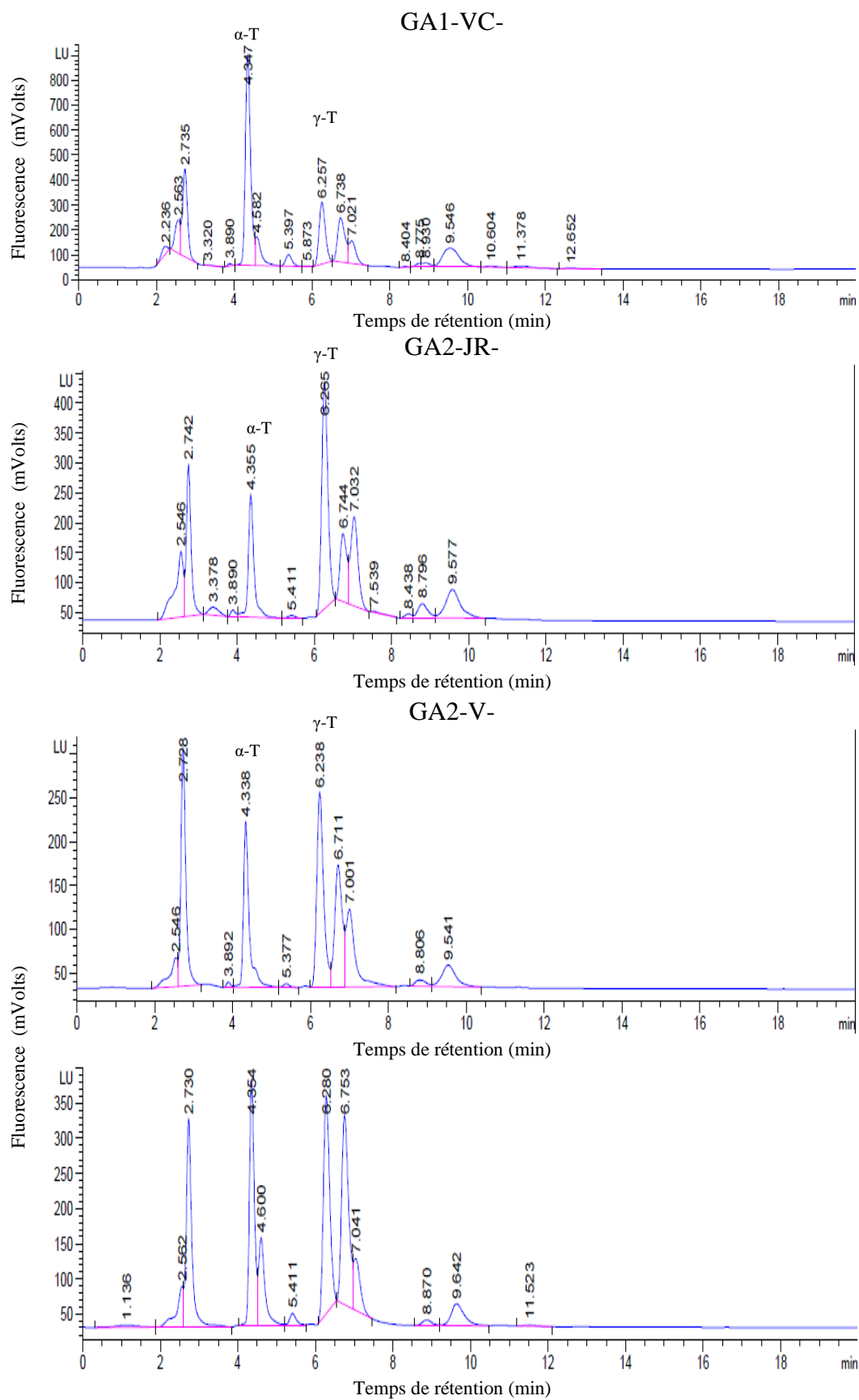


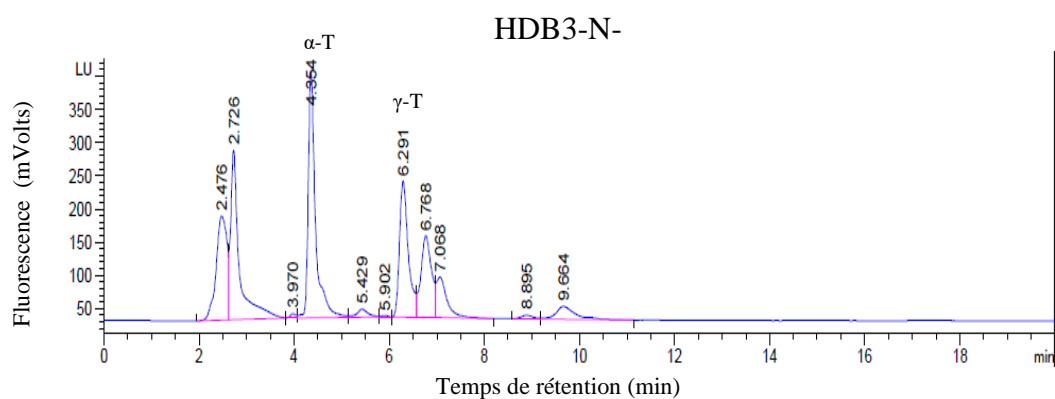
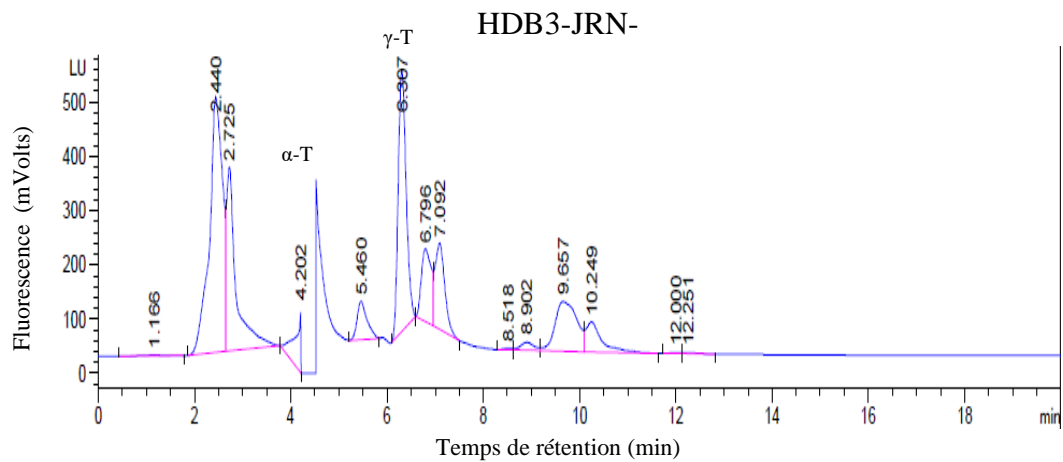
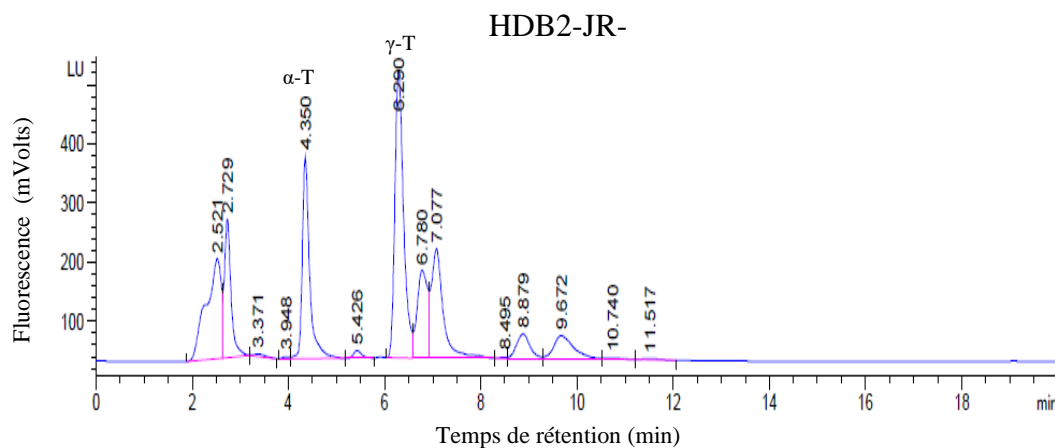
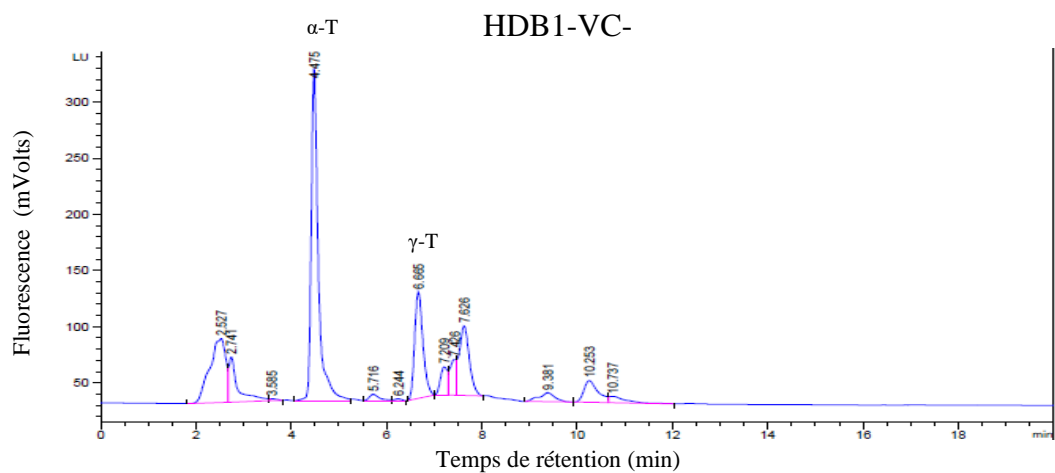
Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, des tocophérols pour quelques échantillons de la saison 2015.





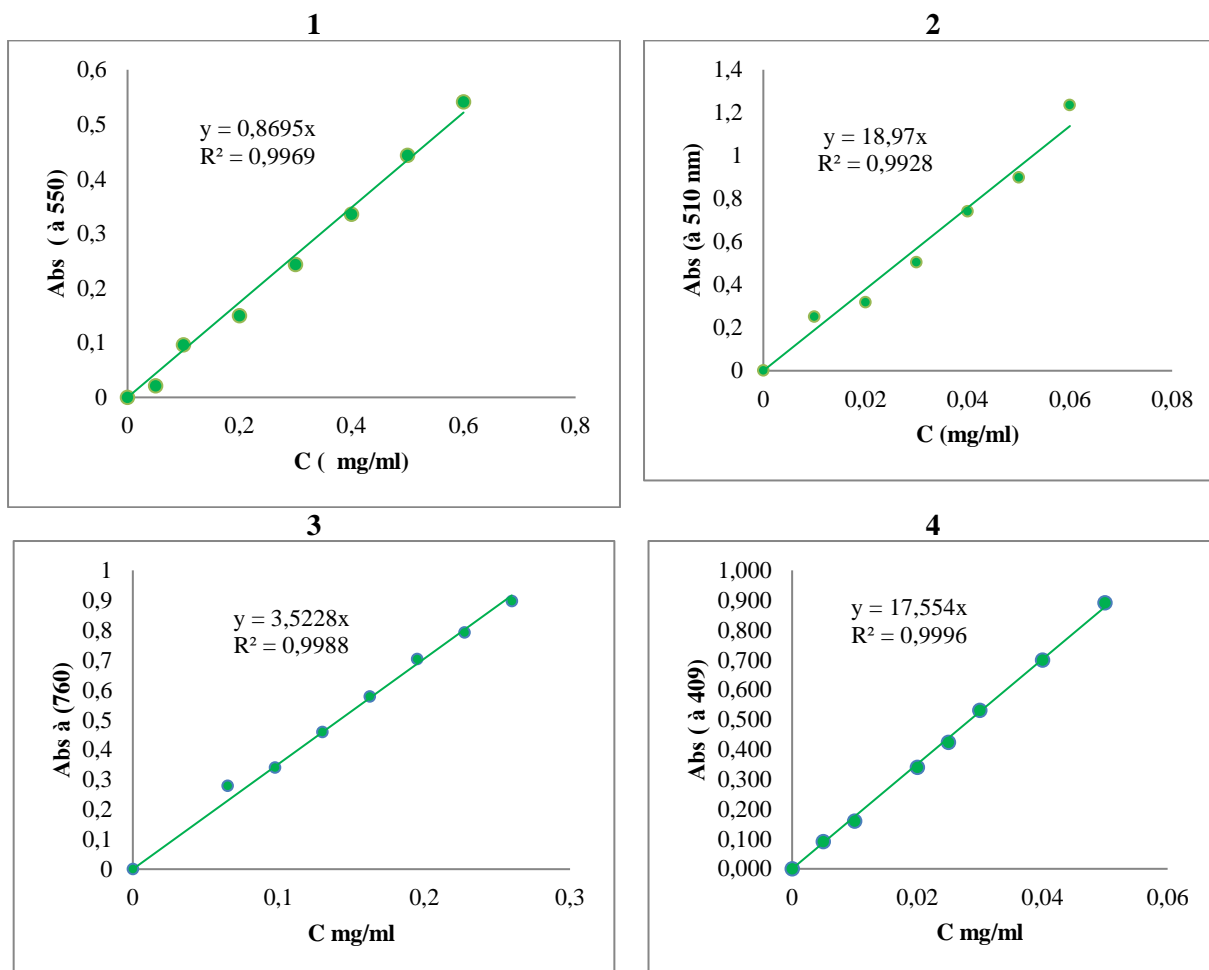
Profils chromatographiques de l'analyse, par CLHP, des tocophérols pour quelques échantillons de la saison 2016.





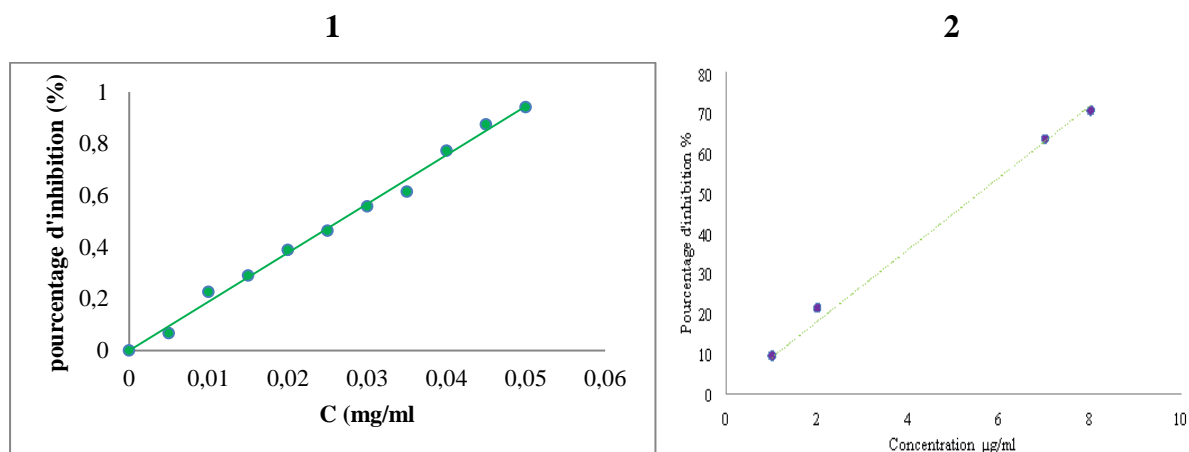
Annexe 5

Courbes d'étalonnage utilisées pour les dosages colorimétriques (stérols totaux, tocophérols totaux, phénols totaux et flavonoïdes), Pour les échantillons de la saison 2015.



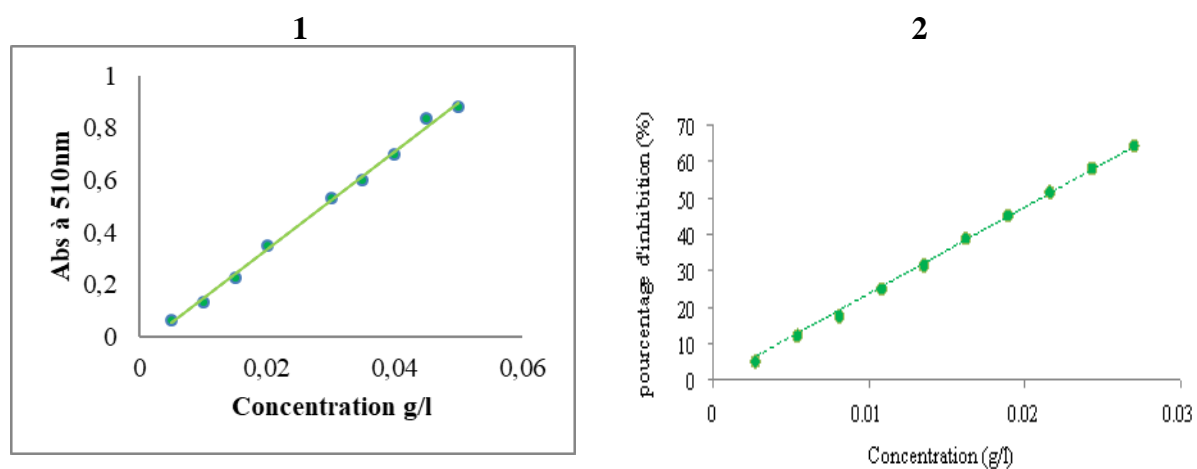
Courbes d'étalonnage de, respectivement, cholestérol (1), la vitamine E(2), l'acide gallique(3) et la quercétine (4).

Courbes d'étalonnages utilisées pour le calcul de l'EC50 de la vitamine E et de la vitamine C pour les échantillons de la saison 2015.



Courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante (DPPH) de la vitamine E (1) et de la vitamine C (2).

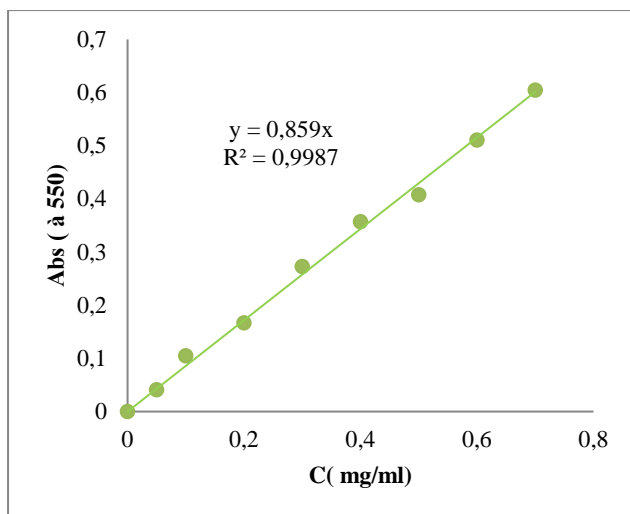
Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage des tocophérols et l'activité antioxydante de la vitamine E avant et après l'extraction des phénols totaux à partir les huiles, pour les échantillons de la saison 2015.



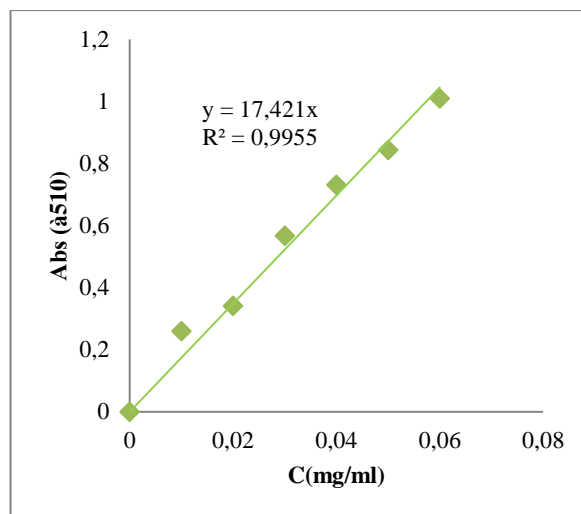
Courbes d'étalonnage de la vitamine E de la vitamine E (1) et de l'activité antioxydante (DPPH) (2).

Courbes d'étalonnage utilisées pour les dosages colorimétriques (stérols totaux, tocophérols totaux, phénols totaux et flavonoïdes), Pour les échantillons de la saison 2016.

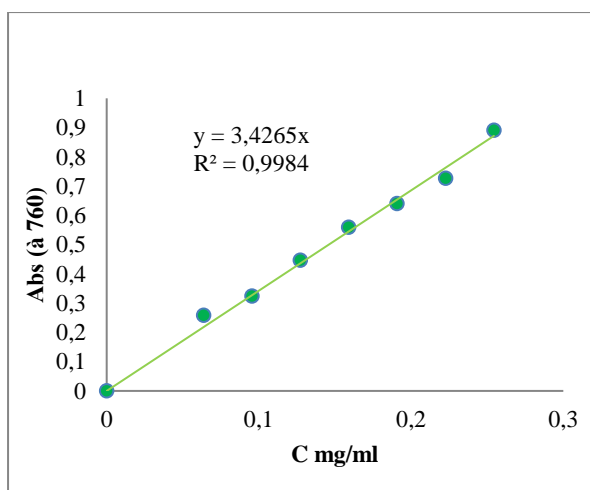
1



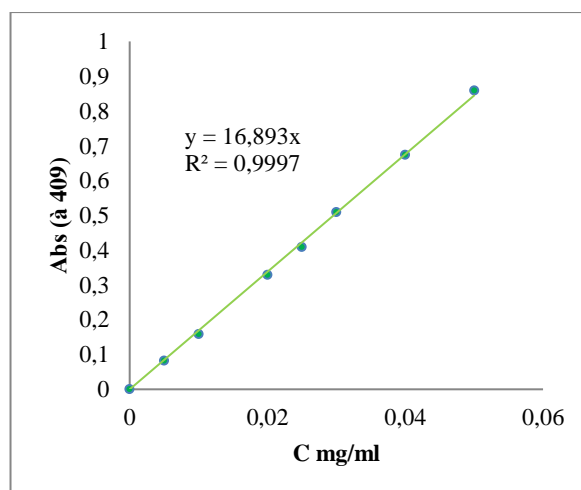
2



3



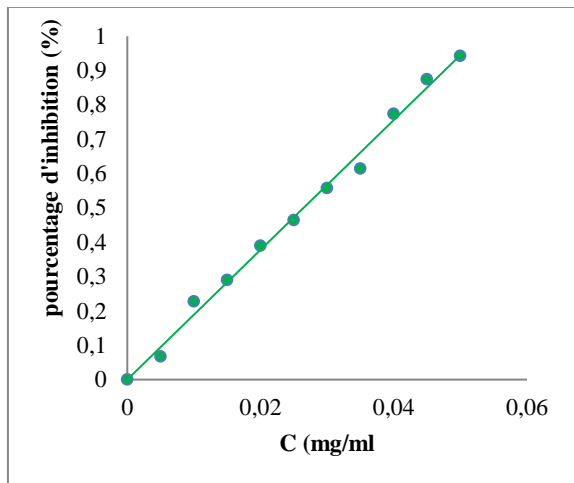
4



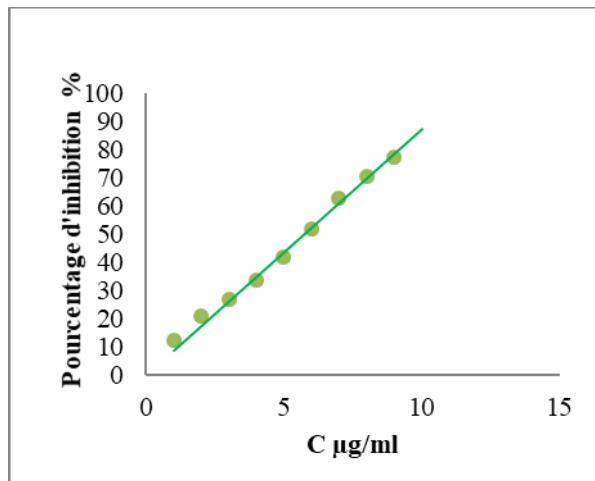
Courbes d'étalonnage de, respectivement, cholestérol (1), la vitamine E (2), l'acide gallique(3) et la quercétine (4).

Courbes d'étalonnages utilisées pour le calcul de l'EC50 de la vitamine E et de la vitamine C pour les échantillons de la saison 2016.

1

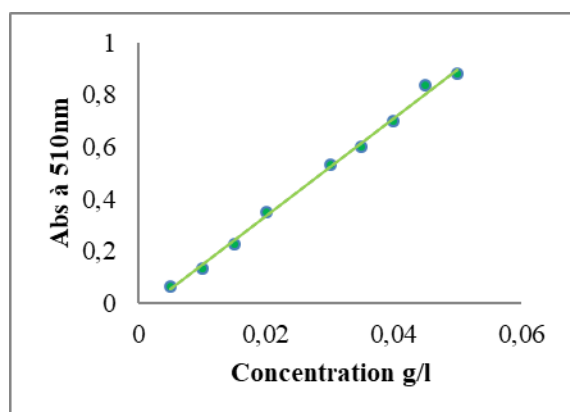


2

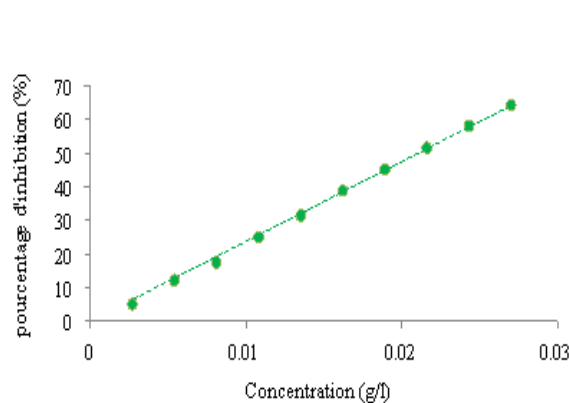


Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage des tocophérols et l'activité antioxydante de la vitamine E avant et après l'extraction des phénols totaux à partir les huiles , pour les échantillons de la saison 2016.

1



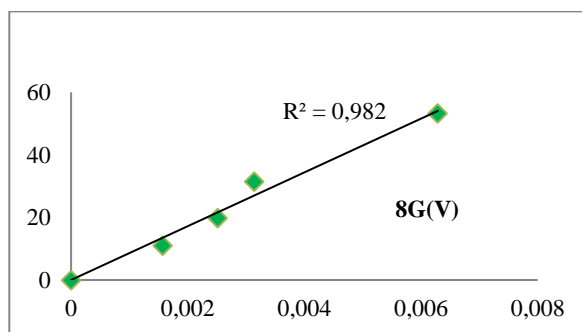
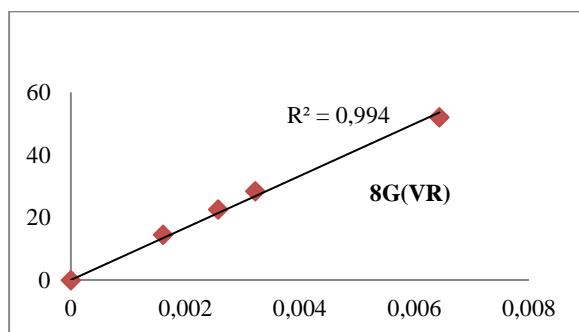
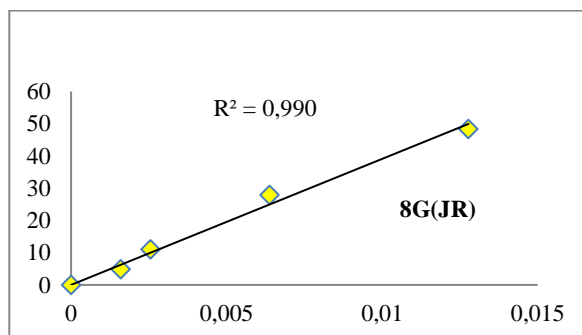
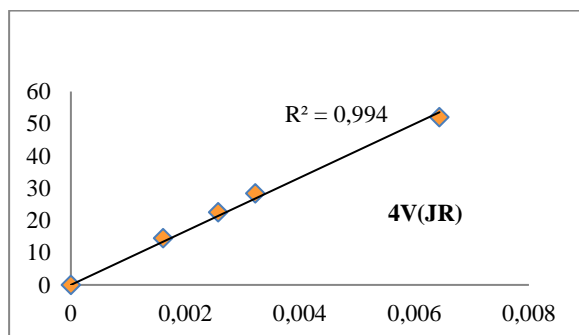
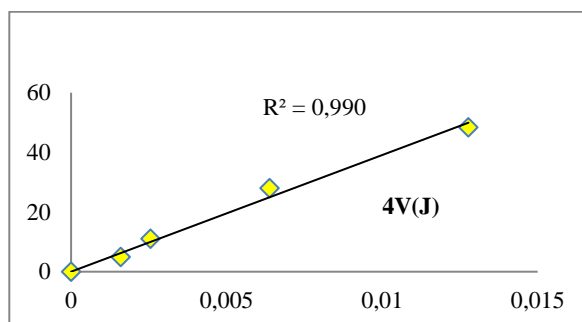
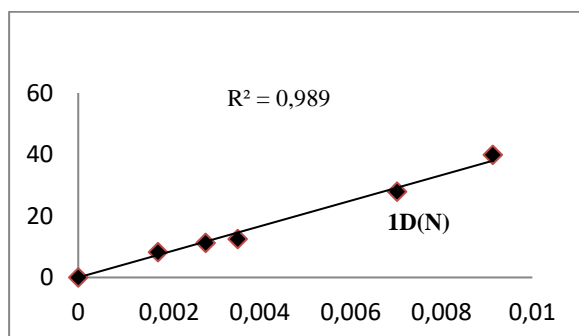
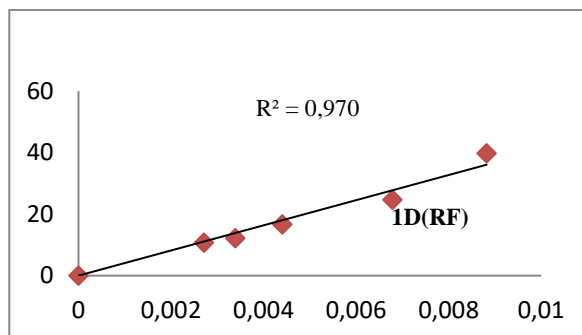
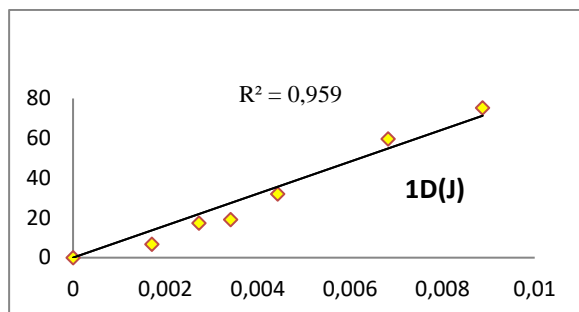
2



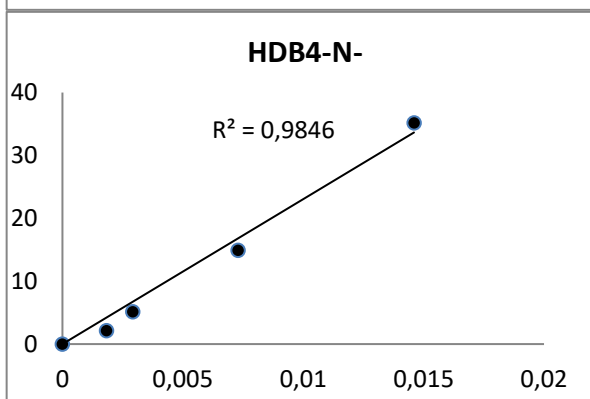
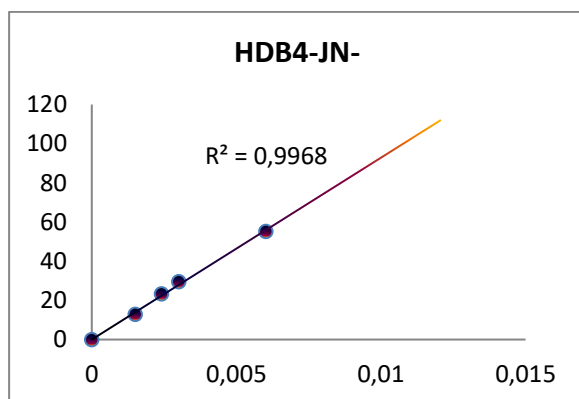
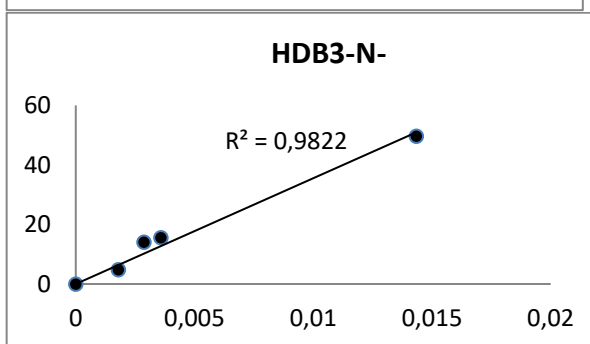
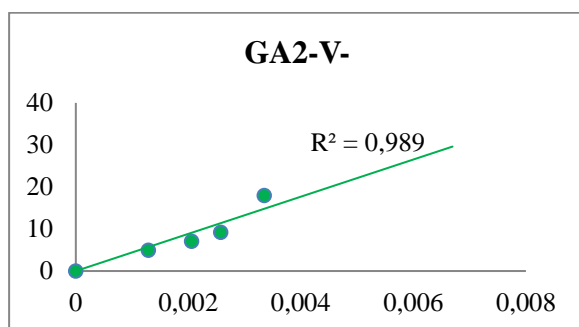
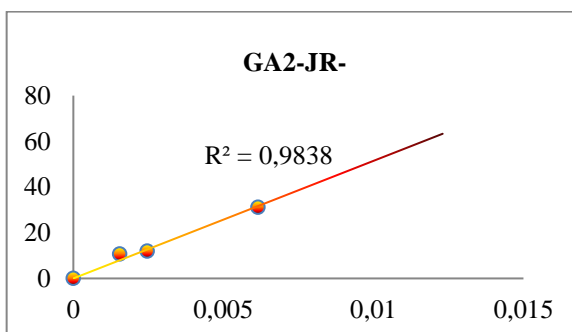
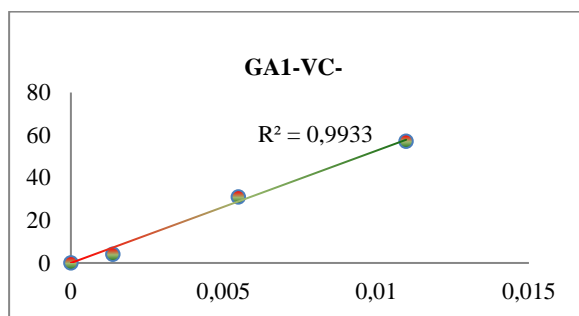
Droites d'étalonnage de la vitamine E de la vitamine E (1) et de l'activité antioxydante (DPPH) (2).

Annexe 6

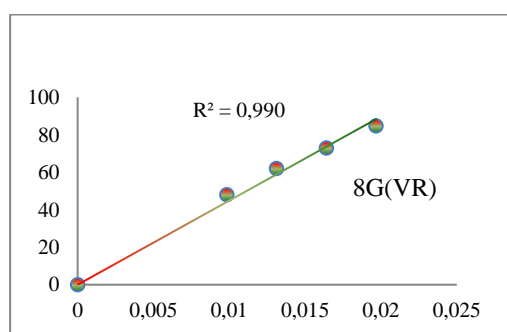
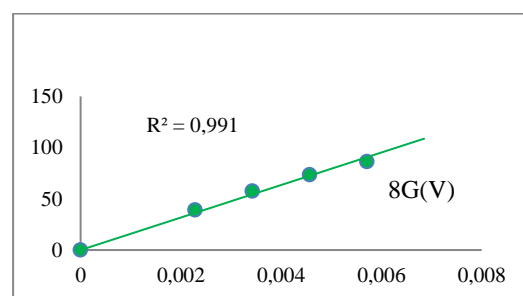
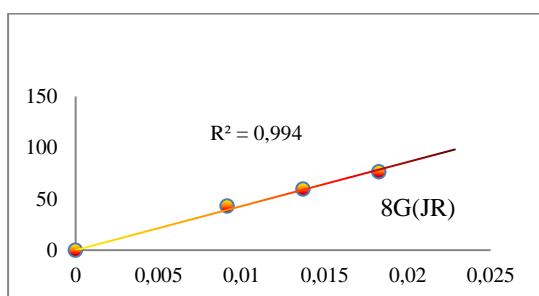
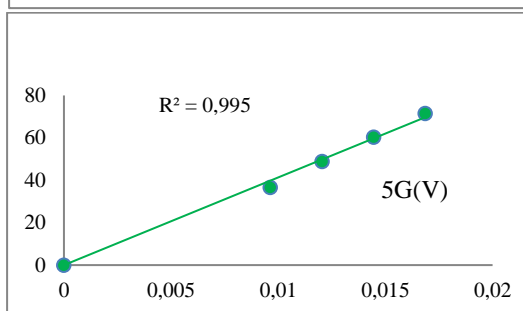
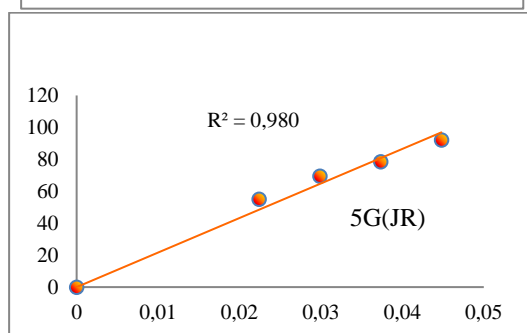
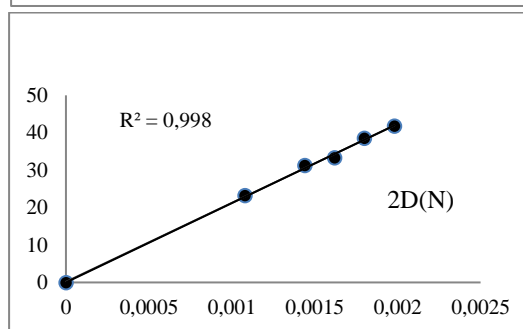
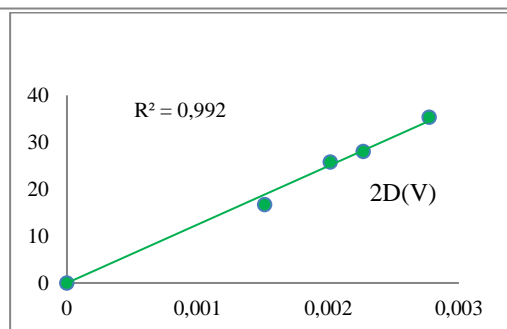
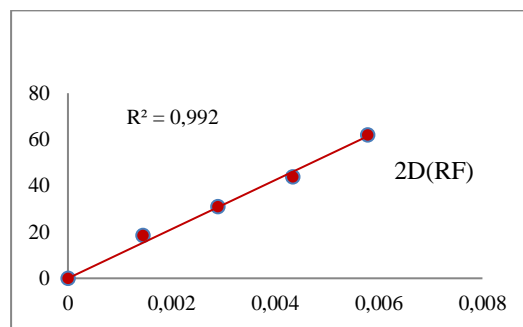
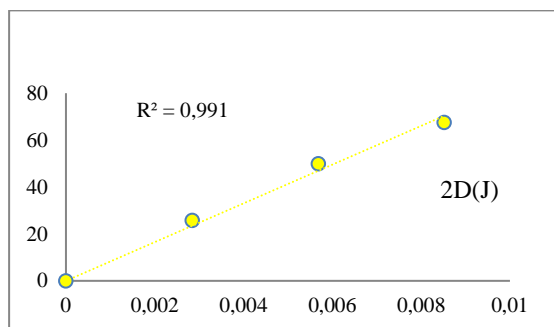
Les figures ci-dessous présentent le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH· en fonction de la concentration des extraits d'huiles pour quelques échantillons collectés en 2015.



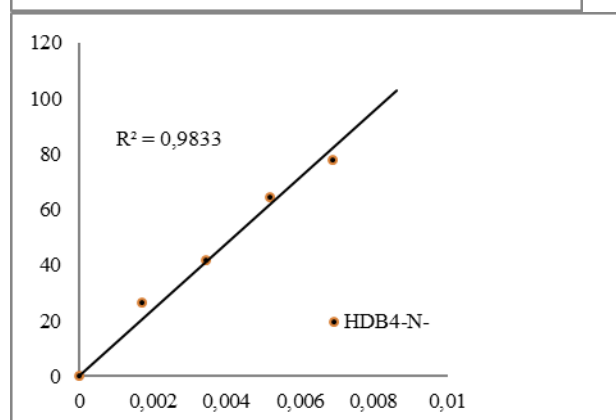
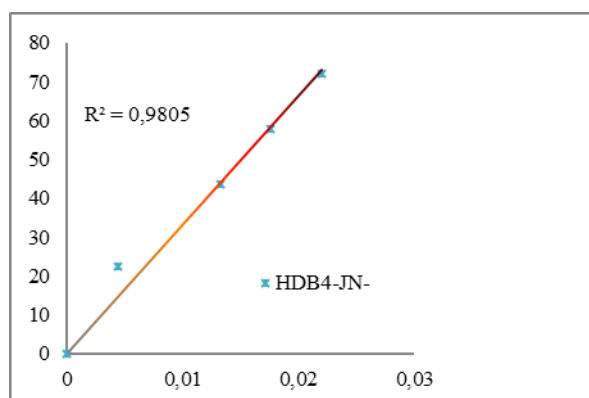
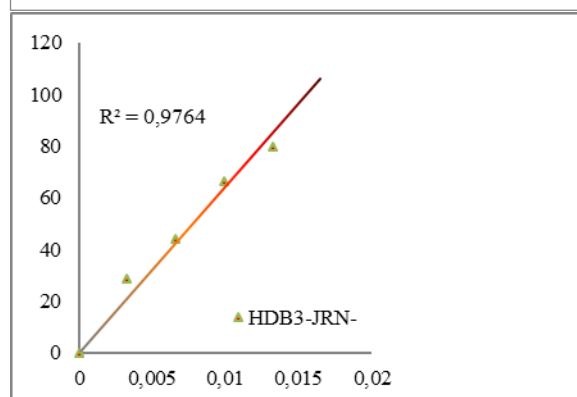
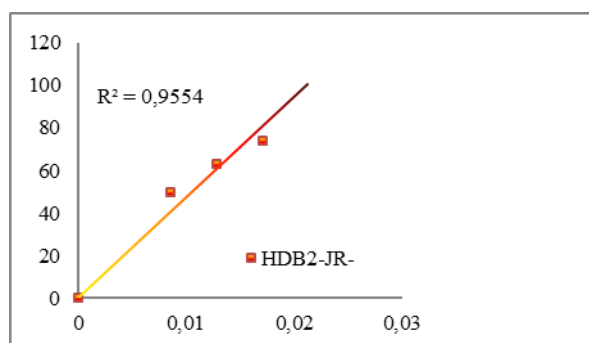
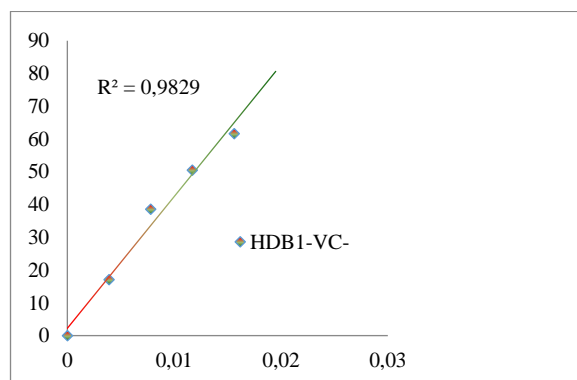
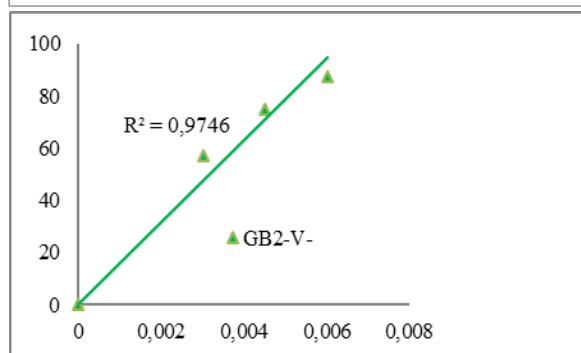
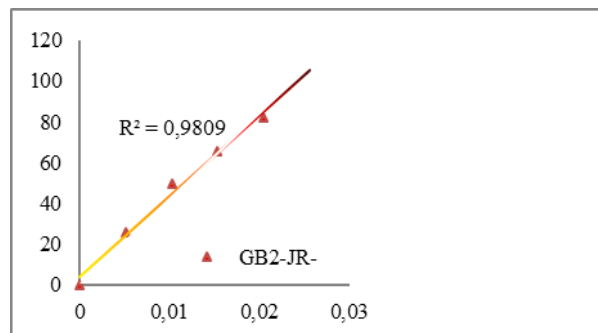
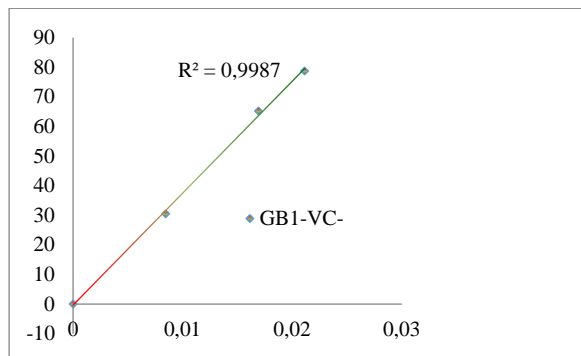
Les figures ci-dessous présentent le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH· en fonction de la concentration des extraits d'huiles pour quelques échantillons collectés en 2016.



Les figures ci-dessous présentent le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH· en fonction de la concentration de la fraction insaponifiable pour quelques échantillons collectés en 2015.



Les figures ci-dessous présentent le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH· en fonction de la concentration de la fraction insaponifiable pour quelques échantillons collectés en 2016.



Publication

Fatty Acids, the Unsaponifiable Matter, and Polyphenols as Criteria to Distinguish *Pistacia atlantica* Unripe Fruit Oil

Fatna Bentireche¹ · Hamid Guenane¹ · Mohamed Yousfi¹

Received: 18 May 2018 / Revised: 25 December 2018 / Accepted: 9 February 2019
© 2019 AOCS

Abstract This study aimed to determine the effect of the maturation degree on the chemical composition of *Pistacia atlantica* fruits oil. A total number of 21 samples of fruits at three stages of maturation (unripe, middle maturity, and ripe fruits) were used in this study. Thus, the fatty acid composition was studied; the percentage of the unsaponifiable matter (w/w) and its anti-DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) activity were assessed. The total phenolic compound content was also evaluated. The obtained results indicated, for the first time, that unripe fruits oil was characterized by richness in linoleic acid ($31.63\% \pm 3.64\%$), in unsaponifiable matter ($9.29\% \pm 6.19\%$ w/w), and in phenolic compounds (2.51 mg per 100 g oil). For ripe fruit oil, these values were similar to those of some seed oils ($22.41\% \pm 3.66\%$, $2.98\% \pm 1.71\%$ w/w, and 0.13 mg per 100 g oil, respectively). Data analysis by principal component analysis showed that linoleic acid percentage and the unsaponifiable fraction percentage could constitute good markers for these fruits. These two parameters associated with a high level of phenolic compounds seem to distinguish and value the oil of *P. atlantica* unripe fruits. Thus, the findings revealed that the unripe fruits, rich in bioactive molecules such as unsaturated fatty acids and phenolic compounds, would be the optimal stage of harvesting time. Based on this, we could integrate this natural bioresource in industrial applications.

Keywords *Pistacia atlantica* · Unripe fruits · Fatty acids · Unsaponifiable · Polyphenols

✉ Mohamed Yousfi
yousfim8@gmail.com

¹ Laboratoire des Sciences Fondamentales, Université Amar Télijdj, Route de Ghardaia, Laghouat, 03000, Algeria

J Am Oil Chem Soc (2019).

Introduction

Pistacia atlantica, belonging to the family Anacardiaceae, is a spontaneous plant distributed in several regions of Algeria. Different parts of this tree including fruits, leaves, galls, and resin have been used in folk medicine (Bozorgi et al., 2013). Leaves and fruits of *P. atlantica* constitute a good source of several bioactive compounds such as essential oils and polyphenols (Gourine et al., 2010; Peksel et al., 2013). Numerous experimental studies have focused on the composition of the oil extracted from the fruits (Guenane et al., 2015; Yousfi et al., 2002, 2005). The effect of the fruit maturation degree on fatty acids and tocopherol composition was also reported (Guenane et al., 2015). In the past, research was carried out to investigate the influence of harvest date on the fatty acid composition of olive oil and revealed that the harvesting time affects the latter (Beltran et al., 2004). The unsaponifiable fraction of the vegetable oils is now valued because of its antioxidant and anti-inflammatory effects (Cardeno et al., 2014). The unsaponifiable matter and the phenolic compounds in *P. atlantica* fruits oil remain little explored.

In this study, we report the effect of the maturation degree on the fatty acid composition, the unsaponifiable fraction rate, and the amount of phenolic compounds in *P. atlantica* fruit oil. Data analysis using principal component analysis (PCA) was carried out to establish possible distinctive groups on the basis of the studied parameters. The present work stands as an endeavor to uncover the ideal harvesting time of fruits rich in bioactive molecules such as fatty acids and phenolic compounds.

Materials and Methods

In 2015, *P. atlantica* fruits were collected over 3 months at five different sites from Laghouat department (Algeria). After air-drying in the shade, the samples were kept at the room temperature for 2 weeks. Then, they were divided into three groups according to the maturation degree that was defined by their color. The characteristics of samples and harvest are shown in Table 1. Fig. 1 shows three samples of different maturity degree.

Reagents and Standard

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA.

Oil Extraction

The fruits (100 g) were milled into powder using a manual mill and extracted with 300 mL *n*-hexane using a soxhlet extraction apparatus for 8 hours. Samples were then dehydrated with anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure using a rotary

evaporator at 40 °C. The dried crude oils were stored at +4 °C until use.

Fatty Acid Methyl Ester Preparation and Gas Chromatography (GC) Analysis

Fatty Acid methyl esters (FAME) were made by refluxing 0.5 g of oil samples with 25 mL of 0.5% sodium methoxide for 30 min. After cooling, 20 mL of distilled water and 20 mL of *n*-hexane were added to the mixture. The organic phase that contains FAME was then recovered, washed, and dried using anhydrous sodium sulfate. After filtration and evaporation of *n*-hexane, FAME were purified by flash chromatography over silica gel as the stationary phase and chloroform as the mobile phase.

FAME were analyzed on a Chrompack CP 9002 gas chromatograph equipped with a split-splitless mode injection system, a flame ionization detector (FID), and a DB23 capillary column (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness). Oven temperature was in isotherm mode (250 °C). Injector and detector temperatures were set at 280 °C. Nitrogen was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The injection volume was 0.8 µL. The fatty acids were identified by comparison of their retention times with those of pure standards.

Table 1 Characteristics of *P. atlantica* fruit samples

Sample	Color of the skin	Degree of maturation	Month of harvest	Site of harvest
1A(Y)	Yellow	Unripe	July	Site 1 Latitude: 33°41'23.50"N Longitude: 2°39'44.19"E Altitude: 836 m
1A(DR)	Dark red	Middle maturity		
1A(B)	Black	Ripe		
1B(Y)	Yellow	Unripe		
1B(DR)	Dark red	Middle maturity		
1B(G)	Green	Ripe		
1B(B)	Black	Ripe	August	Site 2 Latitude: 33°30'37.07"N Longitude: 2°59'32.58"E Altitude: 873 m
2(YR)	Yellow-Red	Unripe		
2(RG)	Red-Green	Middle maturity		
2(G)	Green	Ripe	August	Site 3 Latitude: 33°48'07.38"N Longitude: 2°53'20.06"E Altitude: 761 m
3(Y)	Yellow	Unripe		
3(YR)	Yellow-Red	Unripe		
3(RG)	Red-Green	Middle maturity	July	Site 4 Latitude: 33°38'42.79"N Longitude: 2°55'42.70"E Altitude: 812 m
4(YR)	Yellow-Red	Unripe		
4'(YR)	Yellow-Red	Unripe		
4'(G)	Green	Ripe	August	Site 5 Latitude: 33°59'15.80"N Longitude: 2°01'45.39"E Altitude: 1426 m
5(YR)	Yellow-Red	Unripe		
5(RG)	Red-Green	Middle maturity		
5(G)	Green	Ripe	September	
5'(YR)	Yellow-Red	Unripe		
5'(G)	Green	Ripe		

The code is composed of a number indicating the site, a first letter indicating the tree (if there is more than one per site) and letters in brackets indicating the color of the fruit. In the case where second picking on the same tree is performed an additional sign (') was added.



Fig. 1 Three samples of *P. atlantica* fruits. From left to right unripe fruits (yellow-Red), middle maturity fruits (Red-Green), and ripe fruits (Green)

Extraction and Anti-DPPH Activity of the Unsaponifiable Fraction

The extraction of the unsaponifiable matter relied on the saponification of a mass of 2 g of oil by 50 mL 1 N ethanolic KOH under reflux for 1 hour 30 min. After the addition of 50 mL of diethyl ether (double extraction) followed by washing with distilled water until neutralization, the organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and then evaporated under reduced pressure. The dry residues of the unsaponifiable fractions were solubilized in 5 mL of butanol. The antioxidant activity against DPPH was evaluated as described by Brand-Williams et al. (1995) with little modification. Succinctly, 1 mL of sample dilutions was added to 1 mL of 250 μ M solution of DPPH prepared in methanol. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm against a blank using a Shimadzu 1601 spectrophotometer. The normal purple color of DPPH will turn into yellow when it is reduced by an antioxidant in a dose-dependent manner. The concentration of the extracts providing 50% inhibition (EC50) was calculated from the graph plotting inhibition percentages against the extract concentration. The commercial vitamin E was used as positive control.

Extraction and Study of Phenolic Compounds from Oils

Given the low level of phenolic compounds in oils, samples were pooled in three mixtures depending on the fruit-ripening degree. The total tocopherol content and the antioxidant activity were assessed before and after extraction of the phenolic compounds.

Extraction of Phenolic Compounds

Hydrosoluble (polar) phenolic compounds were extracted with methanol and water (80:20). Briefly, 15 g of unripe fruit oil, 22 g of middle maturity fruit oil, and 25 g of ripe fruits oil were dissolved individually in 50 mL hexane and then mixed with 80 mL methanol and water (80:20). The preparation was stirred for 8 hours at room temperature. After decantation, the hydroalcoholic phase was recovered and methanol was removed under reduced pressure in a rotary evaporator at 40 °C. The remaining aqueous solution of the extraction was washed with petroleum ether to remove lipids and the hydrosoluble phenolic compounds were extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was dried by adding a sufficient amount of anhydrous sodium sulfate, filtered, and then evaporated to dryness using a rotary evaporator. The precipitate was dried, dissolved in 5 mL methanol, and kept at +4 °C until use. The yield of polyphenols was expressed as the ratio between the mass of raw phenolic extract and the mass of starting oil in gram.

Hexane was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The obtained oils were without hydrosoluble phenolic compounds but contained liposoluble ones.

The Total Tocopherol Content

The total tocopherol content was determined, before and after extraction of the phenolic compounds, according to the colorimetric method of Emmerie and Engel (1939) with minor modifications. Briefly, 0.1 g oil samples were diluted in butanol. Then, 1 mL of 0.4% 1,10-phenantroline and 0.5 mL of 0.12% FeCl₃ (prepared in ethanol) were added

to 1 mL of each dilution. After 5 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 510 nm against a blank using Shimadzu 1601 spectrophotometer. A calibration curve was realized with known concentrations of commercial vitamin E under the same conditions. The results are expressed as mg α -tocopherol equivalents by 100 g of oil. Experiments were carried out in triplicate.

Free Radical (DPPH)-Scavenging Activity

The antioxidant activity was assessed, before and after extraction of the phenolic compounds, as previously described (refer to the unsaponifiable matter section).

Determination of Total Phenol Content

The total phenolic content was determined with the Folin–Ciocalteu reagent (Singleton et al., 1999). First, a standard curve was plotted using gallic acid as a standard. Different concentrations of gallic acid were prepared in methanol and their absorbances were recorded at 765 nm. A volume of 100 μ L of samples was added to 500 μ L of Folin–Ciocalteu reagent 10% (diluted 10 times in distilled water). Two minutes later, 2 mL of 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) were added to the reaction medium to promote a basic medium. These solutions were kept in the dark for 30 min at room temperature. The absorbance of each solution was read at 760 nm against a blank. The results were expressed in milligrams equivalent of gallic acid per 100 g of oil.

Determination of Flavonoid Content

The flavonoid content was determined spectrophotometrically according to the method described by Zhishen et al. (1999). A volume of 1 mL of sample or standard is added to 1 mL of the AlCl_3 solution (2% in methanol). After 20 min of incubation, the absorbance is read at 409 nm. The concentration of flavonoids is derived from a calibration range established with quercetin and is expressed in milligrams of quercetin equivalent per 100 g of oil.

Evaluation of Antioxidant Power of Phenolic Extracts by Scavenging Free Radical DPPH

For the phenolic extracts obtained from the oils, we followed the same procedures described previously. However, water was used to dilute samples and ascorbic acid was used as standard.

Statistical Analysis

Data analysis by PCA was carried out using the XL_STAT2014 Software. For each group of the samples, we calculated the mean and its standard deviation. The Student's t-test is used to compare the means.

Results and Discussion

Fatty Acid Composition of *P. atlantica* Fruit Oil during Maturation

The results of the fatty acid composition of *P. atlantica* fruit oils are summarized in Table 2. Two major fatty acids seem to vary during maturation. On the one hand, palmitic acid's proportion increases. On the other hand, linoleic acid's proportion decreases. Palmitic acid represents $14.46\% \pm 2.44\%$ for the unripe fruits and $19.95\% \pm 3.06\%$ for the ripe ones ($P < 0.01$). The linoleic acid level was significantly elevated in unripe fruit oil compared to ripe fruit oil and middle maturity fruits ($31.63\% \pm 3.64\%$ vs. $22.41\% \pm 3.66\%$, $P < 0.01$ and $31.63\% \pm 3.64\%$ vs. $25.35\% \pm 5.58$, $P < 0.05$, respectively). The ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids was significantly higher in unripe fruit oil (5.19 ± 0.87) compared to the ripe ones (3.66 ± 0.6 , $P < 0.005$) and to samples with middle maturity (3.96 ± 0.57 , $P < 0.05$). Our results are

Table 2 Mean values of the fatty acid composition in oil from the three groups of samples obtained by GC (%)

Fatty acids	Unripe	Middle maturity	Ripe
14:0	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.02	Tr
16:0	$14.46 \pm 2.44^{***\text{††}}$	18.64 ± 2.44	19.95 ± 3.06
16:1 ω 9	Tr	Tr	Tr
18:0	1.65 ± 0.37	1.63 ± 0.37	1.49 ± 0.31
18:1 ω 9	49.96 ± 2.79	51.32 ± 6.98	52.77 ± 4.53
18:2 ω 6	$31.63 \pm 3.64^{**\text{†}}$	25.35 ± 5.58	22.41 ± 3.66
18:3 ω 3	0.75 ± 0.22	0.75 ± 0.26	Tr
20:00	Tr	0.08 ± 0.01	Tr
20:1 ω 9	0.26 ± 0.08	0.27 ± 0.07	0.22 ± 0.04
Σ SFA	16.42 ± 2.34	20.37 ± 2.40	21.68 ± 2.98
Σ MUFA	51.09 ± 2.52	53.46 ± 6.39	54.33 ± 4.74
Σ PUFA	32.38 ± 3.65	26.11 ± 5.68	23.56 ± 4.29
Σ UFA	83.47 ± 2.30	79.57 ± 2.44	77.89 ± 2.52
Σ UFA/ Σ SFA	$5.19 \pm 0.87^{***\text{†}}$	3.96 ± 0.57	3.66 ± 0.60

SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; Tr, trace. $^{**}P < 0.01$ (compared with ripe samples). $^{\text{††}}P < 0.01$ (compared with middle maturity samples). $^{\text{†}}P < 0.05$ (compared with middle maturity samples). $^{***}P < 0.005$ (compared with ripe samples).

similar to those reported by Yousfi et al. (2002) and Guenane et al. (2015) for *P. atlantica* and those of Charef et al. (2008) and Trabelsi et al. (2012) for *Pistacia lentiscus* as well as those of Ozcan (2004) for *Pistacia terebinthus*. The same finding was obtained for 18:2 in Brassica (*Brassica napus* L.) oil (Norton and Harris, 1975). In contrast, it was reported that the content of palmitic acid in olive oil decreased during fruit ripening while oleic and linoleic acids increased (Beltran et al., 2004).

It should be noted that the sample 5(YR) obtained from El-Ghaicha (altitude 1426 m) is distinguished by the lowest proportion of palmitic acid, the highest proportion of linoleic acid, and the highest unsaturated fatty acid to saturated fatty acid ratio (11.26%, 37.71%, and 6.42, respectively, results not shown). These values may be explained by environmental factors and soil properties.

Extraction and Anti-DPPH Activity of the Unsaponifiable Fraction

First, we determined the oil content before extraction of the unsaponifiable fraction. This parameter is significantly elevated for the ripe fruits ($33.67\% \pm 4.09\%$ vs. $12.04\% \pm 5.2\%$ for unripe fruits, $P < 0.001$) indicating accumulation during maturation. The same result was previously reported by Guenane et al. (2015).

The unsaponifiable fraction rate decreases with the maturation of fruits (Table 3). It changes from $9.29\% \pm 6.19\%$ to $2.98\% \pm 1.71\%$ ($P < 0.05$). According to the published data, the unsaponifiable fraction rate in oilseeds oil did not exceed 2–3% (Rahmani, 2005). The high proportion of the unsaponifiable matter in the unripe fruits oil indicates richness in compounds such as tocopherols, triterpenic compounds, and carotenes. This is the first report on the variation in the unsaponifiable fraction rate during the fruit ripening.

As can be seen in Table 3, the EC50 mean values of the unsaponifiable fraction for the three groups of fruits do not exceed 1 mg mL^{-1} indicating a powerful antioxidant activity of this matter, which is much greater than that of crude oil (EC50 mean values between 26 and 40 mg mL^{-1} , Guenane et al., 2017). It was reported that EC50 of the whole unsaponifiable matter of bene hull oil (Iranian *Pistacia*

atlantica subsp. *mutica*) was less than 1 mg mL^{-1} (Farhoosh et al., 2011). It seems that the unsaponifiable matter of *P. atlantica* fruit oil contains important antioxidants such as tocopherols and carotenes. This observation warrants further investigations. We note with great interest the increase of the antioxidant activity of the unsaponifiable fraction during the fruit maturation (EC50 changes from a mean value of $0.87 \pm 0.68 \text{ mg mL}^{-1}$ to a mean value of $0.48 \pm 0.33 \text{ mg mL}^{-1}$). This result is in contrast to what has been indicated for oils (Guenane et al., 2017). This extremely interesting finding could indicate the variation and/or the appearance of active molecules (tocopherols, triterpenic compounds, and carotenes) in the unsaponifiable matter of the ripe fruits.

The biological effects of the unsaponifiable fraction of *P. atlantica* fruit oil need to be clearly established. Indeed, numerous findings have highlighted beneficial biological activities such as antioxidant and anti-inflammatory properties of the unsaponifiable matter of the vegetable oils (Cardeno et al., 2014; Farhoosh et al., 2011).

Extraction, Quantification of Phenolic Compounds from Oils, and Evaluation of their Antioxidant Activity

The phenolic extraction yield from the oil, the total polyphenol content, and the flavonoid contents are shown in Table 4. It seems that these parameters decrease with the fruit ripening (from 0.574% to 0.062%, from 2.51 to 0.13 mg per 100 g oil, and from 1.64 to 0.09 mg per 100 g oil, respectively). To our knowledge, this is the first time that the variation of phenolic compounds in *P. atlantica* fruits oil has been studied and substantial amounts of phenolic compounds in the unripe fruits oil have been reported. Saber-Tehrani et al. (2013) noted that caffeic acid and cinnamic acid were the predominant phenolic compounds in *P. atlantica* cold-pressed oil (1.96 mg kg^{-1} oil and 0.67 mg kg^{-1} oil respectively). As shown in Table 4, our unripe fruits oil contains a high level of phenolic compounds that were dominated by flavonoids (65.33%).

There are very few data on phenolic compounds in vegetable oil and most research focused on olive oil (Becerra-

Table 3 Mean values of the oil content, the percentage of the unsaponifiable fraction, and the anti-DPPH activity of the unsaponifiable fraction (expressed as EC50) for the three groups of samples

	Unripe	Middle maturity	Ripe
Oil content (% w/w)	$12.04 \pm 5.21^{***xxxx}$	$28.63 \pm 4.5^\diamond$	33.67 ± 4.09
% unsaponifiable (w/w)	$9.29 \pm 6.19^*$	4.26 ± 2.24	2.98 ± 1.71
DPPH EC50 (mg mL^{-1})	0.87 ± 0.68	0.6 ± 0.37	0.48 ± 0.33

*** $P < 0.001$ (compared with ripe samples). * $P < 0.05$ (compared with ripe samples). xxxx $P < 0.001$ (compared with middle maturity samples). $^\diamond P < 0.05$ (compared with ripe samples).

Table 4 Total phenolic compound content, flavonoid content, and the anti-DPPH activity of the phenolic extract (expressed as EC50) from the three oils

	Rate of phenolic extract (% w/w)	Total phenolic compound content (mg per 100 g oil)	flavonoid content (mg per 100 g oil)	DPPH EC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Mixture 1 (Unripe)	0.574	2.51	1.64 (65.33%)	89.2
Mixture 2 (Middle maturity)	0.109	0.22	0.15 (68.18%)	1309
Mixture 3 (ripe)	0.062	0.13	0.09 (69.23%)	-Not determined

Herrera et al., 2014; Godoy-Caballero et al., 2013; Nakbi et al., 2010).

To determine the antioxidant activity of the phenolic extract, the free radical-scavenging activity was evaluated with DPPH. The result is presented in Table 4. Mixture 1 (unripe) that is characterized by richness in phenolic compounds has the highest anti-DPPH power (EC50 $89.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). This test could not be performed for Mixture 3 (ripe) because of the very small amount of the extract.

Tocopherols are generally the most antioxidant molecules in oils (Hussain et al., 2013; Matthäus and Ozcan, 2006), we were interested in this before and after phenolic extraction. The quantification of total tocopherols was realized and the antioxidant activity of the oils was assessed before and after extraction of the phenolic compounds. We note with interest that the unripe fruit oil (Mixture 1), before and after extraction of the phenolic compounds, has the highest levels of tocopherols, which are associated with the most important antioxidant power (Table 5). Extraction of phenolic compounds was associated with a significant decrease in the total tocopherol content as well as the antioxidant activity of the oils. This parameter was significantly affected for Mixture 1 (four-folds less active, Table 5). The decrease of the total tocopherol content (between 49% and 63%) may be explained by the presence of phenolic compounds, which interfere with tocopherols in the colorimetric dosage. Loss in the antioxidant activity after extraction of phenolic

compounds indicates clearly that these compounds are directly involved particularly for the unripe samples (four-folds more active than the ripe samples before extraction of phenolic compounds vs. only twofold more active after extraction, Table 5). Our findings support that the antioxidant activity of oils from *P. atlantica* fruits could be due to both tocopherols and phenolic compounds.

Data Analysis by PCA

PCA of the three major fatty acids (oleic, linoleic, and palmitic acids), percentage, the oil content, the unsaponifiable fraction percentage (UFP), and the antioxidant activity of this fraction (EC50UF) gives two linear combinations that explain, overall, 73.92% of the variance. Fig. 2 presents the vectors of each parameter (variable) and the distribution of all the studied samples in the plane defined by the values of the two principal components. We notice that unripe samples (Y -Yellow- and YR -YellowRed-) constitute a distinctive cluster characterized by high levels of linoleic acid and unsaponifiable fraction. However, this group has the highest EC50 values of the unsaponifiable fraction (EC50UF) indicating the lowest antioxidant activity. Oil content and the palmitic acid rate are located near the ripe and middle maturity fruits cloud, which is consistent with the previous data. Finally, oleic acid does not seem to be a characterizing variable.

Table 5 Total tocopherol content and the anti-DPPH activity (expressed as EC50) of the three oils before and after extraction of phenolic compounds

	Before extraction of phenolic compounds		After extraction of phenolic compounds	
	Total tocopherol content (mg per 100 g oil)	DPPH EC50 (mg mL^{-1})	Total tocopherol content (mg per 100 g oil)	DPPH EC50 (mg mL^{-1})
Mixture 1 (Unripe)	584.67	4.92	219.55 (37.55%)	18.36
Mixture 2 (Middle maturity)	213.48	15.51	76.51 (35.83%)	38.08
Mixture 3 (ripe)	143.25	20.94	73.71 (51.45%)	40.81

In brackets, percentage of the tocopherol content referred to that before phenolic extraction.

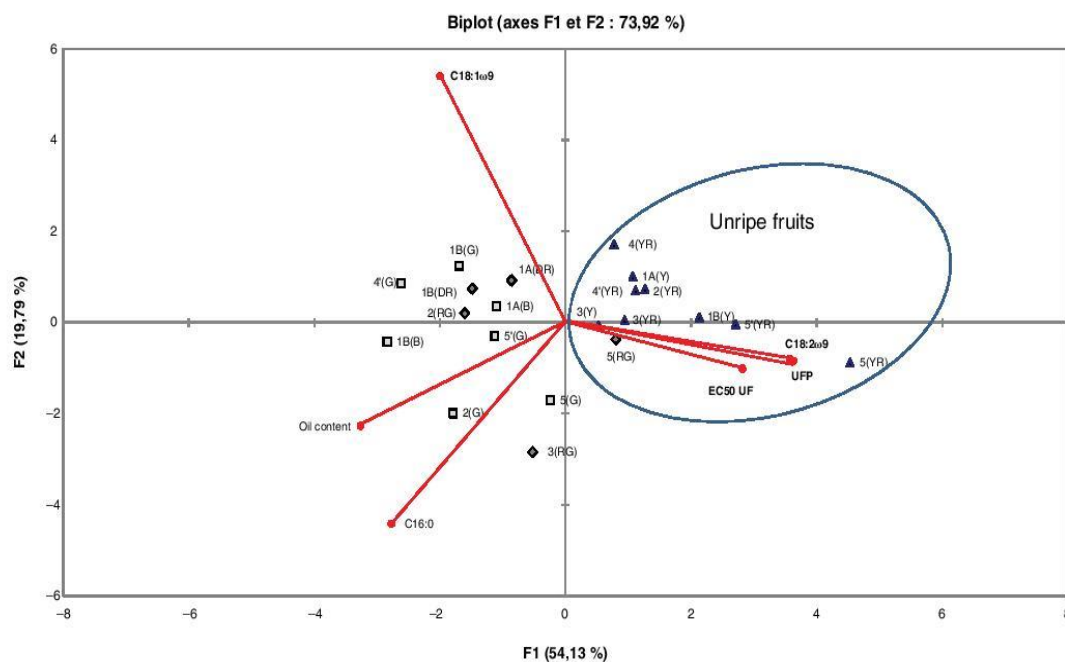


Fig. 2 Two-dimensional plot on axes F1 and F2 of different samples of *P. atlantica* fruits using PCA. UFP, Unsaponifiable fraction percentage, EC50UF EC50 of the unsaponifiable fraction. ▲ Unripe fruits (Y and YR) ◆ Middle maturity fruits (DR and RG) □ Ripe fruits (G and B)

As can be seen in Fig. 2, the sample coded 5(RG) (middle maturity) belongs to the unripe fruit cluster. This sample was collected from a tree growing at 1426 m. Thus, environmental conditions could influence the oil chemical composition.

It should be noted that EC50 values of the unsaponifiable fraction correlate well with its percentage ($r = 0.82$) indicating that the more it increases the less it is active. This relationship needs to be explored. On the other hand, there is an appreciable negative correlation between palmitic and linoleic acids ($r = -0.64$) suggesting an opposed variation during the drupe maturation.

Conclusion

Despite the low oil content, the unripe fruits of *P. atlantica* could constitute a major source of beneficial compounds such as linoleic acid, phenolic compounds, and molecules in the unsaponifiable matter. These compounds seem to be criteria to distinguish early stages of *P. atlantica* fruit maturation. For us, the present study and its findings stand as a leading research tool for determining the ideal harvesting date of *Pistacia atlantica* fruits. Further studies are needed to consolidate these results.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R., & Sayago, A. (2014) Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-equadrupole mass spectrometry. *LWT-Food Sciences and Technology*, **57**:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.016>
- Beltran, G., Del Rio, C., Sanchez, S., & Martinez, L. (2004) Influence of harvest and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from Cv. Picual. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**:3434–3440. <https://doi.org/10.1021/jf049894n>
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Sumraghi, M. S., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. (2013) Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, **2013**:1–33. <https://doi.org/10.1155/2013/219815>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, **28**:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Aparicio-Soto, M., & Alarcon-de-la-Lastra, C. (2014) Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chemistry*, **147**:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.117>

(BENTIRECHE FATNA).

(Effet de la maturité des fruits de pistachier de l'atlas sur la variation de la composition de leurs lipides ainsi sur l'activité antioxydante).

Résumé

Pistacia atlantica, espèce très répandue dans les régions arides et semi-arides, constitue une source inépuisable de molécules douées d'activités biologiques. Ce travail s'est intéressé à l'influence du degré de maturité et des facteurs environnementaux sur le contenu en lipides et composés phénoliques ainsi que sur l'activité antioxydante de ces composés des fruits de Pistachier de l'atlas. Les résultats obtenus ont montré que les huiles des fruits immatures présentent un faible rendement en huile, qu'ils sont riches en acides insaturés, en stérols, en tocophérols et en fractions insaponifiables. Les huiles des fruits immatures collectés très précocement sont marquées par une proportion assez significative en acide linoléique. L'activité antioxydante des huiles des fruits immatures est la plus importante. Par contre la fraction insaponifiable des huiles des fruits matures s'est distinguée par le pouvoir antioxydant le plus élevée par rapport à celle des huiles des fruits immatures. Les teneurs en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante sont substantiellement prononcés aussi bien au niveau des tourteaux qu'au niveau des huiles des fruits immatures. L'activité antioxydante des huiles de fruits immatures serait due principalement aux composés phénoliques. En revanche, pour les huiles des fruits matures, la fraction insaponifiable aurait le rôle prépondérant dans l'activité antioxydante. En dernier lieu, les facteurs environnementaux en particulier ceux en rapport avec l'altitude auraient un effet marqué sur, notamment la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante dans les fruits.

Mots clés: *Pistacia atlantica*, Fruit, Maturité, Huile, Acide gras, Tocophérol, Tourteaux, Polyphénols, Activité antioxydante, Facteurs environnementaux.

(Effect of maturity of *Pistacia atlantica* fruits on the variation of their lipids composition and on the antioxidant activity).

Abstract:

Pistacia atlantica, a well-known species in arid and semi-arid regions, it contains a bottomless source of molecules endowed with biological activities. This work interested in the influence of the maturity degree and environmental factors on both lipids and phenolic contents as well as on the antioxidant activity of these compounds of pistachios fruits. The results obtained showed that the oils of immature fruits have low oil yield, that they are rich in unsaturated acids, sterols, tocopherols and unsaponifiable fractions. The immature fruits' oils, which collected very early, are marked with a significant proportion of linolenic acid. The antioxidant activity of immature fruit oils was the most important. On the other hand, the unsaponifiable fraction of oils obtained from mature fruits endowed by the highest antioxidant power in comparison with oils from immature fruits. The phenolic contents as well as the antioxidant activity are substantially marked in both defatted parts and in the immature fruits' oils. The obtained antioxidant activity of immature fruit oils was mainly due to phenolic compounds. On the other hand, the unsaponifiable fraction, taken from oils of mature fruits, would have the predominant role in antioxidant activity. At last, the environmental factors especially those related to altitude have remarkable effect on particularly the phenolic contents and the antioxidant activity in the fruits.

Key words: *Pistacia atlantica*; Fruit; Maturity; Oil; Fatty acid; Tocopherol; defatted fruits; Polyphenols; Antioxidant activity; Environmental factors.